



UNIVERZITET U NOVOM SADU  
POLJOPRIVREDNI FAKULTET

# FIZIOLOŠKI I MOLEKULARNI ASPEKTI TOLERANTNOSTI ŠEĆERNE REPE PREMA SUŠI

DOKTORSKA DISERTACIJA

Mentor:  
Prof. dr Ivana Maksimović

Kandidat:  
mr Marina Putnik-Delić

Novi Sad, 2013. godine

*Istraživanja obuhvaćena ovom doktorskom disertacijom sprovedena su u laboratorijama Poljoprivrednog fakulteta u Novom Sadu kao i u Zavodu za šećernu repu, Instituta za ratarstvo i povrtarstvo u Novom Sadu.*

*Najveću zahvalnost želim da uputim mentorki Prof. dr Ivani Maksimović, na svesrdnoj pomoći i punoj podršci tokom svih faza izrade ovog rada.*

*Posebnu zahvalnost dugujem Prof. dr Slobodanki Pajević i dr Nevenii Nagl, na razumevanju, ukazanom poverenju i veoma korisnim sugestijama za poboljšanje rada.*

*Dr Filippo Piro je osoba kojoj dugujem veliku zahvalnost za nesebičnu pomoć pri statističkoj obradi i tumačenju podataka.*

*Zahvaljujem se svim kolegama sa predmeta Fiziologija biljaka koji su mi pružili pomoć u svakom trenutku izrade rada i bili podrška svih ovih godina.*

*Kolektivnu Zavoda za šećernu repu Instituta za ratarstvo i povrtarstvo u Novom Sadu zahvaljujem se na pomoći u izvođenju istraživanja.*

*Iskreno se zahvaljujem i svim kolegama i prijateljima koji su na bilo koji način doprineli izradi ove disertacije.*

*Na kraju, zahvaljujem se svojoj porodici na beskrajnom strpljenju, inspiraciji, podršci i pomoći bez koje ne bih uspela.*

UNIVERZITET U NOVOM SADU  
POLJOPRIVREDNI FAKULTET

Ključna dokumentacijska informacija

Redni broj:

RBR

Identifikacioni broj:

IBR

Tip dokumentacije:

TD

Monografska dokumentacija

Tip zapisa:

TZ

Tekstualni štampani materijal

Vrsta rada :

VR

Doktorska disertacija

Ime i prezime autora:

AU

Marina Putnik-Delić

Mentor (titula, ime, prezime,  
zvanje):

MN

Dr Ivana Maksimović, redovan profesor,  
Poljoprivredni fakultet Novi Sad

Naslov rada:

NR

**Fiziološki i molekularni aspekti tolerantnosti  
šećerne repe prema suši**

Jezik publikacije:

JP

Srpski

Jezik izvoda:

JI

Srpski / engleski

Zemlja publikovanja:

ZP

Republika Srbija

Uže geografsko područje:

UGP

AP Vojvodina

Godina:

GO

2013.

Izdavač:

IZ

Autorski reprint

Mesto i adresa:

MA

Poljoprivredni fakultet,  
Trg Dositeja Obradovića 8, 21000 Novi Sad

Fizički opis rada: (8 poglavlja / 125 stranica / 30 slika / 28 tabela /  
FO 171 referenca / biografija)

Naučna oblast: Biotehničke nauke  
NO

Naučna disciplina: Fiziologija biljaka  
ND

Predmetna odrednica, ključne reči: *Beta vulgaris*, tolerantnost prema suši,  
PO koncentracija slobodnog prolina, kultura tkiva,  
PEG, ekspresija kandidat gena

UDK 582.661.15:632.112:2-673.5

Čuva se: Biblioteka Poljoprivrednog fakulteta, Novi Sad  
ČU

Važna napomena: Nema  
VN

Izvod:  
IZ

Istraživanja su sprovedena na jedanaest genotipova šećerne repe (*Beta vulgaris* ssp. *vulgaris*, L., označeni brojevima 1-11) koji su u poljskim uslovima ispoljili razlike u opservacionom testu nivoa tolerantnosti prema suši (visoko, srednje i nisko tolerantni). U prvom delu eksperimenta biljke su gajene u polukontrolisanim uslovima, u stakleniku u supstratu koji je bio mešavina zemlje i peska. Biljke su svakodnevno zalivane tokom 90 dana, nakon čega je izazvan vodni deficit prestankom zalivanja, dok je kod kontrolnih biljaka zalivanje nastavljeno. Pet dana po prestanku zalivanja analizirani su parametri koji bi trebalo da ukažu na genotipske razlike u smislu tolerantnosti prema nedostatku vode. Utvrđen je sadržaj vode/suve materije u zemljištu i u biljnim tkivima (koren stablo i list). Lisna površina i koncentracija pigmenta hloroplasta su ustanovljeni kod kontrolnih biljaka s ciljem utvrđivanja genotipskih specifičnosti. Osim toga, mereni su parametri fluorescencije hlorofila ( $F_0$ ,  $F_m$ ,  $F_v$ ,  $F_v/F_m$  i  $t_{1/2}$ ) kako bi se utvrdio efekat stresa izazvanog nedostatkom vode na inhibiciju transporta elektrona kroz PSII, i koncentracija slobodnog prolina, amino kiseline koja se nakuplja u uslovima stresa. U drugom delu eksperimenta ovi genotipovi su testirani u kontrolisanim, *in vitro* uslovima gajenja. Aksilarni izdanci su gajeni na podlozi za mikropropagaciju sa 0 (kontrola), 3 i 5% polietilen glikola (PEG 6000) pune četiri nedelje, a potom su vršene analize. Utvrđena je sveža masa izdanaka, sadržaj suve materije i koncentracija slobodnog prolina. U trećem delu eksperimenta upoređene su razlike u ekspresiji 13 kandidat-gena, koji su povezani sa reakcijom biljaka na uslove stresa, posebno suše, u listovima biljaka gajenih u polukontrolisanim uslovima.

Biljke izložene stresu u polukontrolisanim uslovima gajenja su u proseku imale oko tri lista manje, za četiri procenta veći udeo suve materije i sedmostruko veći sadržaj prolina. Koncentracija prolina u listovima je bila viša u uslovima nedostatka vode u polukontrolisanim uslovima kod svih genotipova, a posebno kod nekih iz slabo tolerantne (2, 6) i visoko tolerantne (4) grupe.

U *in vitro* uslovima usled tretmanom PEG-om smanjila se ukupna suva masa i više nego prepolovio broj aksilarnih izdanaka. PEG u koncentraciji od 3% je doveo do

povećanja ukupne sveže mase, a koncentracija prolina se povećala se porastom koncentracije PEG. Koncentracija prolina u uslovima stresa je kod oba eksperimenta bila značajno povećana u odnosu na kontrolu i to u *in vitro* uslovima šest puta, a u polukontrolisanim uslovima u stakleniku šesnaest puta u odnosu na odgovarajuće kontrole. Povećanje sadržaja prolina u biljkama gajenim u polukontrolisanim uslovima je bilo tri puta veće u odnosu na eksperiment sa PEG-om.

Koncentracija slobodnog prolina, kao jedan od potencijalnih parametara - pokazatelja tolerantnosti genotipova šećerne repe prema suši, je adekvatniji od ukupne suve mase. Rezultati su pokazali da je test u *in vitro* uslovima (posebno tretman 3% PEG-om) efikasniji za ocenu tolerantnosti prema suši od eksperimenta u polukontrolisanim uslovima. Grupisanje genotipova prema nivou tolerisanja nedostatka vode na osnovu koncentracije prolina ustanovljene u ekperimentu *in vitro* dalo je isti rezultat kao i opservacioni test u poljskim uslovima.

Utvrđene su promene u ekspresiji kandidat-gena u uslovima suše u odnosu na kontrolu, a ustanovljene su i razlike između genotipova. Jedan od analiziranih kandidat-gena može da posluži za dalji razvoj markera.

Ovi rezultati mogu da se primene u procesu oplemenjivanja šećerne repe koje je usmereno na povećanje tolerantnosti prema ovom abiotičkom činiocu.

Datum prihvatanja teme od strane 28.02.2008.

NN veća:

DP

Datum odbrane:

DO

Članovi komisije:

(ime i prezime / titula / zvanje / naziv organizacije / status)

KO

mentor: Dr Ivana Maksimović, redovni profesor, NO Fiziologija i ishrana biljaka, Poljoprivredni fakultet, Novi Sad

---

član: Dr Slobodanka Pajević, redovni profesor, NO Fiziologija biljaka, Prirodno matematički fakultet, Novi Sad

---

član: Dr Nevena Nagl, naučni savetnik, NO Biotehnika- Poljoprivreda, Institut za ratarstvo i povrtarstvo, Novi Sad

---

UNIVERSITY OF NOVI SAD  
FACULTY OF AGRICULTURE

Key word documentation

Accession number:

ANO

Identification number:

INO

Document type:

DT

Monograph documentation

Type of record:

TR

Textual printed material

Contents code:

CC

PhD thesis

Author:

AU

Marina Putnik-Delić, MSc

Mentor:

MN

Ivana Maksimović, PhD, full professor,  
Faculty of Agriculture Novi Sad

Title:

TI

**Physiological and molecular aspects of sugar  
beet tolerance to drought**

Language of text:

LT

Serbian

Language of abstract:

LA

Serbian/English

Country of publication:

CP

Republic of Serbia

Locality of publication:

LP

Province of Vojvodina

Publication year:

PY

2013

Publisher:

PU

Author's reprint

Publication place:

PP

Faculty of Agriculture,  
Trg Dositeja Obradovića 8, 21000 Novi Sad

Physical description: PD	8 Chapters/ 125 pages/28 tables/30 images/171 references/ biography
Scientific field SF	Biotechnical sciences
Scientific discipline SD	Plant physiology
Subject, Key words SKW	<i>Beta vulgaris</i> , drought tolerance, free proline, tissue culture, PEG, candidate-gene expression
UC	582.661.15:632.112:2-673.5
Holding data: HD	Library of the Faculty of Agriculture, University of Novi Sad
Note: N	None

Abstract:

AB

This research was conducted on eleven sugar beet (*Beta vulgaris* ssp. *vulgaris*, L. genotypes, labeled 1-11), which showed differences in the observation tests, when exposed to drought under field conditions (high, medium and low tolerance).

In the first experiment, plants were grown under semi-controlled conditions in a greenhouse. The substrate was a mixture of soil and sand. The plants were watered daily during 90 days and then water deficiency was imposed by cessation of watering. Control plants were watered continuously during the entire experiment. Five days after the cessation of watering various parameters that are supposed to indicate genotypic differences in terms of tolerance to water deficiency were analysed. Water content in the soil substrate and plant tissues (roots, stems and leaves) was determined. Leaf area and the concentration of chloroplast pigments were identified in the control plants in order to assess genotypic specificities. In addition, parameters of chlorophyll fluorescence ( $F_0$ ,  $F_m$ ,  $F_v$ ,  $F_v/F_m$  and  $t_{1/2}$ ) were measured to assess effect of water deficiency on electron transport through PSII. Concentration of free proline, an amino acid that accumulates in response to stress, was determined as well.

In the second experiment, the same sugar beet genotypes were tested under controlled, *in vitro*, conditions of tissue culture. Axillary buds were cultured on solid medium for micropropagation to which was added 0 (control), 3 or 5% polyethyleneglycol (PEG 6000), and after four weeks samples were analyzed. Shoot fresh weight, content of dry matter and free proline concentration were assessed.

In the third part of the experiment, genes selected from the literature (candidate-genes) were used to assess differences in their expression in leaves, between genotypes, in response to drought. Such differences (if found) might be used to develop markers usable in marker-assisted selection.

Plants exposed to stress in semi-controlled growing conditions had about three leaves less, four percent higher percent of dry matter and seven-fold higher proline content. Concentration of proline was higher in plants lacking water in semi-controlled

conditions in all genotypes, but especially in some of low tolerant (2, 6) and high tolerant (4) groups.

In the *in vitro* experiment PEG treatment reduced the total dry weight and more than halved number of axillary shoots. Total fresh weight increased in the presence of 3% PEG and proline concentration increased with an increase in PEG concentration in the medium. Proline concentration significantly increased compared to respective controls in both experimental conditions. In *in vitro* conditions the increase was sixfold, and in semi-controlled conditions in a greenhouse sixteenfold. The increase in proline concentration in plants grown in semi-controlled conditions was three fold higher than in the experiment with PEG.

The concentration of free proline, as one of the potential parameters - indicators of the degree of tolerance of sugar beet genotypes to drought, is more appropriate than the total dry weight. The results showed that the test in *in vitro* conditions (especially 3% PEG treatment) is more efficient for the evaluation of drought tolerance than the experiment in semi-controlled conditions in a greenhouse. Classification of genotypes with respect to the level of tolerance to water deficiency on the basis of concentration of free proline, assessed in the experiment *in vitro*, gave the same result as the observation test in the field.

Changes in the expression of candidate genes under drought conditions are revealed both with respect to the control and between genotypes. One of the analyzed candidate genes might be used for further development of a marker.

These results can be applied in sugar beet breeding process, which is aimed at increasing tolerance to water deficiency.

Accepted on Scientific Board on: February 28<sup>th</sup> 2008  
AS

Defended:  
DE

Thesis Defend Board:  
DB

Ivana Maksimović, PhD, full time professor,  
Plant physiology, Faculty of Agriculture, Novi  
Sad, mentor

---

Slobodanka Pajević, PhD, full time professor,  
Plant physiology, Faculty of Science, Novi Sad,  
member

---

Nevena Nagl, PhD, Scientific adviser,  
Bioengineering-Agriculture, Institute of Field  
and Vegetable Crops, Novi Sad, member

---



## SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b>	4
1.1. Sistematika šećerne repe	4
1.2. Poreklo šećerne repe i rasprostranjenost	4
1.3. Količine i raspored padavina potrebne za pravilan razvoj šećerne repe	5
1.4. Uticaj nedostatka vode na proizvodnju šećerne repe	6
1.5. Mogućnosti prevazilaženja problema nedostatka vode	7
1.6. Primena biljne biotehnologije u povećanju otpornosti biljaka prema nedostatku vode	9
<b>2. CILJ RADA</b>	11
<b>3. PREGLED LITERATURE</b>	12
3.1. Tolerantnost šećerne repe prema nedostatku vode	12
3.2. Hemijske reakcije šećerne repe na uslove stresa	14
3.3. Akumulacija prolina	15
3.4. Molekularni aspekti tolerantnosti prema suši	16
<b>4. MATERIJAL I METOD RADA</b>	23
4.1. Biljni materijal	23
4.2. Eksperimentalne metode	23
4.3. Eksperiment u polukontrolisanim uslovima	24
4.3.1. Gajenje biljaka	24
4.3.2. Fiziološki parametri	24
a) Sadržaj vode / suve materije u zemljištu	25

b)	Sadržaj vode / suve materije u biljnom materijalu	25
c)	Relativan sadržaj vode (RWC)	25
d)	Parametri fluorescencije hlorofila ( $F_0$ , $F_m$ , $F_v$ , $F_v/F_m$ i $t_{1/2}$ )	26
e)	Koncentracija slobodnog prolina	26
f)	Lisna površina	27
g)	Koncentracija pigmenata hloroplasta (hl a, hl b, car, hl a+b)	27
4.4.	Eksperiment u uslovima <i>in vitro</i>	28
4.5.	Analiza promena u ekspresiji gena povezanih sa vodnim režimom	28
4.5.1.	Ekstrakcija genomske DNK	29
4.5.2.	Ekstrakcija informacione RNK	29
4.5.3.	Sinteza cDNK	30
4.5.4.	Amplifikacija kandidat gena	30
4.6.	Statistička obrada podataka	33
<b>5.</b>	<b>REZULTATI RADA</b>	34
5.1	Diferencijacija genotipova šećerne repe na osnovu fizioloških testova u polukontrolisanim uslovima	34
5.1.1.	Uticaj suše na fotosintetske karakteristike testiranih genotipova	54
5.2.	Eksperiment u kontrolisanim uslovima (kultura tkiva)	60
5.3.	Poređenje rezultata eksprimenata u polukontrolisanim i kontrolisanim uslovima	74
5.4	Analize ekspresije kandidat gena	79
<b>6.</b>	<b>DISKUSIJA</b>	88
6.1.	Statističke transformacije analiziranih podataka fizioloških testova	88

6.2.	Diferencijacija genotipova na osnovu fizioloških testova	89
6.3.	Molekularne analize	100
<b>7.</b>	<b>ZAKLJUČAK</b>	<b>105</b>
<b>8.</b>	<b>LITERATURA</b>	<b>108</b>
	Biografija	124

## **1. UVOD**

### **1.1. Sistematika šećerne repe**

Gajena repa vodi poreklo od divljih vrsta roda *Beta* iz oblasti južne i jugozapadne Azije, Sredozemlja i Zapadne Evrope. Helm je 1957. godine izvršio sistematizaciju vrste *Beta vulgaris* na osnovu morfoloških karakteristika. Prema ovoj sistematici *Beta vulgaris Subsp. vulgaris* se deli na dva konvarijeteta: convar. *vulgaris* (baštenska blitva koja se gaji radi lista); convar. *crassa* (zadebljala repa, gaji se radi zadebljalog korena). Convar. *crassa* se deli na četiri provarijeteta: provar. *conditiva* (crvena repa sa crvenom bojom korena); provar. *lutea* (žuta repa sa žutom bojom korena); provar. *crassa* (stočna repa sa belom bojom korena) i provar. *altissima* (šećerna repa sa belom bojom korena).

Provar. *altissima* se deli na četiri forme: f. *altissima* (sa belom bojom kore); f. *nigra* (sa crnom bojom kore); zatim forma sa žutom i forma sa crvenom bojom kore.

### **1.2. Poreklo šećerne repe i rasprostranjenost**

U Vizantiji je korenska repa u VIII veku naše ere smatrana "trgovačkim artiklom", što upućuje na pretpostavku da je gajenje korenske repe bilo široko rasprostranjeno na Bliskom Istoku. Severno od Crnog mora gajenje korenske repe rašireno je u X veku, dok je u zapadnoj Evropi gajenje ove kulture počelo tek po završetku krstaških ratova (XII i XIII vek) i to najpre na području severne Italije i u dolini reke Rajne (Stanačev, 1979). Informišući se o istoriji repe kao kulturne biljke na osnovu detaljnih istraživanja većeg broja istraživača, Heinisch (1949) je utvrdio da prvi tragovi o gajenju repe potiču iz vremena 1000 godina pre naše ere. Dokazano je da se u to vreme na Siciliji gajila bela i crvena repa. Prema istom autoru repa se u srednjem veku prvi put pominje 812. godine u uredbi Karla Velikog. Prema Helm-u (1957), repa kao korenska biljka sa zadebljalim korenima, sa sigurnošću je poznata tek u XV veku.

Šećerna repa, kao izvor šećera, je prvi put registrovana 1750. godine. Od 1880. šećerna repa je zamenila šećernu trsku koja je do tada bila osnovni izvor šećera u kontinentalnoj Evropi. Trenutni trend proizvodnje šećera je ponovo u korist šećerne

trske, tako da je šećerna repa devedesetih godina prošlog veka učestvovala sa 30-40% u ukupnoj svetskoj proizvodnji šećera dok prvih godina ovog veka taj procenat iznosi 16, sa približno 234 miliona tona na oko 5,9 miliona hektara (FAO STAT, 2002). Od ukupne svetske proizvodnje oko 85% se proizvodi u Evropi. Pored Evropske Unije, najveći proizvođači u svetu su Brazil i Indija.

U našoj zemlji počeci gajenja šećerne repe datiraju od kraja XIX veka. Danas je zastupljena na oko 52 000 ha, sa prosečnim prinosom od oko 34 t/ha, što čini proizvodnju od 1,7 miliona tona. Od ukupne proizvodnje šećerne repe u Srbiji, 95% se proizvodi u Vojvodini ([www.vps.ns.ac.rs](http://www.vps.ns.ac.rs)).

### **1.3. Količine i raspored padavina potrebne za pravilan razvoj šećerne repe**

Prema većini autora za uspešnu proizvodnju šećerne repe dovoljna je godišnja ukupna količina taloga oko 600 mm (Spasić, 1989). Pri navedenoj količini taloga potrebe u zimskoj vlazi su oko 230 mm, a u toku vegetacije (od aprila do oktobra) oko 370 mm taloga. Međutim, prema višegodišnjim prosečnim prinosima, šećerna repa se uspešno proizvodi i sa 500 pa i sa 1000 mm ukupnih godišnjih količina taloga. Potrebe za vlagom u toku vegetacije zavise od količine toplote koja je na raspolaganju biljci. Gubitak vode isparavanjem je najveći od juna do avgusta kada je u našoj zemlji vazduh obično topao i suv. Tridesetogodišnji prosek potencijala evapotranspiracije (ET) šećerne repe iznosi 576 mm, vrednosti variraju između 528 i 625 mm u zavisnosti od vremenskih uslova. Oko 10-20% od ukupnih zahteva šećerne repe za vodom dolazi iz rezervi vode u zemljištu, a ostatak se obezbeđuje padavinama i navodnjavanjem. Količina transpirisane vode je 392 mm u proseku, tačnije od 198 mm u suvim godinama do 542 mm u kišnim godinama. Prosečna količina padavina u toku vegetacije (april-septembar) je 356 mm; varira od 138 do 521 mm u pojedinim godinama (Maksimović i Dragović, 2001).

Iz toga proizilazi da su padavine i njihov raspored od odlučujućeg značaja za prinos i kvalitet šećerne repe u kombinaciji sa odgovarajućom količinom toplote i svetlosti. Prema podacima Spasića (1989) postoji određen trend opadanja prinosa šećerne repe sa smanjenjem količina padavina u toku jeseni prethodne godine.

#### 1.4. Uticaj nedostatka vode na proizvodnju šećerne repe

Nedostatak vode u toku vegetacije se često javlja i predstavlja značajan problem u poljoprivrednoj proizvodnji. Jedan od načina za povećanje produktivnosti biljaka u uslovima ograničenih količina pristupačne vode je stvaranje genotipova koji u uslovima nedostatka vode ne smanjuju prinos ispod ekonomski prihvatljivog nivoa. Veliki izazov koji se javlja u selekcionom procesu jeste odabir idiotipa biljke za određene agroekološke uslove. Nedostatak vode ima veoma kompleksno dejstvo na fiziološke procese kod biljaka. Gubitak turgora i zatvaranje stoma su prve vidljive promene koje se javljaju pri vodnom deficitu (Kastori i Petrović, 1992). Proces fotosinteze takođe u velikoj meri zavisi od snabdevenosti biljaka vodom. Mnogobrojni eksperimentalni podaci pokazuju da narušavanje normalnog prometa vode dovodi do sniženja zasićenosti asimilacionog tkiva vodom, što izaziva depresiju fotosinteze. Iz tog razloga proizilazi da su vlažnost zemljišta i relativna vlažnost vazduha vrlo važni činioci koji određuju intenzitet fotosinteze. Vodni deficit u listovima nepovoljno se odražava na intenzitet fotosinteze, a time i na rast cvetnog stabla. U uslovima vodnog deficita neto fotosinteza iznosi oko 1 do 3 mg CO<sub>2</sub>/g suve materije/h pri čemu rast cvetnog stabla iznosi svega 0,5 do 1,5 mm/h, a može potpuno i da prestane (Kastori i Petrović, 1992a). Prema podacima Kazakova et al. (1986) intenzitet fotosinteze se desetostruko smanjuje usled suše. Kao posledica vodnog deficita uočava se smanjenje veličine hloroplasta, povećanje gustine stoma i narušavanje membranske strukture tilakoida (Silaeva, 1978). Sadržaj vode u biljkama šećerne repe u toku vegetacionog perioda, kao i voda prisutna u korenu repe nakon vađenja, značajno utiče na intenzitet disanja. Biljke gajene u uslovima nedostatka vode imaju veći intenzitet disanja od biljaka optimalno obezbeđenih vodom. Intenzitet disanja i gubitak šećera u korenu repe značajno zavise od količine vode prisutne u biljci u momentu vađenja. Stoga, ako se voda u korenu smanji za 15% aktivnost enzima invertaze se povećava čak 6 puta intenzivirajući razgradnju saharoze i/ili njenu transformaciju u druge ugljene hidrate (Petrović, 1992).

Suša pored efekta smanjenja sadržaja vode u biljnim tkivima može u ranim fazama da izazove i sintezu nekih specifičnih jedinjenja u korenu. Po ovom konceptu koren je veoma značajan „senzor“ promena u zemljištu (ne samo nedostatak vode već i promena u mehaničkom sastavu) o kojima „obaveštava“ izdanak putem „hemijskih signala suše“ (prvenstveno biljnih hormona i to abscisinske kiseline-ABA) koji se transportuju do listova (Dodd et al., 2007).

Očekuje se da će klimatske promene dovesti do povećanja prinosa za oko 1 t/ha šećera u severnoj Evropi, a smanjenja prinosa za takođe oko 1 t/ha u severnoj Francuskoj, Belgiji i zapadnoj / centralnoj Poljskoj, za period 2021-2050. godine (Jones et al., 2003). U proseku, mereno regionalnom proizvodnjom, prinosi ne pokazuju ukupnu promenu zbog izmenjene klime. Međutim, ova cifra značajno pokriva povećanje prinosa (usled ubrzanog rasta u toplijim uslovima) i gubitke zbog stresa izazvanog sušom. Predviđa se da će gubici usled suše, biti udvostručeni u oblastima gde je taj problem već zastupljen s tendencijom pojavljivanja i u severoistočnoj Francuskoj i Belgiji. Smatra se da će zapadna i centralna Evropa u proseku imati veće gubitke usled suše, koji će iznositi do 18% (2021-2050), za razliku od 7%, koliko je bilo u periodu od 1961-1990. Godišnja varijabilnost prinosa (mereno koeficijentom varijacije) će se povećati za polovinu, od 10% na 15% u odnosu na period 1961-1990, ponovo sa potencijalno ozbiljnim posledicama za industriju šećera. Oplemenjivanje s ciljem povećanja otpornosti na sušu imaće ključnu ulogu u prevazilaženju ovog problema. Ove promene su nezavisne od povećanja prinosa za 9% koje se procenjuje na osnovu rada Demmers- Derks et al. (1998). Ovo povećanje će imati i direktan uticaj na porast koncentracije atmosferskog CO<sub>2</sub> od 2021-2050 (Jones et al., 2003).

### **1.5. Mogućnosti prevazilaženja problema nedostatka vode**

Problem suše se u mnogim zemljama (Australija, USA, Kina, mediteranske zemlje) rešava i primenom novih metoda navodnjavanja, tzv. metoda deficita navodnjavanja pomoću kojih se biljke navodnjavaju manjom količinom vode. U te metode spadaju regulisani deficit irigacije (RDI) i delimično sušenje korenova (DSK). RDI je tehnika navodnjavanja gde se navodnjava korenov sistem biljaka manjom količinom vode u odnosu na moguću evapotranspiraciju. Na taj način se biljke izlažu umerenom stresu, ali tako da se ne umanju značajno prinos (FAO, 2002). DSK je tehnika navodnjavanja koja se razvila posle RDI i podrazumeva navodnjavanje samo dela korenovog sistema dok se drugi deo suši do unapred planiranog nivoa. Zatim se vrši inverzija, tako što se navodnjavana polovina suši, a sušena navodnjava. Primena ove tehnike je jednostavna. Teorijska osnova ovih metoda je u indukciji adaptivnih reakcija biljaka na sušu (Davies et al., 2000; Milošević et al., 2005)

Poseban problem za Srbiju je to što se nedostatak vlage u zemljištu, koji je u našim klimatskim uslovima naročito izražen u letnjim mesecima, javlja ne samo u sušnim već i u umereno vlažnim godinama. Deficit vlage u zemljištu iznosi 100-200mm, ređe preko 300mm godišnje. Trenutno stanje navodnjavanja u Srbiji je takvo da se intenzivno navodnjava manje od 1% poljoprivrednih površina koje su pogodne za navodnjavanje. Tekuće stanje istraživanja na nacionalnom nivou suše u Srbiji, kao i u mnogim zemljama, u poslednjim dekadama postaje sve veći problem, a klimatske prognoze ukazuju da će se taj negativan trend suše i dalje nastaviti.

Koncept ekonomičnog korišćenja postojećih vodnih resursa za potrebe poljoprivredne proizvodnje podrazumeva i povećanje efikasnosti u korišćenju vode od strane useva. To se može postići samo ako se poznaju potrebe gajenih biljaka za vodom i njihova otpornost na sušu. U Srbiji se u naučnim projektima nedovoljno proučavaju mehanizmi koji utiču na efikasnost iskorišćavanja vode koji su važni za otpornost biljaka na sušu iako bi oni mogli da pomognu u selekciji otpornih genotipova za potrebe gajenja biljaka u oblastima zahvaćenim sušom. Selekcija na sušu zbog kompleksnosti u reakcijama otpornosti biljaka nije dovoljno zastupljena, a naročito je aktuelna kod jarah kultura (kukuruz, soje, šećerne repe, suncokreta). Instituti iz UK, Danske i Portugala su među prvima počeli i sa praktičnom primenom znanja iz oblasti fiziologije stresa za potrebe prevazilaženja ili umanjenja efekata suše i selekcije otpornih genotipova (Lebreton et al., 1995).

Pregled istraživanja u svetu ukazuje koliko je složen problem suše, kao i na potrebu da se, po ugledu na druge razvijene zemlje, ovom problemu priđe multidisciplinarno.

Suša je abiotički činilac koji u najvećoj meri ugrožava prinose šećerne repe i u našim agroekološkim uslovima. Fiziološki, biohemijski i molekularni mehanizmi koji se u biljkama aktiviraju u uslovima nedostatka vode su zato predmet brojnih istraživanja. Definisanje najrelevantnijih kriterijuma za ocenu tolerantnosti prema nedostatku vode je veoma značajno za oplemenjivanje u cilju stvaranja genotipova koji bolje podnose ovaj abiotički stres. Smatra se da primena molekularnih metoda, zajedno sa klasičnim fiziološkim i anatomskim istraživanjima može dati najbolje rezultate. Od molekularnih metoda, na postojećem nivou saznanja o funkcionisanju genoma šećerne repe, najdirektniji pristup je ispitivanje upotrebljivosti pojedinih objavljenih sekvenci povezanih sa reakcijom biljaka na osmotski stres (kandidat gena) u cilju oplemenjivanja, pa je stoga taj metod primenjen u ovim istraživanjima.



## **1.6. Primena biljne biotehnologije u povećanju otpornosti biljaka prema nedostatku vode**

Biljna biotehnologija predstavlja proces u kome se koriste molekularne i citološke tehnike u cilju povećanja produktivnosti biljaka, poboljšanja kvaliteta biljnih proizvoda, sprečavanja šteta koje nastaju pod uticajem različitih biotskih i abiotskih stresova. U okviru biljne biotehnologije postoji i grupa metoda koja se naziva selekcija pomoću molekularnih markera (MAS - Marker Assisted Selection) i koja predstavlja kombinaciju metoda klasičnog oplemenjivanja i molekularnih istraživanja. Preduslov za uspešnost MAS je definisanje gena za koje se pretpostavlja da regulišu osobine od interesa i testiranje statističkih odnosa između markera i osobine od interesa. Tek kada je definisan marker koji je fizički lociran pored ili čak u genu od interesa moguća je marker asistirana selekcija poželjne osobine (Panković et al. 2004).

Lančana reakcija polimeraze (PCR) je metod koji omogućava selektivno umnožavanje određenog segmenta molekula DNK (Mullis et al., 1986). Preduslov za izvođenje reakcije je poznavanje strukture (sekvence) graničnih regiona željenog segmenta i posedovanje sintetskih jednolančanih oligonukleotida tzv. prajmera, koji su komplementarni ovim regionima. Reakcija se odvija na principu cikličnog ponavljanja replikacije molekula DNK, pri čemu se prajmeri vezuju za DNK matricu i služe DNK polimerazi kao mesto prepoznavanja za sintezu novih komplementarnih lanaca nukleotida. U prvom koraku PCR reakcije vrši se denaturacija DNK. Zatim u sledećoj fazi, hibridizaciji, par prajmera se specifično vezuje za komplementarne regione DNK, ograničavajući segment koji treba da bude amplifikovan. Povezivanje prajmera se odvija na temperaturi koja zavisi od sekvence prajmera, tj. redosleda nukleotida u njemu. Izbor optimalne temperature u ovoj fazi je od ključnog značaja za specifičnost PCR reakcije. Ukoliko je temperatura suviše visoka do hibridizacije uopšte neće doći, dok u slučaju suviše niske temperature dolazi do nespecifične hibridizacije prajmera sa samo parcijalno komplementarnim sekvencama DNK. Poslednja faza je faza ekstenzije prajmera. Na kraju ove faze se dobijaju dve kopije segmenta DNK koji je oivičen prajmerima. Reakcija se zatim ciklično ponavlja, a u svakom ciklusu kao matrice služe novosintetisani molekuli DNK. PCR-tehnika je široko rasprostranjena i primenjena je u ovom slučaju za utvrđivanje razlike u ekspresiji gena u listu koje se ispoljavaju kao reakcija na stres koji su povezani sa odgovorom biljaka na osmotski stres. Osim toga PCR tehnika se primenjuje i kod npr. umnožavanja ponavljajućeg motiva i detekcije

njegovog polimorfizma, kvantitativne analize prisustva genetske modifikacije u hrani, detekcije naslednih osobina, dijagnostikovanja bolesti, kloniranja gena itd.

## **2. CILJ RADA**

Cilj istraživanja je definisanje fizioloških i molekularnih parametara koji ukazuju na povećanu tolerantnost šećerne repe prema nedostatku vode. Time bi se bolje sagledala i shvatila biološka osnova agronomski važnog svojstva, tolerisanja abiotičkog stresa - suše, koristeći pri tom metode klasične i molekularne fiziologije biljaka, što bi dalo veoma korisne rezultate za unapređenje selekcije.

### **3. PREGLED LITERATURE**

#### **3.1. Tolerantnost šećerne repe prema nedostatku vode**

Biljke se prilagođavaju uslovima suše na različite načine. Razlikuje se tzv. genotipska i fenotipska otpornost na nedostatak vode.

Otpornije biljke na sušu, po pravilu imaju duži korenov sistem sa većom apsorpcionom površinom, jače razvijeno palisadno tkivo, deblju kutikulu, manji broj i ukupnu površinu stominih otvora, gušću mrežu provodnih sudova, imaju takođe i elastičniju protoplazmu, veći sadržaj vezane vode, više osmotski aktivnih materija, povećanu akumulaciju abscisinske kiseline, prolina i alanina. Što se tiče fenotipske otpornosti šećerne repe, neki od pokazatelja su: listovi veće sjajnosti, veća turgescencija lisnih drški i listova, lakše lomljivi i osetljiviji listovi na istežanje (Petrović i Stikić, 1992).

Mogućnosti za povećanje otpornosti prema suši su bile istraživane još davnih dana (1936) u istočnoj Evropi i Rusiji, ali istraživanja nisu dala neke primenljive rezultate (Knapp, 1958). Ovaj problem je ponovo počeo intenzivno da se istražuje tek od nedavno. Ustanovljeno je da postoji varijabilnost u odgovoru na vodni stres kod šećerne repe (Sadeghian et al., 2000; Ober i Luterbacher, 2002, Maksimović et al., 2004 i 2006), ali strukturni i morfološki adaptivni odgovori šećerne repe prema nedostatku vode još nisu u potpunosti razjašnjeni. Postoji veliki broj istraživanja koja se odnose na uticaj vremenskih promena na rast šećerne repe, sprovedene pod kontrolisanim uslovima, ili u pojedinačnim poljskim eksperimentima (Qi et al., 2005; Kenter et al., 2006).

Ako do stresa dođe u toku ranih faza rasta i razvića usporava se rast korena, što može da dovede do gubitka prinosa i za 46% (Noghabi i Williams, 2000). Ako do vodnog stresa dođe kasnije, smanjuje se lisna površina i rast pojedinačnih listova i time iskorišćavanje svetlosne energije. Nedostatak vode izaziva značajno povećanje koncentracija kalijuma i natrijuma, što otežava ekstrakciju šećera iz korena. Marschner et al. (1981) su ustanovili pozitivnu korelaciju između akumulacije natrijuma i hlora u listovima i tolerantnosti prema suvišku soli. Ovi odgovori biljaka na vodni stres se mogu delimično objasniti poremećajima do kojih dolazi u mineralnoj ishrani biljaka. Nedostatak vode zapravo može da uspori ili čak potpuno prekine usvajanje jona putem

korenovog sistema, dovodeći time i do poremećaja odnosa sadržaja pojedinih elemenata u biljnim tkivima pa eventualno i do ispoljavanja simptoma nedostatka. Negativan efekat kasnije nastalog vodnog stresa je manje izražen zato što su biljke već razvile korenov sistem i lisnu masu koja potpuno pokriva zemljište. Dobro razvijen korenov sistem povećava efikasnost usvajanja i iskorišćavanja vode, a time i sposobnost boljeg podnošenja nedostatka vode. Razlike u odgovoru na vodni stres primećene kod komercijalnih genotipova mogu biti rezultat razlika u razvijenosti korenovog sistema u dubljim slojevima zemljišta (Ober i Luterbacher, 2002). Ipak, prvi efekti vodnog stresa se ispoljavaju na listovima. Mali pad vodnog potencijala u listu je dovoljan da se značajno smanji razviće ukupne lisne površine. Nizak vodni potencijal pospešuje obrazovanje novih listova i istovremeno ubrzava starenje starijih listova. Stres uzrokovan sušom izaziva zatvaranje stoma, ograničava transpiraciju, i kao posledica se javlja povećavanje temperature lista. I zatvaranje stoma i toplotni stres smanjuju fotosintetski prinos (Salvucci i Crafts-Bradner, 2004). Stomin aparat šećerne repe je veoma osetljiv na promene vodnog statusa, i on se zatvara kada vodni potencijal opadne između -0,5 i -1,5 MPa (Milford i Lawlor, 1976). Manja gustina stoma je u korelaciji sa otpornošću prema vodnom stresu. Thomas i Clarke (1995) su ustanovili da tolerantniji genotipovi imaju manju gustinu stoma. Međutim, kako je gustina stoma u pozitivnoj korelaciji sa prinosom šećera pokušaj da se poveća tolerantnost biljaka putem selekcije na manji broj stoma mogla bi dovesti do smanjenja procenta šećera. Prema Luković et al. (2009) značajnija razlika između genotipova je utvrđena u procentu debljine adaksijalnog i abaksijalnog epidermisa i u procentu debljine palisadnog tkiva. Amfistomatični listovi imaju veći broj neznatno manjih stoma na abaksijalnoj strani. Prosečan broj stoma po mm<sup>2</sup> kreće se od 101 do 223 na adaksijalnom i od 138 do 229 na abaksijalnom epidermisu. Postoji slična genotipska varijabilnost kod svih posmatranih parametara adaksijalnog i abaksijalnog epidermisa. Ovi autori su pokazali da u odnosu na karakteristike epidermisa, najznačajnija genotipska razlika je u udelu adaksijalnog i abaksijalnog epidermisa. Stome su brojnije na naličju lista i njihova veličina i broj po mm<sup>2</sup> lisne površine u preseku na licu i naličju lista nije varijabilna. Veća gustina stoma i manja veličina stoma predstavlja oblik adaptacije na sušu, jer omogućava biljkama da efikasnije regulišu transport vode i transpiraciju (Fahn i Cutler, 1992; Dickison, 2000). Mala gustina stoma na listovima šećerne repe može da se dovede u vezu sa otpornošću na stres uzrokovan nedostatkom vode. Thomas i Clarke (1995), potvrđuju rezultate Visser-a (1951), koji je utvrdio da gustina stoma u rasponu

od 70 do 150 stoma po  $\text{mm}^2$  i da sorte sposobnije da tolerišu nedostatak vode imaju manju gustinu stoma. U uslovima suše, kada je turgorov pritisak negativan, male epidermalne ćelije sa zgusnutim zidovima pokazuju značajnu otpornost prema stresu (Fahn i Cutler, 1992).

Prema Joyce et al. (1983), u šećernoj repi malo smanjenje turgora ima veći efekat na ćelijske deobe nego na ekspanziju ćelija. Tražeći validne parametare u proceni pojedinih genotipova na tolerantnost prema suši, neophodno je uzeti u obzir povezanost velikog broja morfoloških i anatomskih karakteristika zajedno sa fiziološko-biohemijskim karakteristikama pojedinačnih organa u različitim fazama rasta i razvoja šećerne repe i u različitim stepenima i periodima nedostatka vode (Luković et al., 2009).

### **3.2. Hemijske reakcije šećerne repe na uslove stresa**

Biljke se odlikuju sposobnošću da se prilagođavaju na uslove suše i pomoću osmoregulacije (Jinyou Du et al., 2004). Rezultati Mc Cree i Richardson (1987) ukazuju da smanjenje vodnog potencijala u zemljištu prati opadanje osmotskih komponenti (0,8 kJ/kg-0,8 MPa), tako da se nulta vrednost turgora postiže pri vodnom potencijalu od -2,6 MPa.

Vodni stres kod šećerne repe izaziva nakupljanje osmoregulatornih supstanci kao što su betain, prolin i fruktani. Produkcija osmolita, te promena osmotskog pritiska pokazala se delotvornom u smislu tolerancije šećerne repe na abiotički stres. Još Wyn Jones i Storey (1981) su ukazivali na značaj betaina kao mogućeg osmolitika u listovima šećerne repe. Prolin i glicin betain mogu da omoguće zaštitu na više nivoa u ćelijama (Huang et al. 2010) i iz tog razloga su veoma aktuelni u genetskom inženjeringu s ciljem povećanja tolerancije na stres kod različitih biljnih vrsta (Nayyar, 2003, Rathinasabapathi 2000, DeRonde et al. 2000). Ove materije se često akumuliraju kao kompatibilni rastvori u biljkama (molekuli koji ne učestvuju u hemijskim reakcijama nego utiču na vodni potencijal ćelija) i nivo genske ekspresije nekih od relevantnih enzima takođe se povećava u skladu sa tim. Ovi molekuli igraju ulogu u održavanju turgora i osmotskog balansa, ali su takođe i uključeni u zaštitu ćelijske strukture od stresa, Conde et al. (2011). Prilagođavanje biljnog metabolizma stresnim uslovima je sortno specifično, različito i predmet je intenzivnih istraživanja (Qin et al, 2011). Nije, međutim, sasvim jasno da li biljke koje u uslovima nedostatka vode

nakupljaju ovakve supstance bolje tolerišu nedostatak vode ili ne (Ghoulam et al., 2002; Maksimović et al. 2004 and 2006; Yamada et al. 2005, Valliyodan i Nguyen. 2006).

### **3.3. Akumulacija prolina**

Vodni deficit je glavni faktor koji dovodi do akumulacije prolina u korenu šećerne repe. Nivo prolina otkriva trenutni stepen stresa biljaka, koji zavisi od snabdevenosti vodom (količine padavina i navodnjavanja), temperature, sorte šećerne repe i đubrenja azotom. Isti elementi određuju i akumulaciju glukoze i smanjenje prinosa useva. Izmenjeni stresni uslovi dovode do povećanja kvaliteta korena šećerne repe i bržeg oporavka ukoliko nedostatak vode nije uzrokovao veća oštećenja (Monreal et al., 2007).

Povećana snabdevenost azotom takođe dovodi do povećavanja nivoa prolina, delimično povećava indeks lisne površine (LAI) i pogoršava stres izazvan sušom. Pozitivna i značajna korelacija između sadržaja prolina i glukoze u korenu šećerne repe, ukazuje na odnos između odgovora na stres, katabolizma ugljenih hidrata, i akumulacije prolina i glukoze. Ovo je podržano efektom tretmana sa di-1-p-menthene (anti-transpirant) i sa DMDP (2,5-dihydroxymethyl-3, 4-dihydroxypyrrolidin, inhibitora glycosidase), što dovodi do smanjenog nivoa prolina u nenavodnjavanom korenu šećerne repe (sorta Klauđija) (Monreal et al., 2007).

Listovi biljaka su glavno mesto sinteze prolina. Gzik (1996) je ustanovio povećan nivo prolina u listovima šećerne repe kao odgovor na osmotski i stres izazvan zaslanjivanjem.

Ova jedinjenja, kao što su prolin i glukoze, ugrožavaju kristalizaciju šećera u fabričkom procesu proizvodnje i dovode do formiranja obojenih komponenti, na taj način smanjujući industrijski kvalitet korena repe (Campbell, 2002; Coca et al, 2004). Prolin je metabolit koji se u najvećoj meri akumulira pod stresnim uslovima (Delauney i Verma, 1993). Postoje oskudni podaci o nivou prolina u uskladištenom korenu šećerne repe, ali je poznato da prolin akumuliran u korenu šećerne repe kao i drugim vrstama biljaka, predstavlja odgovor na stres (Raymond i Smirnoff, 2002; Demiral i Turkan, 2005) .

Akumulacija prolina u korenu šećerne repe ima dve funkcije: prvu kao indikator stresa, a drugu kao jedinjenje azota koje smanjuje kvalitet korena. Oba stresna uslova i

višak N dovode do mobilizacije nakupljenih ugljenih-hidrata radi snabdevanja ćelija dodatnom energijom i ugljenikom za sintezu molekula čija je uloga u adaptaciji na uslove stresa i supstanci koje sadrže N, smanjujući pritom prinos saharoze i kvalitet korena (Monreal et al., 2007). Značaj akumulacije prolina u osmotskom prilagođavanju je još uvek diskutabilan i varira od vrste do vrste (Hoi et al., 2003). Maksimalna akumulacija prolina je utvrđena na kraju perioda rasta korena repe (Monreal et al., 2007).

Eksperimenti Liu i Zhu (1997) pokazuju da je akumulacija prolina simptom stresa izazvan povredom, a ne pokazatelj tolerancije na stres. Korelacija između stepena stresa i sadržaja prolina sugerise, međutim, da je akumulacija prolina koristan pokazatelj stresa kod šećerne repe (Iannucci et al 2000; Ain-Lhout et al 2001). Prolin može da deluje kao signalni molekul, da modifikuje funkcije mitohondrija, utiče na deobu ćelija i pokrene ekspresiju specifičnih gena, što može da bude od suštinskog značaja za oporavak biljaka nakon stresa (Al-Khayri, 2002; Szabados i Savoure, 2009).

### **3.4. Molekularni aspekti tolerantnosti prema suši**

Tehnološki napredak i imperativ da se osigura održiva proizvodnja hrane je usmerio istraživačke programe na poboljšanje genetski uslovljenih osobina gajenih biljaka uprkos veličini i složenosti genoma (hlebna pšenica je heksaploid sa 16 Gb (Feuillet et al, 2008.)). Oplemenjivanje s ciljem povećanja tolerantnosti na sušu dodatno komplikuje činjenica da nekoliko tipova abiotičkih stresova se često javljaju istovremeno u toku vegetacije, i tim pre pristup koji uključuje manipulacije grupom gena za tolerantnost prema suši ima veću šansu za rešavanje ovog kompleksnog problema. I neke osobine zemljišta, kao što su sastav i struktura takođe mogu da utiču na balans različitih stresova (Whitmore i Whalley, 2009).

Biljke šećerne repe u semiaridnim uslovima reaguju na vodni deficit prilagođavanjem na uslove suše raznim fiziološkim, biohemijskim, anatomskim, i morfološkim promenama, uključujući i promenu u ekspresiji gena. Postoje dva vida borbe biljaka sa nedostatkom vode: izbegavanje (u smislu sposobnosti biljaka da održe visok vodni potencijal tkiva u uslovima suše) i tolerantnost (u smislu sposobnosti biljaka da održe svoje normalne funkcije, čak i pri niskim vodnim potencijalima tkiva). Izbegavanje suše se obično postiže smanjenjem stomaterne provodljivosti, smanjenjem



lisne površine, razvojem jačeg korena i povećanjem odnosa koren/nadzemni deo (Levitt, 1980).

Procena relativnog doprinosa svakog gena za tolerantnost prema dehidraciji i eliminisanje onih koji ne utiču na tolerantnost prema stresu je veliki izazov. Svi transgeni pristupi koriste pojedinačne gene koji dovode do marginalne tolerancije prema stresu. Dakle, buduća istraživanja trebalo bi da budu fokusirana na skupove gena kako bi došlo do ispoljavanja kvantitativnih osobina koje su posledica ekspresije više gena, u uslovima suše. Metabolički inženjering osmolitičkih puteva bio je uspešan za određene modele biljaka izloženih stresu.

Imajući u vidu kompleksnost genetičke kontrole tolerantnosti na sušu (multigenetsku, nižu heritabilnost i visoke interakcije genotipa i sredine), selekcija podržana markerima nije značajno doprinela poboljšanju sorti za uslove suše i oplemenjivanje se zato do sada oslanjalo na direktne fenotipske selekcije (Fleury et al., 2010).

Iako je prinos osnovni cilj oplemenjivača, veoma je teško precizno predvideti mogućnost iskorišćenja vode i identifikovati kandidat-gene za dalje kloniranje. Nekoliko istraživanja je identifikovalo QTL-e (Quantitative trait locus) povezane sa specifičnim komponentama odgovora na sušu. Iako bi razvoj molekularnih markera i sekvenciranje genoma trebalo da ubrza poziciono kloniranje (Collins et al, 2008.) oblasti genoma povezane sa individualnim QTL-ima su još uvek veoma velike i obično nepogodne za skrining u selekcionom programu.

Tokom proteklih nekoliko godina bilo je nekoliko opsežnih mapiranja usmerenih na sušu i lokuse za toleranciju prema ostalim abiotičkim stresovima u sredinama sa niskim prinosom. Međutim, uprkos ovim značajnim istraživačkim naporima jedini markeri koji su pronašli svoj praktični smisao u oplemenjivanju biljaka su oni za toleranciju na bor i aluminijum (Brdar-Jokanović, 2010; Gupta et al., 2010).

Pokazalo se da je neophodno da se definišu fiziološki idiotipovi za bolji prinos pod uslovima vodnog deficita, identifikuju izvori varijacije ovih osobina i uvedu te osobine u elitne sorte (Reynolds et al., 2009; Richards et al., 2010). Iako je ovaj pristup prihvaćen već nekoliko decenija, susreo se sa vrlo ograničenim uspehom. Prema rezultatima ovih autora upotreba ugljenikovih izotopa verovatno jedina može da bude prihvatljiva metoda i da omogući stvaranje novih, perspektivnijih sorti.

Adaptacija biljaka na sušu je složen proces, koji uključuje mnogo promena, ne samo smanjenje rasta. Na ćelijskom nivou to podrazumeva, regulaciju početka sinteze

proteina (npr.  $H^+$  pumpi i  $Na^+/H^+$  antiportera), povećanje nivoa antioksidanata, prolazno povećanje koncentracije ABA, redukciju puteva energetske potrošnje, kao i akumulaciju odgovarajućih rastvora i zaštitnih proteina (Bartels i Sunkar 2005, Chaves et al. 2009). Sve ove promene na ćelijskom nivou su od velike važnosti za očuvanje homeostaze jona nakon neravnoteže izazvane abiotičkim stresom (Conde et al., 2011).

Vodni deficit deluje na rast korena, vodni režim, transpiraciju i rast nadzemnog dela te na kraju određuje i potencijal prinosa. Mehanizmi kojima se reguliše rast i funkcionisanje korena i nadzemnog dela pod uticajem vodnog deficita u zemljištu, integrisani u ceo biljni matabolizam, izazivaju veliko interesovanje istraživača (Neumann, 2008). Posebno je atraktivna hipoteza da koren može da registruje deficit vode u rizosferi i potom indukuje odgovarajuće adaptivne mehanizme za prenos hemijskih, hidrauličkih ili električnih signala ka nadzemnom delu. Istraživanje identiteta stresom indukovanih signala iz korena, i njihov uticaj na zatvaranje stoma i / ili inhibiciju rasta nadzemnog dela, može da predoči nove pristupe u regulaciji odgovora cele biljke na sušu. Na primer, ABA, može da inhibira otvaranje stoma i eventualno rast lišća pod uticajem vodnog stresa, prisutna je u ksilemskom soku koji se transportuje iz korena do nadzemnog dela biljaka tokom transpiracije. Pored toga, koncentracija ABA u ksilemu može da se poveća, kao odgovor korena na deficit vode. Tako, transport kroz ksilem uslovljen ABA signalima poreklom iz korena (verovatno modifikuje pH ksilema i nivo nitrata) smatra se osnovnim uzročnikom promena u nadzemnom delu usled nedostatka vode u korenu (Davies i Zhang, 1991; Wilkinson i Davies, 2002; Davies et al., 2005). Međutim, sve veći broj dokaza ukazuje na to da su, u mnogim slučajevima, hidraulički signali verovatnije odgovorni za prenošenje signala o pojavi suše iz korena u nadzemni deo, nego ABA poreklom iz korena. Na primer, brzo opadanje elastičnosti ćelijskog zida u listu i rast lista kod sejanaca kukuruza izazvano je deficitom vode u korenu (koren gajen na podlozi koja sadrži PEG-6000 i čiji vodni potencijal iznosi -0.5 MPa). Inhibicija rasta predstavlja odgovor korena na vodni deficit, čak i kada je tkivo korena uginulo, odnosno kada nije moguće da se ustanovi da se hormoni ili električni signali prenesu do lišća (Chazen i Neumann, 1994). Hidraulični signali iz korena izloženog stresu, u obliku povećanog osmotskog pritiska u ksilemu, utiču na indukciju razvoja listova. Nivoi ABA u zonama izduživanja lista kukuruza su povećani usled vodnog stresa (Chazen et al, 1995.). U eri brzog napretka u identifikaciji i karakterisanju kompletnih setova genoma biljke, proteina, transkripata, metabolita, kao i njihovih interakcija, i biološkog sistema dolazi se do otkrića koje omogućava bolje razumevanje

i manipulaciju fiziološkim odgovorima na vodni deficit (Neumann, 2008). Takva istraživanja mogu da omoguće stvaranje novih sorti koje su tolerantnije na sušu.

Primena molekularnih metoda u proučavanju vodnog stresa kod šećerne repe još nije dovoljno razrađena, ali rezultati koji su postignuti kod drugih biljnih vrsta ukazuju da se može očekivati značajan napredak u ovoj oblasti (Tuberosa i Salvi, 2006). Achard et al. (2006) su utvrdili da su DELLA proteini lokalizovani u jedru uključeni u opšti mehanizam odgovoran za inhibitorno integrisanje rasta biljaka. U skorije vreme, Đaković-Petrović et al. (2007) su pokazali da su DELLA proteini takođe uključeni u regulaciju rasta uzrokovanu ekološkim promenama kod odraslih biljaka. Cilj korišćenja molekularne manipulacije je da se smanji stepen inhibicije rasta biljaka pod umerenim vodnim deficitom, kako bi se razjasnili faktori povezani sa ekspresijom DELLA gena.

Suša koja se javi kod listova zahvaćenih procesom starenja nije u direktnoj vezi sa prekidom vegetativnog rasta, ali to može biti korisno za prenos hranljivih materija iz listova ka semenu u razvoju u sušnom periodu (Yang i Zhang, 2006; Foulkes et al, 2007). Nasuprot tome, prerana indukcija procesa starenja lista tokom vegetacije usled izloženosti povremenim epizodama suše postepeno će ograničiti fotosintetski kapacitet i dovesti do uginuća lista. U poslednjoj fazi razvoja, Rivero et al. (2007) su povezali promotor za sušu (SARK, starenje, povezano receptorima protein kinaze) sa IPT-genom koji inicira sintezu citokinina. Za citokinine se zna da inhibiraju starenje lista. Model je primenjen na biljkama duvana. U eksperimentu u sudovima, dve treće generacije linija koje su bile transgene su bolje preživle i rasle pod povremenim vodnim deficitom od divljih vrsta biljaka (Neumann, 2008). Pored toga, nije ustanovljen ni negativni uticaj na razvoj kod dobro zalivanih transgenih biljaka. Ostaje da se vidi da li na sličan način IPT gen može da funkcioniše i u poljskim uslovima.

Funkcije transkripcionog faktora (TF) kod abiotičkog stresa su, od kraja prošlog veka, dobile veliku istraživačku pažnju. Zahvaljujući tehničkim dostignućima u otkrivanju diferencijalne ekspresije gena, identifikovani su geni koji se aktiviraju usled višestrukih stresnih uslova. U ovim istraživanjima, slična ekspresija predviđa kontrolu jednostavnim cis promotor elementima. Molekularna manipulacija CBF/DREB1 gena putem bioinženjeringa bi u budućnosti mogle da se koriste za poboljšanje tolerancije biljaka na stres (Celebi-Toprak et al. 2005, Oh et al. 2005, Behnam et al. 2006, Ito et al. 2006).

Druga podgrupa AP2/ERF TF familije obuhvata DREB2 proteine, koji su izolovani zajedno sa DREB1 u kvascu (Liu et al. 1998). Postoji osam gena u ovoj

podgrupi u *Arabidopsis* genomu (Sakuma et al., 2002). Za razliku od DREB1 gena, ekspresija DREB2A je veoma potaknuta visokim salinitetom i sušom, a mnogo manje hladnoćom. Smatra se da je ekspresija DREB2A proteina pod normalnim uslovima razvoja, a aktivira se pod uticajem osmotskog stresa kroz posttranskripcionu modifikaciju u ranim fazama kao odgovor na osmotski stres.

Hiperprodukcija na konstitutivno aktivnoj formi DREB2A (DREB2A-CA), proteina u biljkama izaziva povećanje ekspresije određenog broja gena odgovornih za stres uzrokovan vodnim deficitom, kao i poboljšanu tolerantnost na sušu kod transgenih biljaka (Sakuma et al., 2006).

Pod stresnim uslovima, monosaharidi, disaharidi i trisaharidi i alkoholi akumuliraju se u biljkama, a nivo ekspresije gena koji kodiraju neke od relevantnih enzima takođe se povećava u skladu sa tim. Stres usled deficita vode uzrokuje sintezu i akumulaciju ABA u biljnim ćelijama, a ustanovljeni su i odgovarajući geni za to. Većina tih gena sadrži zaštićene i ABA odgovarajuće, cis-aktivacione elemente u promotorima nazvane Abre (ABA-responsive element, PiACGTGG / TC) (Yamaguchi-Shinozaki i Shinozaki 2005, Yamaguchi-Shinozaki i Shinozaki 2006, Nakashima et al. 2009).

Utvrđeno je da TF geni takođe mogu da saopšte signale stresa vezivanjem sa početkom reakcije na dehidrataciju 1 (ERD1) gen promotora (Tran et al 2004, Tran et al. 2007). Inspirisani istraživanjima na *Arabidopsis*-u, istraživači su takođe analizirali NAC familiju gena, te funkcije gena TF pirinča. OsNAC6 je indukovano od strane oba ABA i stresa izazvanog povišenom koncentracijom soli. Ekspresija OsNAC6 gena povećava toleranciju biljaka na sušu, soli i neke bolesti (Nakashima et al., 2007). Hu et al. (2006) su zaključili da su dva druga NAC gena, SNAC1 i SNAC2, povećali otpornost biljaka prema suši i salinitetu. SNAC1 transgeni su testirani pod intenzivnim uslovima deficita vode, i pronađeno je da imaju oko 30% veću klijavost semena od divljeg tipa biljaka.

Otkriće regulatorne uloge TFS u stres-indukovanoj genskoj ekspresiji ukazuje kako je kontrolisana ekspresija OFA seta gena. Osim toga, pojedina istraživanja su usmerena na to kako se signal prenosi sa jednog molekula na drugi, iz citosola do jedra. Većina transdukcionih signala dolazi preko proteinskih modifikacija, poput fosforilacije, ubikvitina i sumoilatina. Reverzibilne post-translacione modifikacije igraju ulogu u ovim procesima. Istorijski gledano, najproučavanija modifikacija proteina je fosforilacija, međutim, i ostale vrste su veoma zastupljene, kao što su ubikvitination i

sumoilation. Ove vrste modifikacija proteina regulišu aktivnost ključnih TFS u biljkama pod abiotičkim stresom. Fosforilacije kaskada regulisane protein kinazama i fosfatazama prenose signale stresa i prilagođavaju cilj aktivnosti datog proteina. SnRK2C/SnRK2.8 i SnRK2F/SnRK2.7 su nedavno pokazali da imaju ulogu u regulisanju ekspresije gena prema suši (Mizoguchi et al., 2010). Ispravna regulacija ekspresije gena je veoma važan proces u biljnim ćelijama, jer kontroliše kada i gde je gen aktivan, a to je od suštinskog značaja za normalan rast i odgovore na stimulanse. Ekspresija mnogih DREB2A ciljnih gena se odlaže u odgovoru na stres usled dehidracije. Međutim, u drip1-1-1 i drip2 jedno i dvostrukim mutantima, te genske ekspresije su intenzivnije nego kod divljih vrsta, a DREB2A protein je stabilniji. Ovo otkriće sugerise da DRIP1 i DRIP2 funkcionišu kao negativni regulatori u adaptaciji biljaka prema suši za razliku od posredovanja u proteolizi DREB2A. Smatra se da DRIP1 i DRIP2 degradiraju ekspresiju DREB2A pod normalnim uslovima kako bi minimizirali negativne efekte ovog proteina na rast biljaka (Qin et al., 2008).

Veliki napredak u razjašnjavanju odgovora biljaka na abiotički stres je napravljen u poslednjoj deceniji (Qin et al., 2011). Još je nerazjašnjeno, između ostalog, da li postoje receptori ABA. Iako GTG1 / GTG2 proteini ukazuju da su membranski vezani ABA receptori, njihove biološke uloge u ABA transdukcijom signalu ostaju nepoznate. Pored ABA percepcije, procesi biosinteze ABA, transport, skladištenje i promet, kao odgovor na abiotički stres nisu u potpunosti jasni. Studije o transkripcionom faktoru otkrivaju složenost i pleiotropske funkcije u oba odgovora biljaka na stres i razvoj (Kanaoka et al., 2008). Ključne komponente u osnovi stresa i razvoja tek treba da budu razjašnjene (Qin et al., 2011).

Osim toga, interakcije između ABA i drugih fitohormonskih signala treba da budu bolje objašnjene. Sa brzim razvojem genomske tehnologije i statističkim analizama, postoji povećan interes za korišćenje strategije mapiranja za identifikaciju gena u osnovi kvantitativnih ili kompleksnih osobina koji imaju poljoprivredni ili evolucionni značaj (Qin et al., 2011). Korišćenje sekvenci genoma i informacija pojedinačnog nuklearnog polimorfizma (SNP), mapiranje bazirano na povezivanju neekvilibriranih analiza prirodno varijabilnih populacija može da reši kompleksne osobine na nivou sekvence i genoma (Zhu et al., 2007). Istraživanja genomskih skupina (GWAS) pokazala su se kao dobra komplementarna alatka za tradicionalna biparentalna ukrštanja i strategije mapiranja. GWAS od 107 fenotipova *Arabidopsis*-a koristeći 191 različit genotip su obezbedili kandidat gene za dalje studije (Atwell et al., 2010). Huang

et al., 2010 sekvencionisali su 517 genoma linija pirinča, obuhvatajući i sprovodeći GWAS za 14 agronomskih osobina, uključujući i otpornost prema suši. Još jedan veliki izazov je kako primeniti znanje na poboljšanje tolerancije useva na uslove stresa. Klasična genetika ukazuje na to da je tolerancija biljka prema abiotičkom stresu kontrolisana od strane više lokusa, i svaki doprinosi neznatnom efektu gena (minor geni), dakle, manipulacija glavnim regulatornim genima, biotehnološkim metodama, se smatra efikasnijom od konvencionalnih strategija selekcije u kojoj je teško razdvojiti negativnu vezu mnogo lokusa u jednom trenutku. Ipak, i dalje postoji veliki jaz između osnovnih istraživanja i stvaranja useva tolerantnih na stres. Standardni testovi, uključujući skrining metode, razlikuju se od *Arabidopsis*-a zavisno od vrste useva. Odgovarajuće procene tolerancije useva na uslove stresa treba da budu uspostavljene u skladu sa aktuelnim zahtevima poljoprivredne proizvodnje. Neki pionirski radovi su izvršeni u stvaranju biljaka tolerantnih na stres i testiranih u polju, kao što je transfer ZmNF-YB2 i NF-Y gena, kod transgenog kukuruza, i upotreba SNAC1, NAC-tip TF kod pirinča, s ciljem poboljšanja tolerancije na sušu (Hu et al., 2006, Nelson et al., 2007). Ova vrsta istraživanja je dragocena ne samo zato što je usmerena na poljoprivredno važne kulture već i zato što procenjuje poboljšane osobine pod stvarnim proizvodnim poljskim uslovima. Potencijal prinosa je primarna briga proizvođača. Međutim, postoji problem između visokog prinosa i tolerancije na stres. Strategijama koje prostorno i vremenski ograničavaju transgene ekspresije korišćenjem specifičnosti tkiva i stres-indukovanih promotora (Sakuma et al. 2006a, Nakashima et al. 2007) potrebno je omogućiti kombinaciju tolerancije na stres sa visokim potencijalom rodnosti, izbegavajući negativne efekte gena stresa na rast biljaka pod povoljnim uslovima. Alternativno, nekoliko osobina, poput jakog korenovog sistema, visoke efikasnosti korišćenja vode i fleksibilnog osmotskog prilagođavanja, može se integrisati sa potencijalom prinosa. Da bi se postigla kombinacija visokog prinosa i tolerancije prema stresu u jednoj sorti neophodno je uspostaviti vezu kompatibilnosti razvoja individualnih osobina i međusobne reakcije. Saradnja među biljnim molekularnim biolozima, fiziolozima i selekcionerima je obavezna. Prethodni radovi u pogledu identifikacije gena i funkcionalne karakterizacije je izvršena od strane molekularnih biologa, fotosintetski gubici, pokreti stoma i osmotska prilagođavanja u stresnim reakcijama su tema za stručnjake iz fiziologije biljaka. Prikupljanje izvora tolerantnosti i procenu treba da vrše selekcioneri. Transformacija i povezivanje znanja u krajnjem proizvodu zahteva njihovu usku saradnju (Qin et al., 2011).

## **4. MATERIJAL I METOD RADA**

### **4.1. Biljni materijal**

Istraživanja su sprovedena na jedanaest genotipova (označeni od 1 do 11) šećerne repe (*Beta vulgaris* ssp. *vulgaris*, L.) iz kolekcije genotipova Odeljenja za šećernu repu, Instituta za ratarstvo i povrtarstvo u Novom Sadu. Odabrani genotipovi su u poljskim uslovima ispoljili razlike na osnovu opservativnog testa nivoa tolerantnosti prema suši i podeljeni u 3 grupe: netolerantni (genotipovi 2, 5, 6 i 8), srednje tolerantni (3, 7, 9 i 11), i tolerantni (1, 4 i 10) (tabela 4.1.).

Tabela 4.1. Preliminarna ocena tolerantnosti na sušu u poljskim uslovima (0-5; 0-osetljiv, 5-tolerantan)

Genotip	Ocena u polju
1	5
2	2
3	4
4	5
5	2
6	0
7	4
8	2
9	4
10	5
11	4

### **4.2. Eksperimentalne metode**

Eksperiment je postavljen u stakleniku Instituta za ratarstvo i povrtarstvo Novi Sad na Rimskim Šančevima, a laboratorijske analize su sprovedene na Poljoprivrednom fakultetu, Univerziteta u Novom Sadu i u Institutu za ratarstvo i povrtarstvo Novi Sad, Odeljenje za šećernu repu.

### **4.3. Eksperiment u polukontrolisanim uslovima**

#### **4.3.1. Gajenje biljaka**

Biljke šećerne repe su posejane u stakleniku, u supstrat koji je bio Potgrond H (Klasmann), pomešan sa rečnim peskom u zapreminskom odnosu 17,5:1 u plastične kadice 31x37x13 cm, 12 biljaka. Tokom 90 dana vlažnost zemljišta je održavana na nivou od 80% PVK. Nakon 90 dana vršeno je merenje dnevne potrošnje vode tako što je merena masa kadica sa biljkama pre i posle zalivanja tokom tri dana i zalivanje je vršeno u skladu sa evapotranspiracijom. Biljke su tada bile u fazi 6-12 listova u lisnoj rozeti. Nakon toga je izazvan vodni deficit prestankom zalivanja, dok je kod kontrolnih biljaka zalivanje nastavljeno. Pet dana po prestanku zalivanja uzeti su uzorci biljnog materijala za analizu fizioloških i molekularnih parametara.

#### **4.3.2. Fiziološki parametri**

Za eksperiment su odabrani parametri za koje se smatralo da bi mogli da ukazuju na razlike u reakciji genotipova na nedostatak vode. Ispitivani su sledeći parametri:

- a) sadržaj vode / suve materije u zemljištu
- b) sadržaj vode / suve materije u biljnom materijalu
- c) relativan sadržaj vode (RWC)
- d) parametri fluorescencije hlorofila ( $F_0$ ,  $F_m$ ,  $F_v$ ,  $F_v/F_m$  i  $t_{1/2}$ )
- e) koncentracija slobodnog prolina
- f) broj listova

Sa ciljem utvrđivanja genotipskih razlika, kod kontrolnih uzoraka su takođe određivani

- g) lisna površina
- h) koncentracija pigmenata hloroplasta.

Sve analize su rađene u tri ponavljanja izuzev merenja parametara fluorescencije hloroplasta gde su merenja vršena u 9 ponavljanja.



### a) Sadržaj vode / suve materije u zemljištu

Uzorci zemlje mase 100-150g su uzeti iz posuda u kojima su gajene biljke u polukontrolisanim uslovima i sušeni su do konstantne mase u sušnici na temperaturi 105-130°C. Vlažnost zemljišta je izračunata pomoću obrasca:

$$\% \text{ vlažnosti zemljišta} = \frac{m_{vl} - m_{suv}}{m_{vl}} * 100, \text{ (Ćulafić i sar., 1992).,}$$

$m_{vl}$ -masa uzorka pre sušenja

$m_{suv}$ - masa uzorka nakon sušenja

### b) Sadržaj vode / suve materije u biljnom materijalu

U biljnom materijalu % suve materije je određen tako što su uzorci sušeni u sušnici do konstantne mase na temperaturi od 105-130°C.

Sadržaj suve materije u različitim organima (koren, stablo, list) je izračunat pomoću obrasca :

$$\% \text{ suve materije} = 100 - \frac{m_{vl} - m_{suv}}{m_{vl}} * 100,$$

$m_{vl}$ -masa uzorka pre sušenja,

$m_{suv}$ - masa uzorka nakon sušenja

### c) Relativan sadržaj vode (RWC)

Relativan sadržaj vode (RWC) predstavlja procenat trenutne količine vode u biljnom tkivu u odnosu na količinu vode u potpuno turgescentnom istom tkivu. On se određuje na osnovu trenutnog sadržaja vode u biljnom tkivu, maksimalnog sadržaja vode (dobijenog kvašenjem tkiva) i sadržaja suve materije.

Kružnim nožem je isečeno 15 diskova lista i izmerena im je masa. Isečci su potopljeni u posudu sa destilovanom vodom i ostavljeni 3-4 časa. Višak vode sa površine listova je otklonjen filter hartijom, a potom je merena masa isečaka. Isečci su sušeni u sušnici do konstantne mase na temperaturi od 105-130°C do apsolutno suvog stanja (Maksimović i Pajević, 2002).

RWC je izračunat prema obrascu:

$$\text{RWC} = \frac{\text{masa isečaka na početku ogleda} - \text{masa apsolutno suvih isečaka}}{\text{masa isečaka potpuno zasićenih vodom} - \text{masa apsolutno suvih isečaka}}$$

#### **d) Parametri fluorescencije hlorofila ( $F_0$ , $F_m$ , $F_v$ , $F_v/F_m$ i $t_{1/2}$ )**

Efekat stresa izazvan nedostatkom vode utiče na inhibiciju transporta elektrona kroz PSII.

Očitani su parametri:  $F_0$ ,  $F_m$ ,  $F_v$ ,  $F_v/F_m$  i  $t_{1/2}$  pomoću stres metra (PSM, BioMonitor S.C.I. AB). Na osnovu vrednosti  $F_v/F_m$  upoređeni su genotipovi prema fotosintetskim karakteristikama. PSM hlorofil fluorimetar beležio je parametre brzine gašenja fluorescencije sa listova koji su prethodno adaptirani na uslove mraka. Uz pomoć crnih kiveta koje su postavljene kao lake štikaljke zamračeni su delovi liski sa kojih je kasnije merena kinetika indukcije fluorescencije. Listovi su adaptirani na mrak ~15 minuta što je dovoljno da svi reakcioni centri u fotosistemu II budu otvoreni. Svetlost (drugog stepena (postoji 4) koja odgovara kvantu svetlosti magnetnog polja od  $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) je dovedena do kivete na površini liske svetlosnim vodičem i istovremeno svetlost poreklom od fluorescencije hlorofila se drugim optičkim vlaknom vodi do fotodetektora koji je povezan sa strujnim pojačivačem.

#### **e) Koncentracija slobodnog prolina**

Otpornost genotipova prema uslovima suše i osmotskog stresa ceni se i prema sposobnosti nakupljanja slobodnog prolina (Taylor, 1996). Određivanje koncentracije slobodnog prolina vršeno je kod biljaka gajenih u *in vitro* i u *in vivo* uslovima (Bates, 1973). Odmeren je 1g svežeg biljnog materijala koji je potom homogenizovan u prisustvu 10ml 3% sulfosalicilne kiseline. Homogenat je potom profiltriran. Napravljena je reakciona smeša (2ml filtrata, kiselog ninhidrinskog reagensa i glacijalne sirćetne kiseline). Reakcija je nastavljena u vodenom kupatilu, 15 minuta na  $100^\circ\text{C}$ . Epruvete su zatim premeštene na led da bi se reakcija prekinula. Bojeno jedinjenje je ekstrahovano toluolom (4ml) da bi se slojevi razdvojili. Kad je rastvor doveden na sobnu temperaturu sloj toluola je prenešen u kivetu za spektrofotometrisanje. Vrednosti su očitane na spektrofotometru Beckman, USA Duferies 60, na  $\lambda=520 \text{ nm}$ . Dobijene vrednosti su očitane sa standardne krive kao koncentracija prolina u  $\mu\text{g}$  u 2ml rastvora. Sadržaj prolina je izračunat na osnovu obrasca:

$$\text{Sadržaj prolina} = \frac{X \cdot 5}{\text{odvaga u g}} (\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \text{ sveže mase})$$

gde je X – koncentracija prolina očitana sa standardne krive u  $\mu\text{g}$  prolina u 2ml

5 – razblaženje pri ekstrakciji (1g u 10 ml, i od toga je 2 ml uzeto za reakciju i dalje ekstrahovanje toluolom)

#### f) Lisna površina

Lisna površina (LP) je izmerena automatskim fotoelektričnim meračem LI-3000 (LI-COR, USA).

#### g) Koncentracija pigmenata hloroplasta (hl a, hl b, car, hl a+b)

Za analize su korišćeni najmlađi potpuno razvijeni listovi biljaka kontrolnog tretmana. Određivanje koncentracije pigmenata hloroplasta vršeno je merenjem apsorpcije svetlosti na spektrofotometru Beckman, USA Duferies 60 pri odgovarajućim talasnim dužinama (662, 644 i 440 nm) (Wellburn, 1994) u acetonskom ekstraktu. Svakoj vrsti pigmenata u acetonskom ekstraktu odgovaraju specifični molarni apsorpcioni koeficijenti (Holm, 1954; Wettstein, 1975).

Koncentracije pigmenata su određene na osnovu sledećih obrazaca:

- koncentracije pigmenata u acetonskom rastvoru (mg/l):

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

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

$$C_{kar} = 4.695 \cdot A_{440} - 0.268 \cdot (C_a + C_b)$$

$$C_{a+b} = 5.134 \cdot A_{662} + 20.436 \cdot A_{644}$$

A=očitanje apsorbanace na spektrofotometru; 9.784, 0.990, 21.426.....=molarni apsorpcioni koeficijent (Holm, 1954)

- koncentracija pigmenata ( $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$  mase svežeg lista):

$$C = \frac{C_x \cdot V \cdot R}{m \cdot 1000}$$

C - koncentracija pigmenta u listu;  $C_x$  ( $HI_a$ ,  $HI_b$ , kar) - koncentracija pigmenta u ekstraktu ( $mg\ dm^{-3}$ ); V - zapremina ekstrakta (25 ml); R - faktor razblaženja (ukoliko je ekstrakt razblažen pre očitavanja apsorbance); m - masa uzorka u g, 1000 - faktor za prevođenje g u mg;

#### **4.4. Eksperiment u uslovima *in vitro***

Za svih 11 genotipova šećerne repe određen je i sadržaj slobodnog prolina na način kako je prikazano u odeljku 4.3.2.e) iz uzoraka dobijenih kulturom tkiva.

Na sledeći način su genotipovi šećerne repe gajeni u uslovima *in vitro*: semenske testiranih genotipova su potopljene 30 minuta u 1 M NaOH, a zatim su ispirane 30 minuta u destilovanoj vodi. Po skidanju periderma u Petrijevim kutijama, seme je prebačeno u vegeglas u 70% alkohol u trajanju od 3 minuta. Alkohol je potom oceden i sipana je 2x destilovana voda, a potom je seme zasejano u podlogu za mikropropagaciju (Mezei et al., 2006). Korišćena je MS osnovna podloga (Murashige and Skoog, 1962) sa 0.3 mg/l BA (benzil adenin) i 0.01 mg/l GA<sub>3</sub> (giberelinska kiselina). Svake tri nedelje je rađena subkultivacija sa ciljem dobijanja dovoljnog broja aksilarnih izdanaka (64), podjednake veličine. Dobijeni aksilarni izdanci su postavljeni na podlogu za mikropropagaciju sa 0%, 3% i 5% polietilen glikola (PEG 6000, Duchefa, Holandija) na kojoj su gajeni četiri nedelje, a potom su vršene analize.

Određivana je sveža masa izdanaka, sadržaj suve materije i koncentracija slobodnog prolina. Tokom ispitivanja uzorci su čuvani u klima komori na temperaturi 21 – 23°C, sa fotoperiodom 16 h svetlo i 8 h mrak.

#### **4.5. Analiza promena u ekspresiji gena povezanih sa vodnim režimom**

U ovom eksperimentu ispitivane su promene u ekspresiji gena u listovima šećerne repe uzetim pet dana nakon prestanka zalivanja. Kandidat geni su odabrani iz literature (Tabela 4.5.).

#### **4.5.1. Ekstrakcija genomske DNK**

Genomska DNK je ekstrahovana (Shure et al., 1983) iz 1g tkiva listova uzetih iz biljaka kontrolne grupe. Odmereni materijal je ekstrahovan sa 1,5 ml izolacionog pufera (4M NaCl; 1M TRIS pH 7.5; 0.5M EDTA; 5% Na-lauril sarcosine; 20% SDS); 1.5 ml 10M uree; 150  $\mu$ l fenola uz dodatak 3ml fenol/hloroforma, pH 8. Nakon centrifugiranja 7 min na 3000 rpm, DNK je istaložena dodavanjem 0.7 vol izopropanola. Posle centrifugiranja talog DNK je ispran i rastvoren u TE8. Kvalitet izolovane DNK je proveren merenjem optičke gustine na 260, 280 i 230 nm (Beckman, USA Duferies 60 spektrofotometar).

#### **4.5.2. Ekstrakcija informacione RNK**

Informaciona RNK je ekstrahovana iz 100 mg najmlađih potpuno razvijenih listova šećerne repe izložene tretmanu kao i kontrolnih biljaka. Korišćen je Quiagen 74904 kit za ekstrakciju RNK iz biljnih tkiva (RNeasy Plant Mini Kit 50). Ekstrakcija iRNK je izvedena prema uputstvu proizvođača. Kvalitet iRNK i koncentracija su određeni merenjem optičke gustine kao što je opisano kod ekstrakcije genomske DNK. Izolovana iRNK je tretirana DN-azom da bi se eliminisala DNK koja je eventualno koekstrahovana tokom izolacije iRNK. Reakcija je izvedena na sledeći način: 3  $\mu$ l iRNK koncentracije 5  $\mu$ g/ml tretirano je sa 7  $\mu$ l reakcione mešavine (tabela 4.2).

**Tabela 4.2.** Sastav reakcione mešavine za tretman DN-azom

komponente	$\mu\text{l}$
pufera (za DN-azu)	1
RNK sin	0.5
Dnase I	0.5
vode Rnase free	5

#### 4.5.3. Sinteza cDNK

Sinteza cDNK je urađena korišćenjem Applied biosystem 4368814 kita (High-Capacity cDNA reverse Transcription Kits) za reverznu transkripciju. Sinteza cDNK je izvedena prema uputstvima proizvođača. Reakcija reverzne transkripcije se odvijala 10 min na 25°C, 120 min na 37°C, a zatim 5 sek na 85°C.

#### 4.5.4. Amplifikacija kandidat gena

Dobijena cDNK je korišćena kao matrica u PCR reakcijama sa specifičnim prajmerima. Sastav PCR miksa je prikazan u tabeli 4.3.

**Tabela 4.3.** Komponente za pravljenje PCR miksa

Komponente	koncentracija	$\mu\text{l}$
Taq. Polimerase	1 u/ $\mu\text{l}$	0.2
Taq. Puf. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$		2
$\text{MgCl}_2$	25 mM	1.2
BSA	1 mg/ml	1
Pr 1	10 pmol/ $\mu\text{l}$	2
Pr 2	10 pmol/ $\mu\text{l}$	2
dNTP mix	1,25 mM	2
voda		7.8
cDNK		2

**Tabela 4.4.** Uslovi amplifikacije za specifične prajmere (temperature navedene u tabeli 4.5.)

korak	Temp °C	Vreme
1	94	5 min
2	94	20 sek
3	60/58/54	30 sek
4	72	30 sek
5	72	5 min
6	4	∞

} 35 ciklusa

Produkti reakcija su razdvajani na 1.8 % agaroznom gelu.

Kao standard (M) je korišćena SERVA DNK Standard 100bp DNK lestvica.

Jedanaest odabranih kandidat gena su homologe probe (BI096135, BI543470, BI096135, AW697770, BI543640, BG932913, BI096146, BQ060651, BF011094, BI096078, BF011254), odabrana je i po jedna heterologna iz kukuruza (X15290), lucerke (BI543243) i mrkve (BI073246) (tabela 4.5.).

**Tabela 4.5.** Fragmenti korišćeni za testiranje templejta šećerne repe

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

fragment	Prajmer (levi i desni)	Temperatura hibridizacije (°C)	Veličina produkta (bp)	Oznaka fragmenta u bazi	Homologija	Izvor podataka
1	1LGAGGCTTTCTCGGGTCTTC 1RAATGAGCCATTTCGAGTTTC	54	628	BI543470	Šećerna repa, transkript koji ima homologiju sa genom koji kodira dehidrin	De los Reyes et al. (2000)
3	3LTCAGTAAATGAGCAGCTCTAAGG 3RTCCATAATTTGTGGTTCAACATC	54	303	BI543243	Šećerna repa, lucerka, gen koji kodira protein, a čija je ekspresija izazvana hladnoćom i sušom	De los Reyes et al. (2000)
4	4LCAACCATGAAATTCGATCA 4RCTCGGACAAGGAGGTCATGT	54	551	BI096135	Šećerna repa, gen koji kodira dehidrin cistein proteinazu, a čija je ekspresija izazvana sušom	De los Reyes et al. (2001)
5	5LTCTCTCCTCCCTCTGAACCA 5RCAGGAAGAGCCGTCCAAATA	54	524	AW697770	Šećerna repa i <i>Arabidopsis</i> , gen koji kodira protein, a čija je ekspresija izazvana sušom	De los Reyes et al. (2000)
6	6LCAACACCCAAAAGAGCTCCA 6RCCAGCTTCGGTTAAAGCATA	54	541	BI543640	Šećerna repa i <i>Arabidopsis</i> , gen koji kodira protein, a čija je ekspresija izazvana sušom	De los Reyes et al. (2001a)
7	7LAACACGATCGAGCACACAAG 7RCCACTCGCAAGTGCTGTAT	54	816	X15290	<i>Zea mays</i> transkript koji ima homologiju sa genom koji kodira dehidrin (mRNA za dehidrin)	Close et al. (1989)
9	9LTTCCGGTATTATTTGCGTTGAGA 9RTTGTGAGCGTTACGATCAGC	54	327	BG932913	Šećerna repa, <i>Arabidopsis</i> i <i>Sorghum</i> sekvenca koja odgovara genu čija se ekspresija povećava u uslovima nedostatka vode	De los Reyes et al. (2001)
10	10L CTCCTCCTCAATTTCTCAA 10RGTGACACCACGAGCCACAT	54	507	BI096146	Šećerna repa i <i>Arabidopsis</i> sekvenca koja odgovara genu čija se ekspresija povećava u uslovima nedostatka vode	De los Reyes et al. (2001)
11	11LGCACGAGGTCTCTCTACTTTT 11RCATTGATAGCTGGCAAAACG	54	203	BQ060651	Šećerna repa, odgovara genu koji kodira fruktozu-bisfosfat aldolazu	De los Reyes et al. (2000)
12	12LTTGAAGAAGGGAAGGCTGAA 12RCGTTTCATTGGGTTGAATATCG	54, 58	604	BF011094	Šećerna repa, transkript koji odgovara genu koji kodira protein specifičan za list	De los Reyes et al. (2000)
13	13LCAATCCCTTCCAAAAACA 13RGCTAAACCAAAACCATGTGC	54	581	BI096078	Šećerna repa, gen čija je ekspresija indukovana prisustvom fosfata	De los Reyes et al. (2001)
14	14LACGAGGAACAAATCCACACC 14RCAACACCAGGTCGATGTTTG	54, 60	686	BI073246	Šećerna repa i mrkva, gen koji kodira glikoprotein, a čija je ekspresija izazvana mehaničkom povredom	De los Reyes et al. (2001)
15	15LGGGTTGATGAAGATGGAGGA 15RCCCTTGAGTCCATAGTTGC	58	524	BF011254	Šećerna repa, gen koji kodira protein, a čija je ekspresija izazvana auksinom	De los Reyes et al. (2000)



#### 4.6. Statistička obrada podataka

Statistička obrada podataka je izvršena korišćenjem programa STATISTICA 10.0.

Analiza varijanse je primenjena, za podatke hlorofila korišćene su MCMCglmm (Hadfield (2010) Metode. Korišćen je Paket R koji koristi Montecarlo metode, URL <http://www.jstatsoft.org/v33/i02/>). Ovaj paket, je jednostavan i replikuje neke funkcije odgovarajućeg softvera *asreml*, koji je specijalizovan za mešovite modele, te za istraživanja u poljoprivredi.

Sredine nivoa tolerantnosti na vodni stres u poljskim uslovima i rezultati odgovora genotipova pod različitim tretmanima su prikazani mešovitim modelom, uključujući genotipove kao slučajni faktor i nivo tolerancije usled stresa i/ili tretmana (zalivan/nezalivan tretman ili PEG koncentracija), kao osnovni faktor. Efekti vodnog stresa u *in vitro* ogledu i polju na suhu masu, sadržaj vode i produkciju prolina u uzorku testiranih genotipova upoređeni su u smislu veličine efekta (razlike između stresa i kontrole podeljene standardnom devijacijom na osnovu odgovora promenljivih). U ovu svrhu u *in vitro* eksperimentalnim podacima je takođe analiziran efekat, ali samo na kontroli (0% PEG) i 5% PEG, kao faktor koji odgovara stresu u eksperimentu u stakleniku. Logaritamske transformacije su korišćene kod analize vrednosti produkcije prolina kako bi se premostila velika varijabilnost podataka i normalizovala distribucija. Zbog velike varijabilnosti u podacima kod pojedinih parametara su osim logaritamske rađene i transformacije po Džonsonu pomoću programa Minitab.

Intervali poverenja za postavljene sredine izračunati su kao kvanti simulirane raspodele očekivanih vrednosti odgovora. Analize su urađene sa R (R Development Core Team, 2012), lme4 (Bates et.al., 2011) i ggplot2 (Wickham, 2009) paketom.

## **5. REZULTATI RADA**

### **5.1. Diferencijacija genotipova šećerne repe na osnovu fizioloških testova u polukontrolisanim uslovima**

Genotipovi šećerne repe koji su korišćeni u eksperimentu u polukontrolisanim uslovima su vrlo različito reagovali na petodnevni nedostatak vode (slika 5.1.). Opadanje turgora u različitoj meri je bilo zastupljeno kod svih genotipova.



**Slika 5.1.** Genotipovi šećerne repe gajeni u polukontrolisanim uslovima

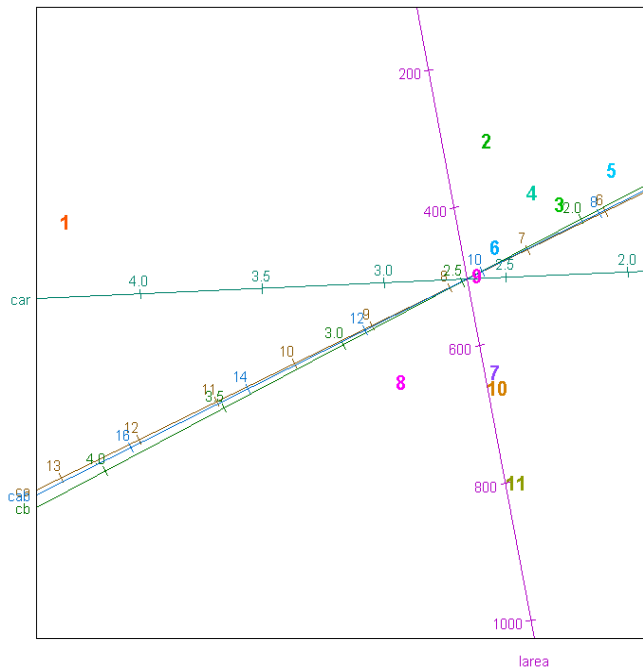
(leva posuda-kontrola; desna posuda-tretman)

U polukontrolisanim uslovima u stakleniku analizirani su: koncentracija hlorofila a (hl a), hlorofila b (hl b), hlorofila a+b (hl a+b), karotenoida, lisna površina (LP) i broj listova. Ovi parametri predstavljaju genotipske karakteristike testiranih uzoraka kod kojih se nisu očekivale značajne promene u uslovima kratkotrajne suše. Iz tog razloga su određeni samo na biljkama kontrolne grupe (tabela 5.1.). Jedino se broj listova značajnije razlikovao kod kontrole i kod tretmana, pa je zato i nadalje analiziran u eksperimentu u polukontrolisanim uslovima.

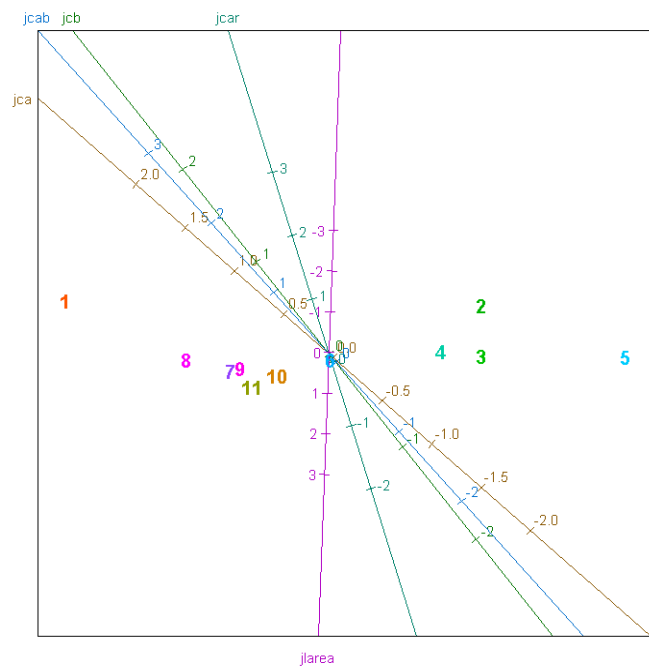
**Tabela 5.1.** Prosečne vrednosti koncentracije hl a, hl b, karotenoida, hl a+b, broja listova i lisne površine

Genotip	hl a	hl b (mg·g <sup>-1</sup> )	car (suve mat.)	hl a+b	Broj listova	LP (cm <sup>2</sup> )
1	11,70	3,68	4,39	15,38	11,00	463,49
2	6,87	2,20	2,59	9,07	15,00	414,24
3	6,37	2,04	2,43	8,40	15,67	362,52
4	6,74	2,02	2,38	8,75	14,00	522,67
5	5,74	1,77	2,09	7,50	13,00	514,47
6	7,34	2,37	2,42	9,71	14,00	928,69
7	7,90	2,59	2,52	10,49	15,33	505,12
8	9,01	2,91	2,77	11,92	11,33	1099,89
9	7,64	2,61	2,36	10,25	12,67	938,83
10	8,03	2,47	2,59	10,51	15,33	744,51
11	8,19	2,59	2,70	10,78	14,00	588,03

Kako su koncentracije pigmenata i LP između genotipova veoma varijabilne i nisu imale standardnu normalnu distribuciju izvršena je transformacija podataka po Džonsonu. Nakon toga su ustanovljene razlike među genotipovima za koncentracije pigmenata (slika 5.2. i tabela 5.2.).



A



B

**Slika 5.2.** Dijagram razdvajanja genotipova na osnovu koncentracije pigmenta i lisne površine za originalne (A) i promenljive normalizovane po Džonsonu (B)

larea-lisna površina;  
 car-karotenoidi;  
 ca-hlorofil a;  
 cb-hlorofil b;  
 cab-hlorofil a+b;  
 jlarea, jcar, jca, jcb, jcab-parametri  
 nakon transformacije po Džonsonu

Koncentracija hl a+b, karotenoida i lisna površina su testirane analizom varijanse i određeni su koeficijenti korelacije za ove parametre (tabela 5.2.). Visok pozitivan koeficijent korelacije je dobijen za koncentraciju hl a+b kod testiranih genotipova.

**Tabela 5.2.** Analiza varijanse za koncentraciju pigmentata (hlorofil a+b i karotenoidi) i lisnu površinu

Parametar	Matrica varijanse-kovarijanse			Intraklasni koeficijent korelacije		
	Karotenoidi	Hlorofil a+b	Lisna površina	Mod	95% HPD interval	
	genotipovi					
Karotenoidi	<b>0.736</b>			<b>0.717</b>	0.462	0.896
Hlorofil a+b	0.607	<b>1.100</b>		<b>0.917</b>	0.789	0.971
Lisna površina	-0.038	0.173	<b>0.834</b>	<b>0.696</b>	0.411	0.880
	unutar genotipova					
Karotenoidi	<b>0.379</b>					
Hlorofil a+b	0.057	<b>0.172</b>				
Lisna površina	-0.032	-0.006	<b>0.475</b>			

HPD interval (highest probability density)-interval pouzdanosti u kom će se sa 95% verovatnoće nalaziti vrednost parametra

Koeficijenti korelacije su veoma visoki za ove parametre što je i očekivano, kao i kovarijanse između karotenoida i hlorofila a+b.

Analizom komponenti varijanse omogućena je procena varijanse-kovarijanse između i unutar genotipova, što je prikazano u tabeli 5.3.

**Tabela 5.3.** Analiza komponenti varijanse i korelacije između koncentracija pigmentata i lisne površine (LP).

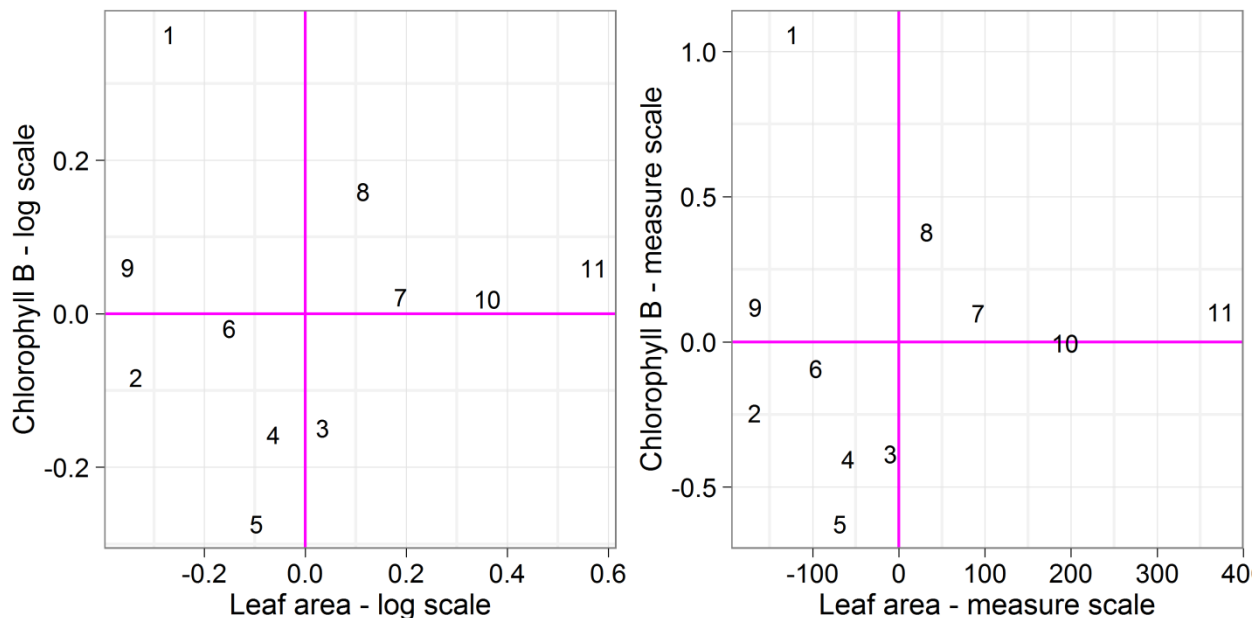
Varijanse/ korelacije	Parametri	hl a	hl b	kar.	LP	ICC	ICC	HPD interval
Između genotipova	hlorofil a	<b>2,42</b>	0,49	0,53	-0,09	0,89	0,77	0,97
	hlorofil b	0,57	<b>0,54</b>	0,38	-0,05	0,73	0,54	0,92
	karotenoidi	0,68	0,23	<b>0,68</b>	0,03	0,78	0,60	0,93
	lisna površina	-20,42	-5,13	4,04	<b>21107,19</b>	0,76	0,53	0,96
Unutar genotipova	hlorofil a	<b>0,31</b>	-0,22	-0,13	0,32			
	hlorofil b	-0,05	<b>0,20</b>	0,23	-0,36			
	karotenoidi	-0,03	0,04	<b>0,18</b>	0,18			
	lisna površina	13,76	-12,74	5,95	<b>6140,32</b>			

(ICC-intraklasni korelacioni koeficijent; HPD interval (highest probability density)-interval pouzdanosti u kom će se sa 95% verovatnoće nalaziti vrednost parametra. Varijanse su na glavnoj dijagonali (boldovane), kovarijanse u donjem levom trouglu, dok su korelacije prikazane u gornjem desnom uglu)

Koncentracije pigmentata su međusobno u pozitivnoj korelaciji, tako da svaki od njih, ili njihov zbir može da se koristi u daljim statističkim analizama. Lisna površina nije upoređena sa rezultatima koncentracije pigmentata, jer pigmenti i lisna površina

pokazuju visok intraklasni koeficijent korelacije, što je znak genotipske heterogenosti za ove parametre.

Genotipska odstupanja za lisnu površinu i hlorofil b su obrnuto proporcionalna i prikazana su u dijagramu rasturanja na slici 5.3.



**Slika 5.3.** Devijacije genotipova za lisnu površinu i hlorofil b

(leaf area-lisna površina; chlorophyll B-hlorofil b; log scale-promenljive nakon logaritamske transformacije, measure scale- originalne promenljive)

Kako je utvrđena velika heterogenost podataka za lisnu površinu (LP) i koncentraciju hl b (tabela 5.1.) urađene su i logaritamske transformacije originalnih podataka (oznaka log) što je prikazano u levom delu slike 5.3. Transformacije nisu dale očekivani rezultat, ali su bile neophodne. Dva genotipa (7 i 8) imaju više od prosečnih ocena za obe osobine, niže od prosečnih ocena za obe osobine imaju genotipovi 2 i 5, dok ostali imaju visoke rezultate za jednu od osobina i prosečne s druge strane (11 i 10 za lisnu površinu, 1 za hlorofil b).

Kako je cilj eksperimenta bio da se ustanove fiziološki parametri koji su kod šećerne repe najrelevantniji za utvrđivanje sposobnosti podnošenja nedostatka vode u nastavku su prikazani parametri za koje se smatra da imaju takav potencijal.

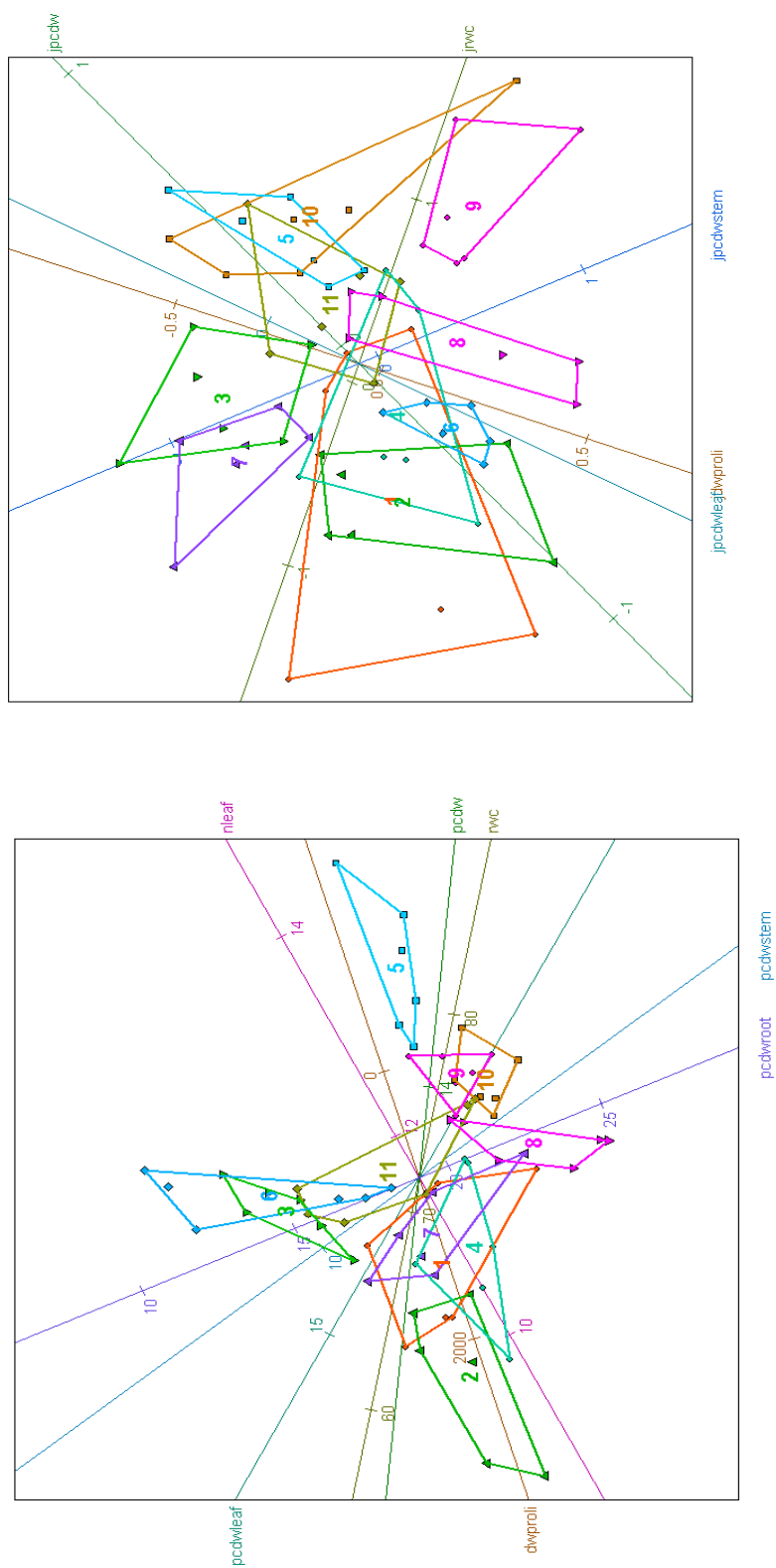
Na osnovu testiranih parametara (relativni sadržaj vode (RWC), % suve materije (SM) lista, stabla i korena, % vlage u zemljištu na kom su biljke gajene i sadržaj slobodnog prolina) ustanovljene su razlike između genotipova (tabela 5.4.), kao i razlike između kontrolnih i biljaka izloženih tretmanu (slika. 5.4. i 5.5.).

**Tabela 5.4.** Prosečne vrednosti relativnog sadržaja vode (RWC), % suve materije (SM) u listu, stablu i korenu, % vode u zemljištu i sadržaj slobodnog prolina kod mladih biljaka šećerne repe

Genotip	Tretman	RWC	% SM list	% SM stablo	% SM koren	% vode u zemljištu	Prolin (mg/g suve mase)
1	kontrola	78,75	9,15	8,38	16,74	34,76	109,01
	suša	50,67	16,65	11,53	20,64	15,10	318,74
2	kontrola	74,57	9,20	8,18	15,49	38,17	75,86
	suša	40,60	28,40	17,19	23,17	23,20	7793,79
3	kontrola	84,46	10,04	8,36	11,38	40,57	33,83
	suša	58,04	12,24	8,10	14,75	11,88	381,21
4	kontrola	78,24	10,10	9,28	17,50	34,62	70,27
	suša	63,32	19,71	12,93	21,93	13,94	3599,94
5	kontrola	81,89	12,74	10,87	21,27	35,39	113,38
	suša	56,19	20,34	17,25	26,65	11,46	774,61
6	kontrola	81,98	11,57	10,05	16,33	30,40	118,18
	suša	61,82	22,42	13,64	16,28	27,87	2060,34
7	kontrola	63,87	10,00	9,13	16,58	41,07	72,67
	suša	58,84	15,71	9,50	22,49	17,59	639,26
8	kontrola	81,42	11,05	10,82	20,13	38,90	94,50
	suša	74,58	12,63	13,23	24,16	24,08	378,79
9	kontrola	86,71	11,43	13,02	20,24	40,17	133,20
	suša	81,67	11,07	11,16	20,12	35,19	242,24
10	kontrola	87,23	11,52	10,58	21,35	40,62	100,07
	suša	74,37	12,05	10,68	21,67	20,54	133,66
11	kontrola	82,51	11,17	10,57	19,11	44,26	87,85
	suša	76,56	8,74	7,23	11,52	21,90	160,83

(RWC-relativni sadržaj vode, %SM-%suve materije)

Zbog velike varijabilnosti podataka i odstupanja od normalne raspodele analiziran je uticaj različitih transformacija originalnih eksperimentalnih podataka na konačan zaključak.



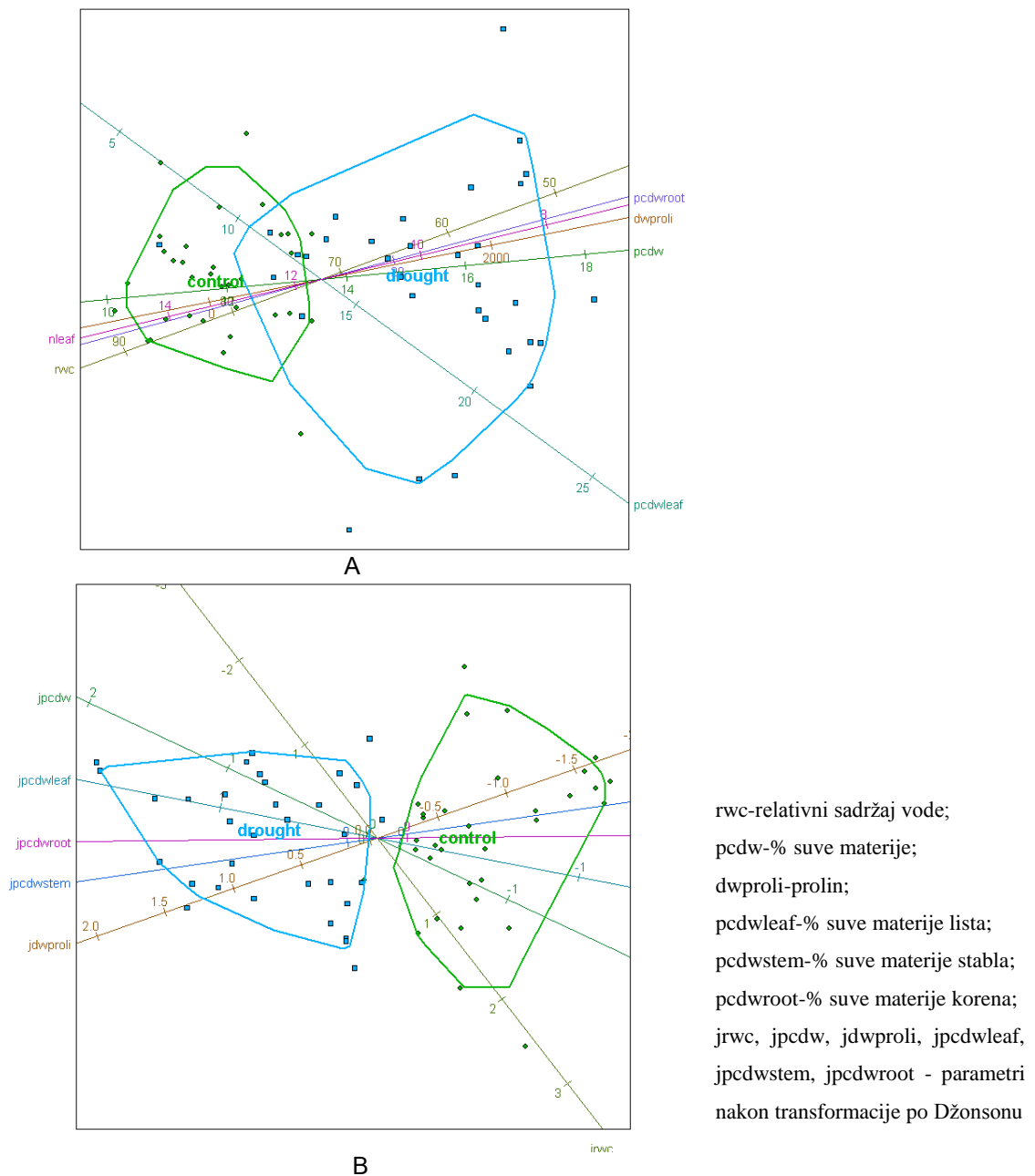
**Slika 5.4.** Dijagram korelacije parametara i profil svakog genotipa za originalne (A) i normalizovane (B) promjenljive po Džonsonu (B) kod eksperimenta u polukontrolisanim uslovima.

(nleaf-broj listova; rwc-relativni sadržaj vode; pcdw-% suve materije; dwproli-prolin; pcdwleaf-% suve materije lista; pcdwstem-% suve materije stabla; pcdwroot-% suve materije korena; jpcdw, jpcdwproli, jpcdwleaf, jpcdwstem, jpcdwroot - parametri nakon transformacije po Džonsonu)



Povezanost između dve promenljive označena je uglom između njih (veći ugao je ukoliko su vrednosti sličnije) i prikazan je profil za svaki genotip. Poligoni predstavljaju skupove oznaka za svaki genotip. Polja u dijagramu su skup parametara za svaki genotip.

Pozitivan koeficijent korelacije je ustanovljen kod parametara postavljenih na glavnoj osi više horizontalno (broj listova, % SM, RWC), dok su % SM lista i sadržaj prolina u pozitivnoj korelaciji međusobno i negativnoj sa prethodna tri parametra. Druge glavne ose (bliže vertikalno postavljene) predstavljaju amplitudu za % SM korena i % SM stabla i takođe imaju pozitivan koeficijent korelacije. Genotipovi se mogu grupisati, u zavisnosti od mesta gde se nalaze u odnosu na osu koja ih diferencira: (1,4,7), 2 (6,3,8,11), (9,10) i 5 mogu biti podeljeni na glavnoj vertikalnoj osi u grupe na osnovu sličnosti kod analiziranih parametara, dok genotipovi (3,6), (8,9,10,5), i ostatak na drugoj osi. Razdvajanje genotipova je u ovom slučaju prihvatljivije sa originalnim varijablama, jer se genotipovi na taj način mogu jednostavnije izdiferencirati. Genotipovi se mogu razdvojiti na osnovu merenih parametara dobijenih u eksperimentu u polukontrolisanim uslovima i isticanjem tretmana (slika 5.5.). Bolje razdvajanje genotipova je dobijeno primenom transformacije po Džonsonu.

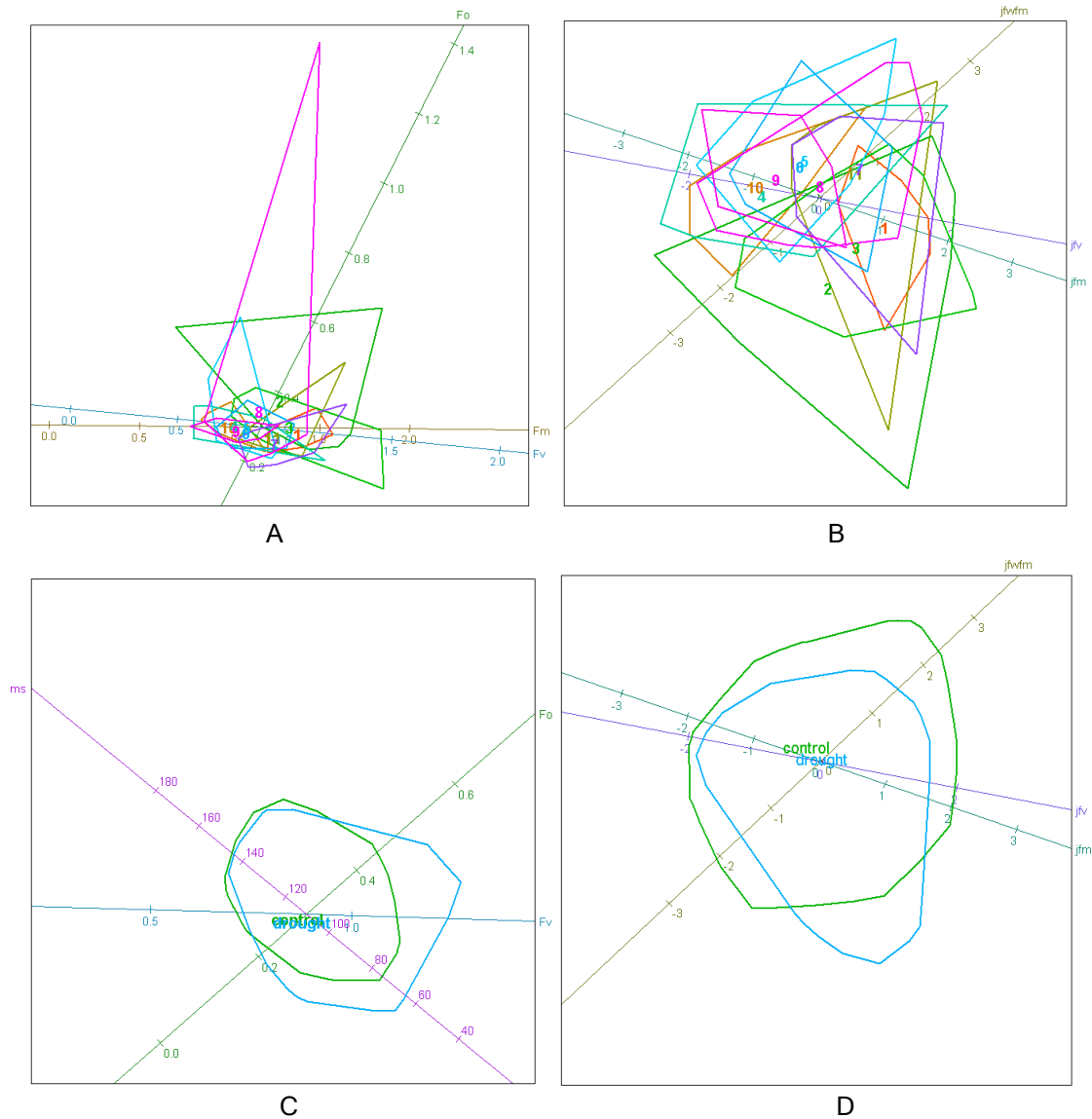


**Slika 5.5.** Dijagram razdvajanja genotipova na osnovu eksperimenta u polukontrolisanim uslovima s isticanjem tretmana (kontrola i suša) za originalne (A) i promenljive normalizovane po Džonsonu (B)

S ciljem utvrđivanja uticaja nedostatka vode na rad fotosistema u listovima mladih biljaka šećerne repe, mereni su parametri fluorescencije:  $F_0$ -nevarijabilna fluorescencija,  $F_m$ -maksimalna fluorescencija na P piku,  $F_v$ -varijabilna fluorescencija,  $F_v/F_m$ -fotohemijska efikasnost fotosistema II.

Na osnovu parametara fluorescencije, genotipovi se mogu diferencirati na dva načina, u zavisnosti od toga da li su tretmani istaknuti (slika 5.6. A i B) ili ne (kontrola i

suša) (slika 5.6. C i D). Za parametre fluorescencije biplotovi su prikazani kako za originalne (slika 5.6. A i C) tako i za promenljive normalizovane po Džonsonu (slika 5.6. B i D).



**Slika 5.6.** Dijagrami razdvajanja genotipova (A, B) na osnovu parametara fluorescencije dobijenih u eksperimentu u polukontrolisanim uslovima, ( $F_0$ ,  $F_v$ ,  $F_m$ ,  $F_v/F_m$ ,  $t_{1/2ms}$ ), s isticanjem tretmana (kontrola, suša) (C i D) za originalne (A i C) i promenljive normalizovane po Džonsonu (B i D)

Kao što je ranije navedeno, postoji velika varijabilnost podataka i neophodno je bilo transformisati ih u normalne slučajne promenljive. Pomoću transformacije po Džonsonu je dobijena vrlo korektna normalizacija, ali ne značajno bolja od

logaritamske, koja je u ovom slučaju praktičnija za tumačenje, jer se za razliku od transformacije po Džonsonu vrednosti dobijene logaritamskim transformacijama mogu lako prevesti u procenete. Iz tog razloga nadalje će biti korišćene logaritamske transformacije.

U analizi nezavisnih promenljivih stres x genotip prvo je primenjena metoda regresije najmanjih kvadrata (OLS) uzimajući stres faktor (tretman) kao kontinuiranu promenljivu (skala 0:1). Analizom varijanse upoređene su vrednosti dobijene kao odgovor genotipova na uslove stresa uzrokovanog nedostatkom vode. F test verovatnoće (tabela 5.5.) ukazuje na značajnost interakcije stres x genotip, naročito za sadržaj slobodnog prolina i % SM korena, stabla i lista. Iz toga proizilazi da se genotipovi bitno diferenciraju na osnovu sadržaja prolina i % suve materije.

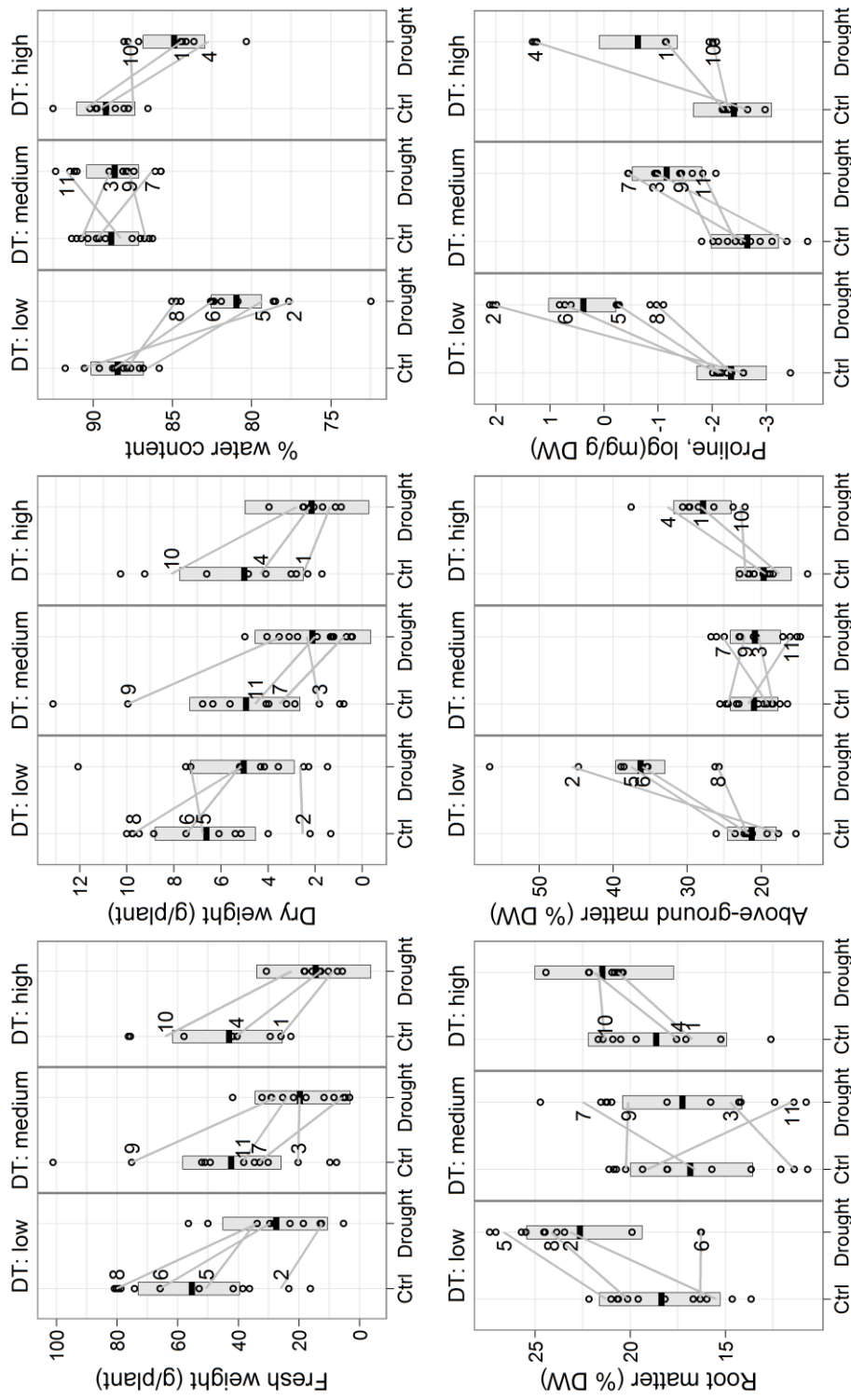
**Tabela 5. 5.** Vrednost F raspodele verovatnoće i rezidualne varijanse OLS analize za eksperiment u polukontrolisanim uslovima.

F vrednost	SM	SM koren	SM stablo	SM list	% SM	% SM koren	% SM stablo	% SM list	Prolin	Broj listova
Stres	0,0000	0,0020	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
Genotip	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0001
Stres x genotip	0,3030	0,1207	0,5418	0,2186	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,1977
Rezidualna varijansa	0,2856	1,4544	0,8164	0,7037	9,1370	1,4281	0,8878	1,0512	0,0160	91,3805

SM - suva materija

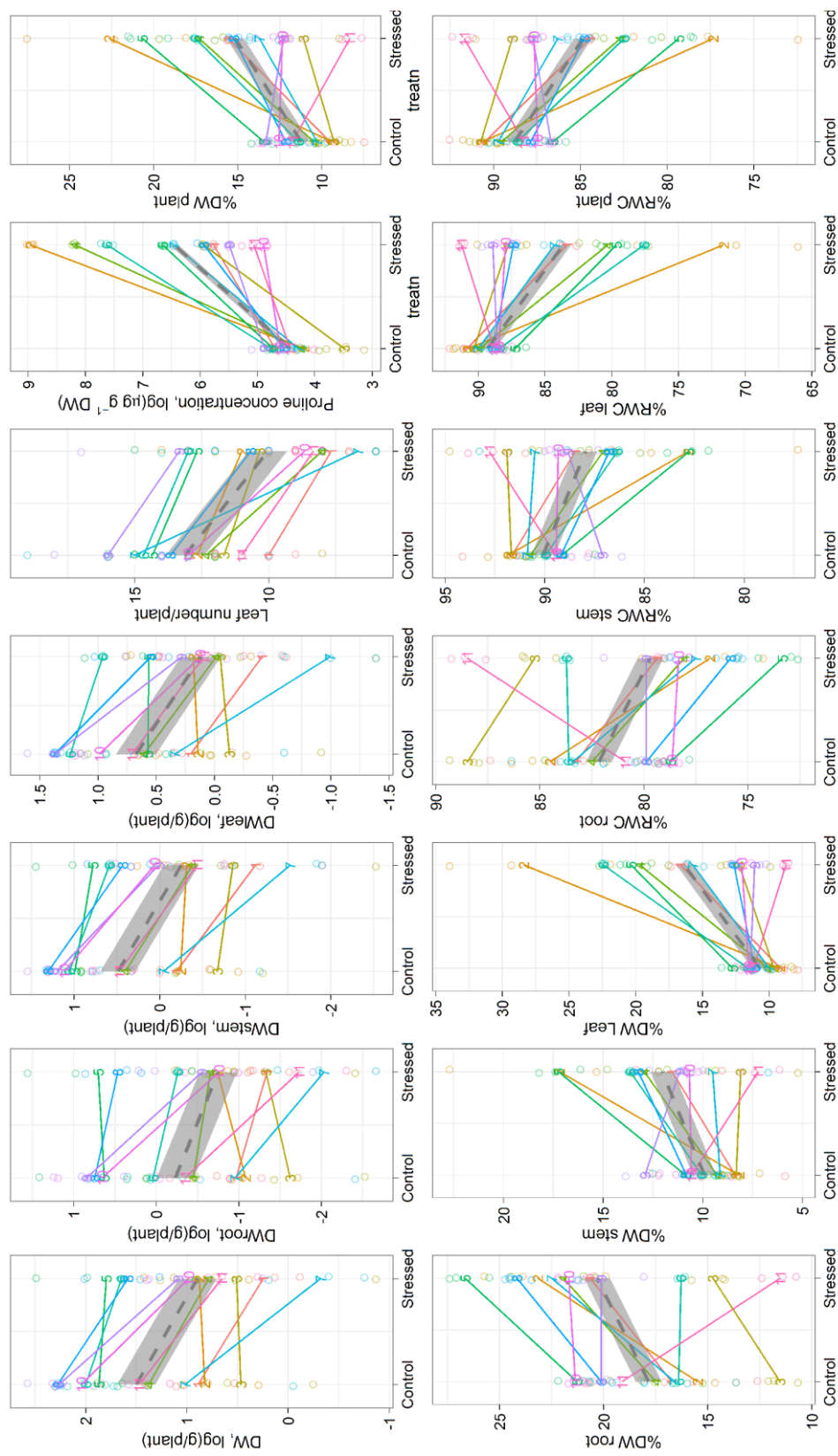
Kako bi genotipovi bili što bolje procenjeni, rezultati ocenjenih parametara u polukontrolisanim uslovima su upoređeni sa opservacionim testom u polju (slika 5.7.). Na taj način su u evaluaciju uključeni i drugi faktori kojima su genotipovi izloženi u uslovima gajenja na otvorenom prostoru.

Kako je ovde bilo neophodno izvesti komplikovanu regresionu analizu, rađen je metod najmanjih kvadrata. Na taj način je analizirano kako na jednu zavisnu promenljivu mogu da utiču vrednosti jedne ili više nezavisnih promenljivih. Bilo je potrebno testirane parametre (suvu masu korena, stabla i lista, relativni sadržaj vode korena, stabla i lista i % suve materije) analizirati posebno kod stresnih (nedostatak vode) i kontrolnih uslova za originalne i transformisane promenljive i na osnovu toga izdiferencirati genotipove (slika 5.8.).



**Slika 5.7.** Efekti stresa izazvanog sušom na rast i koncentraciju prolina kod biljaka gajenih u polukontrolisanim uslovima

Genotipovi šećerne repe su raspoređeni u tri grupe na osnovu nivoa vizuelno procenjene tolerancije na sušu u polju (DT). Prosečne pozicije genotipova su prikazane sivom linijom sa intervalom poverenja od 95%. (DT-tolerantnost prema suši; low-niska; medium-srednja; high-visoka; Ctrl-kontrola; drought- nedostatak vode; Fresh weight (g/plant)-sveža masa (g/biljci); Dry weight (g/plant)-suva masa (g/biljci); % water content-% vode; Root matter (%DW)-%suve materije korena; Above-ground matter (%DW)-%suve materije nadzemnog dela; Proline log (mg/g DW)-koncentracija prolina nakon logaritamske transformacije originalnih promenljivih (mg/g SM))



**Slika 5.8.** Dijagram analize predviđanja metodom najmanjih kvadrata za %SM i %RWC korena, stabla i lista eksperimenta u polukontrolisanim uslovima. Isprekidana linija pokazuje prosečni efekat stresa za 95% interval poverenja. Individualni nezavisni efekti genotipova su prikazani numerisanim linijama, dok su posmatrane relativne vrednosti (krugovi) označene istom bojom.

Control-kontrola; Stressed-stres (nedostatak vode); leaf number/plant-broj listova po biljci; %DW plant-% suve materije; %DW root-% SM korena; %DW stem-% SM stabla; %DW leaf-% SM lista; %RWC root-%RWC korena; %RWC stem-%RWC stabla; %RWC leaf-%RWC lista; %RWC plant-% RWC biljke; DWlog (g/plant), DWroot log; DW stem log, DWleaf log-parametri nakon log transformacije, proline concentration log ( $\mu\text{g g}^{-1}\text{ DW}$ )-koncentracija prolina ( $\mu\text{g g}^{-1}\text{ SM}$ );

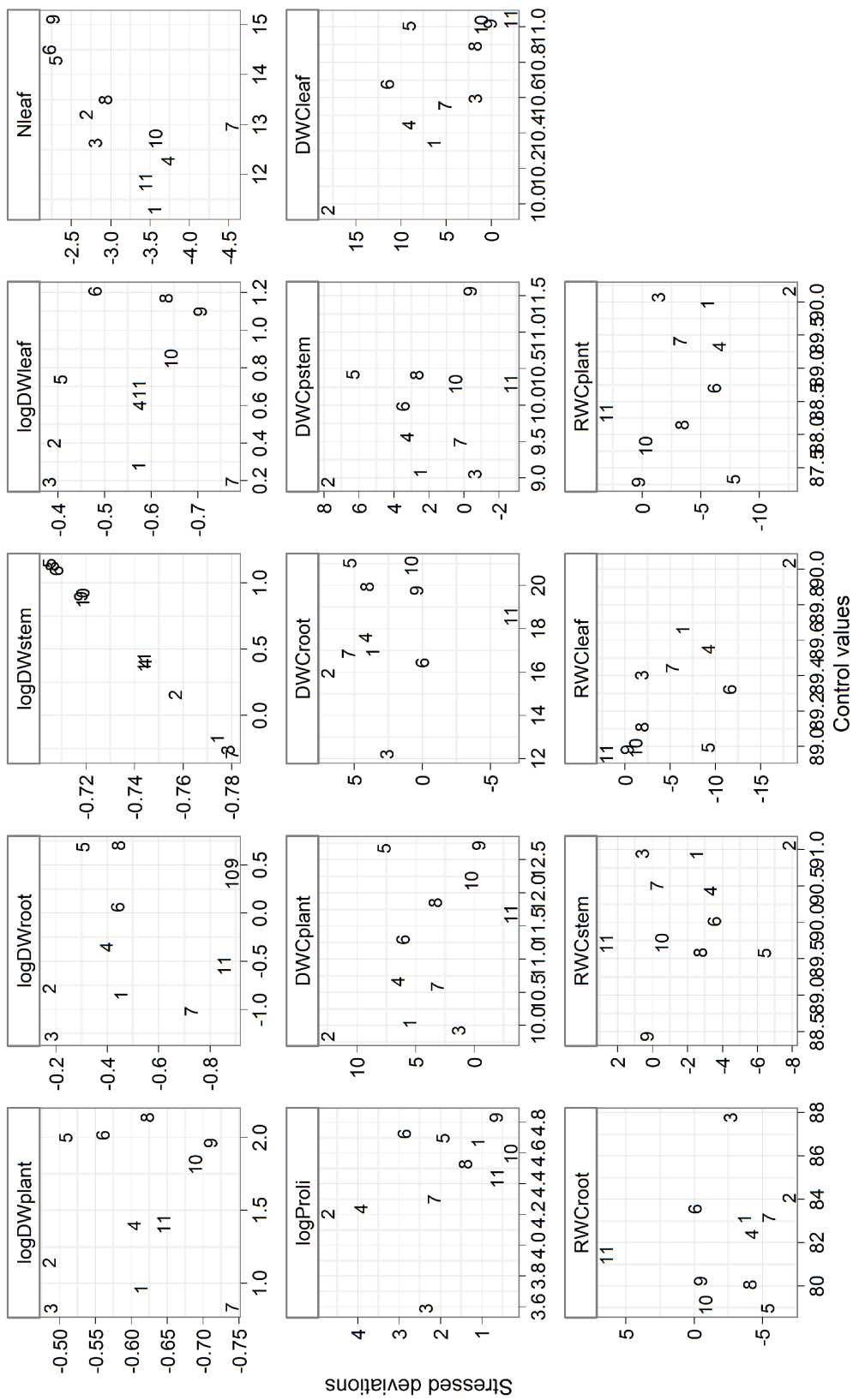
Procenjen je odnos efekata nedostatka vode na merene parametre za svaki genotip. Devijacija za svaki genotip je prikazana oko prosečne ose (u ovom slučaju odstupanja od kontrole) i prosečni nagib (odstupanje od prosečnih razlika pri stresu). Ovaj model se razlikuje od OLS po perspektivi i prilagođavanjima prema vrednostima dobijenim testiranjem genotipova.

Ocenjene su vrednosti testiranih parametara (SM, RWC, sadržaj prolina) u uslovima nedostatka vode i efekti na genotipove su prikazani kao skup tačaka preseka (kontrole) i nagiba (razlike usled vodnog stresa, slika 5.9.) kao i razlike oko prosečne ose i nagiba (efekata) (slika 5.10.).

Logaritamske transformacije su korišćene kod podataka, parametara koji nisu imali standardnu normalnu distribuciju. Kod ostalih su uzimane originalne vrednosti testiranih parametara.

Odstupanja za kontrolu su prikazana na x osi (slika 5.10.), a odstupanja za efekat stresa su data na y osi. Genotipovi su prikazani brojevima u parcelama (poljima). Ukrštanje ružičastih linija na dijagramima predstavlja proseke genotipova za kontrolu (x-osa) i efekte stresa (y osa). Odstupanja su prikazana tako što genotipovi u gornjoj polovini imaju više pozitivnih nego prosečnih vrednosti za efekat stresa, a genotipovi u desnoj polovini više pozitivnih nego prosečnih vrednosti za kontrolu.

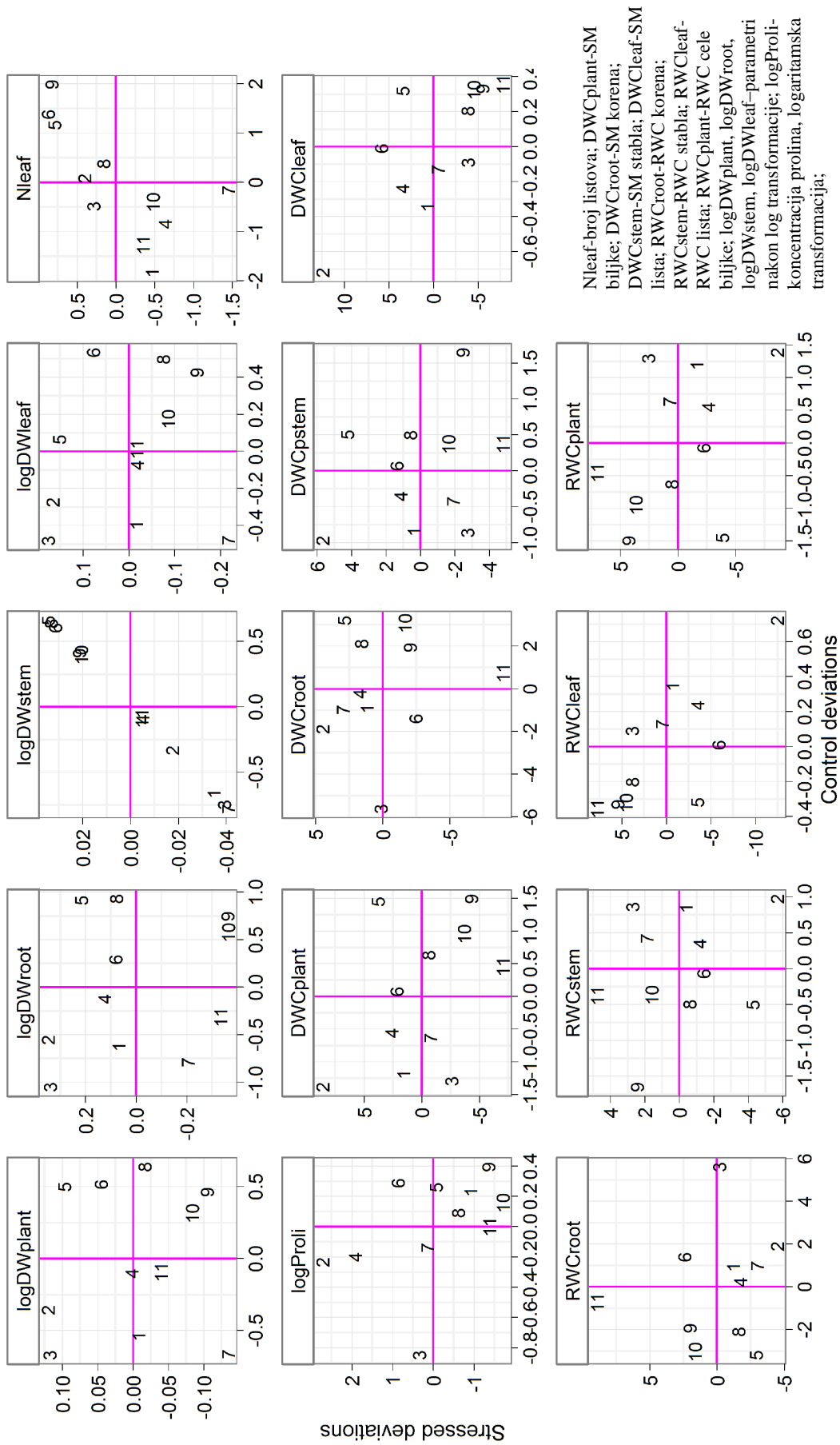
Rezultati se mogu prikazati sa samo dva efekta, kao bivarijantni plotovi koji pored prikaza mogućih odnosa između dva efekta, podelom parcela kroz centar u četiri kvadranta omogućavaju grupisanje genotipova prema tipu rezultata (slika 5.10.). Dobijeni rezultati dokazuju da je skoro savršena negativna korelacija utvrđena između vrednosti dobijenih kod kontrole i tretmana za suhu materiju korena, ali je manji koeficijent korelacije nego kod broja listova. Genotipovi koji su u pozitivnom delu nagiba y ose su tolerantniji na nedostatak vode za korišćeni parametar, i obrnuto. Genotipovi koji pokazuju pozitivne rezultate za oba efekta i obe visoke ocene kod kontrole, manje su pogođeni stresom od proseka za dati parametar i tolerantniji su. Odnosi između parametara i genotipova koji su rezultat uticaja stresa mogu biti ilustrovani takođe biplotovima (slika 5.11.).



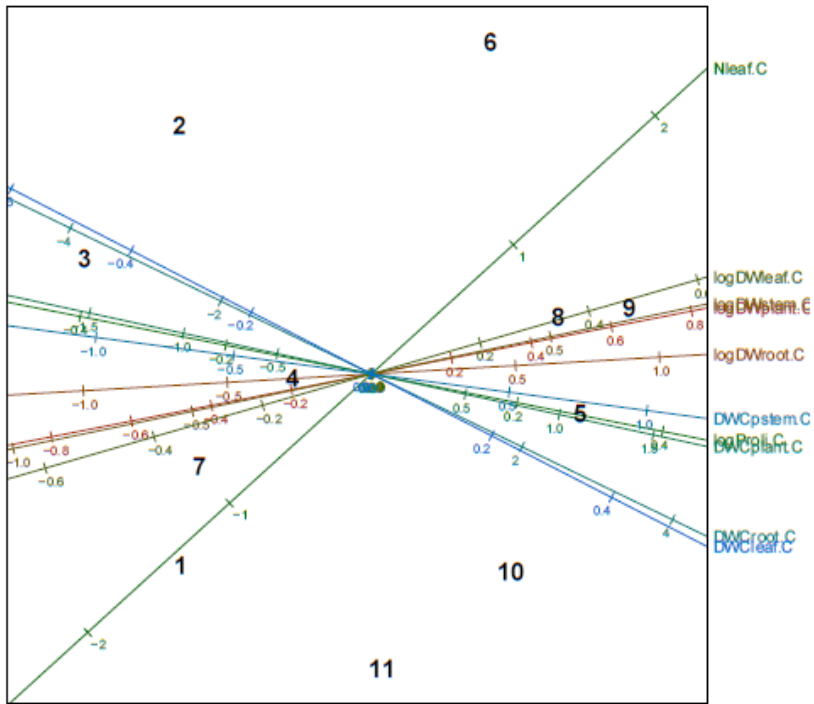
**Slika 5.9.** Koeffijenti varijacije genotipova iz modela mešovite analize za originalne i log transformisane vrednosti parametara (RWC i SM korena, stabla, listova, koncentracija prolina, broj listova u eksperimentu u polukontrolisanim uslovima).

(Nleaf-broj listova; DWcplant-SM biljke; DWcroot-SM korena; DWcplant-SM lista; DWcstem-SM lista; DWcleaf-SM stabla; DWcroot-RWC korena; RWCstem-RWC stabla; RWCleaf-RWC lista; RWCplant-RWC cele biljke; logDWplant, logDWroot, logDWstem, logDWleaf-parametri nakon log transformacije, logProli-koncentracija prolina, logaritamska transformacija; Vrednosti kontrole (Control values) su na x osi, efekti stresa (Stressed deviations) su na y osi. Genotipovi su prikazani brojevima u parcelama (poljima)).

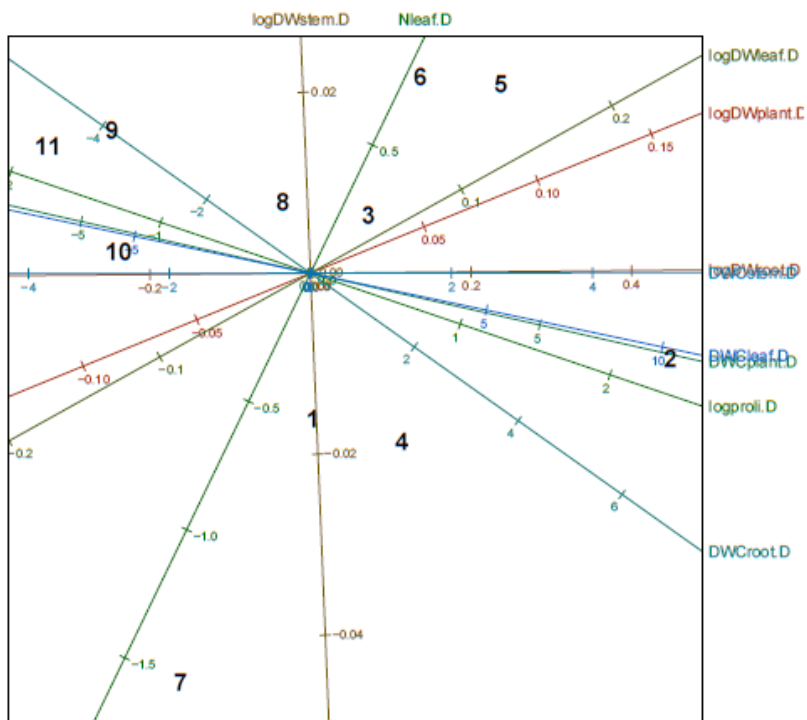




**Slika 5.10.** Dijagram uticaja tretmana na genotipove na osnovu modela mešovite analize (sa slučajnim efektom genotipova) za fiziološke parametre eksperimenta u polukontrolisanim uslovima.



A



B

naziv osa predstavlja tip tretmana:  
 C: kontrola (bez stresa);  
 D: razlike (stres);  
 Nleaf-broj listova;  
 DWC je % suve materije; DWCroot-%SM korena; DWCstem-%SM stabla;  
 DWcleaf-%SM lista;  
 DWcplant-%SM cele biljke;  
 log proli-koncentracija prolina,  
 logaritamska transformacija;  
 logDWleaf, logDWplant, logDWroot,  
 logDWstem-parametri nakon log transformacije

**Slika 5.11.** Biplotovi korelacija efekta tretmana na genotipove modelom mešovite analize (sa slučajnim efektom genotipova) za parametre eksperimenta u polukontrolisanim uslovima za kontrolu (A) i tretman (B).

Promenljive relativnog sadržaja vode su isključene zbog toga što su obrnuto proporcionalne % suve materije.

Za biljke kontrolne grupe su ustanovljene sledeće korelacije (slika 5.11. A): sadržaj prolina je imao sličnu tendenciju kao % suve materije (ukupan), suva materija po organima je u neposrednoj međusobnoj povezanosti sa ukupnom suvom materijom. Broj listova je bolje povezan sa suvom masom, nego sa % suve materije. Kombinacija ovih promenljivih može podeliti genotipove u dve osnovne grupe: one sa višim koeficijentima korelacije 9, 8, 5, 10 i 6 i one sa nižim koeficijentima korelacije 3, 1, 2, 7, i dok su 4 i 11 između prethodne dve grupe (slika 5.11.).

Posmatrajući rezultate analiziranih parametara kod biljaka koje su bile izložene tretmanu (Slika 5.11. B), uočava se da su suva materija stabla i broj listova na različitim osama u odnosu na druge promenljive. Prolin i dalje ima visok koeficijent korelacije sa ukupnim % SM (i %SM lista). % SM i sadržaj prolina su u pozitivnoj, ali ne visokoj, korelaciji sa SM (cele biljke i lista), i pojavljuju se kao kandidati za indikatore na tolerantnost prema stresu. Pozitivne rezultate za SM su pokazali genotipovi 5, 6 i 2, a suprotno se može reći za genotipove 11, 9, 10 i 7 koji ispoljavaju tolerantnost nižu od prosečne prema nedostatku vode.

Detaljnija analiza ovih parametara je urađena kao zajednički rezultat u cilju procene varijanse i korelacija između genotipova prema svojstvima, primenom Monte Karlo metode. Za jednostavnije rukovanje matricom, izdvojene su dve grupe parametara: suva masa korena, stabla i lista s jedne strane i ukupna suva masa, broj listova, % suve materije i sadržaj prolina s druge strane.

Prosečne vrednosti za suhu masu i poređenja analiziranih parametara (HPD interval) su prikazane u tabeli 5.6., a varijanse i korelacije u tabeli 5.7.

**Tabela 5.6.** Prosečne vrednosti za ukupnu suhu materiju korena, stabla i lista

Parametar	Jedinica	Koren			Stablo			List		
		Mod	HPDinterval	Mod	HPDinterval	Mod	HPDinterval	Mod	HPDinterval	
Suva masa										
Kontrola	g/biljci	0,88	0,38	1,70	1,67	0,84	3,05	2,03	1,06	3,56
Promena	%	-32,7	-75,7	30,6	-49,1	-79,9	-2,9	-46,3	-75,8	20,9
% SM										
Kontrola	%	18,00	15,96	19,65	10,01	8,87	11,00	10,68	9,69	11,64
Promena	%	2,46	-0,37	4,91	1,75	-0,50	4,32	5,10	1,72	9,35
RWC										
Kontrola	%	82,00	80,20	83,9	89,9	88,9	91,1	89,6	88,3	90,2
Promena	%	-2,41	-5,09	0,08	-2,44	-4,58	0,11	-5,32	-9,42	-1,31

Mod-vrednost/promena; Promena-razlika usled stresa izazvanog nedostatkom vode; SM-suva materija; HPD interval (highest probability density)-interval pouzdanosti u kom će se sa 95% verovatnoće nalaziti vrednost parametra

Procene su prikazane za logaritamski transformisane promenljive, ali eksponencijalne vrednosti su prikazane u tabeli 5.6., gde su efekti stresa izraženi kao procentualne promene.

**Tabela 5.7.** Varijanse-kovarijanse (VCV) i korelaciona matrica za ukupnu suhu materiju korena, stabla i lista usled efekta stresa kod testiranih genotipova

	Suva masa			% Suve materije			Relativni sadržaj vode		
	Koren	Stablo	List	Koren	Stablo	List	Koren	Stablo	List
<i>VCV i korelacije za kontrolu</i>									
Koren	<b>0,79</b>	0,48	0,14	<b>5,37</b>	0,61	0,34	<b>4,05</b>	0,28	0,40
Stablo	0,39	<b>0,84</b>	0,25	1,76	<b>1,57</b>	0,20	0,62	<b>1,23</b>	0,37
List	0,10	0,19	<b>0,64</b>	0,86	0,27	<b>1,20</b>	0,87	0,45	<b>1,16</b>
<i>VCV i korelacije za tretman</i>									
Koren	<b>0,94</b>	0,27	0,27	<b>14,66</b>	0,87	0,55	<b>14,60</b>	0,62	0,27
Stablo	0,24	<b>0,83</b>	0,38	8,75	<b>6,93</b>	0,75	5,90	<b>6,31</b>	0,69
List	0,22	0,29	<b>0,69</b>	9,98	9,31	<b>22,11</b>	5,62	9,50	<b>29,97</b>
<i>VCV i korelacije u okviru genotipova</i>									
Koren	<b>0,43</b>	0,48	0,14	<b>2,90</b>	0,48	0,14	<b>3,33</b>	0,41	0,46
Stablo	0,30	<b>0,38</b>	0,77	1,32	<b>2,56</b>	0,64	1,26	<b>2,85</b>	0,60
List	0,26	0,24	<b>0,27</b>	1,47	1,70	<b>2,71</b>	1,44	1,75	<b>2,95</b>
<i>Unutarklasni koeficijenti korelacije</i>									
Kontrola	0,37	0,41	0,40	0,23	0,14	0,05	0,18	0,12	0,03
Tretman	0,44	0,41	0,43	0,64	0,63	0,85	0,66	0,61	0,88

Varijanse su prikazane na glavnoj dijagonali (bold), kovarijanse u donjem levom trouglu, a korelacije u gornjem desnom trouglu.

Pod uticajem nedostatka vode suva masa se smanjila kao i relativni sadržaj vode, dok se % suve materije povećao. Intervali poverenja su veliki. Došlo je do značajnog smanjenja suve mase stabla, a i efekat na %SM i RWC je bio značajan za sve delove (koren, stablo i list) (tabela 5.7.).

Pozitivni koeficijenti korelacije su dobijeni kod poređenja korena, stabla i lista. I unutarklasni koeficijenti korelacije su viši i pozitivni za % SM u odnosu na ostale testirane parametre, posebno kod listova.

Prosečne vrednosti za suvu masu, % SM, broj listova i prolin, potvrđuju uticaj stresa na ukupnu suvu masu, koji nije statistički značajan prema ovom testu, čak i sa 38% smanjenja SM, dok je uticaj na broj listova, % SM i prolin znatno veći. Biljke izložene stresu u proseku imaju oko tri lista manje, za četiri procenta veći % SM i sedmostruko veći sadržaj prolina (tabela 5.8.).

**Tabela 5.8.** Uticaj vodnog deficita na sadržaj SM, broj listova, %SM i sadržaj prolina

Parametar	Jedinica	Vrednost/ promena	HPDinterval	
<b>Suva masa</b>				
Kontrola	g/biljci	4,49	2,29	9,39
Razlika usled stresa	%	-38	-76	+22
<b>Broj listova/biljci</b>				
Kontrola	N	13,4	11,7	14,3
Razlika usled stresa	N	-2,7	-4,9	-1,6
<b>% suve materije</b>				
Kontrola	%	11,2	10,0	12,5
Razlika usled stresa	%	4,2	0,8	7,1
<b>Sadržaj prolina</b>				
Kontrola	µg/g SM	83	46	161
Razlika usled stresa	%	+704	+221	+2855

Mod i HPDinterval su procene prosečne vrednosti i njihov interval poverenja.

HPD interval (highest probability density)-interval pouzdanosti u kom će se sa 95% verovatnoće nalaziti vrednost parametra

Potvrđena je pozitivna korelacija između prolina i % SM, SM i broja listova, % SM i broj listova (tabela 5.9.). Visok stepen korelacije između kontrole i biljaka izloženih nedostatku vode za ukupnu SM i broj listova potvrđuje da su efekti stresa jači na biljkama sa nižim prosečnim vrednostima za ove parametre, kao što je već prikazano na slici 5.10.

**Tabela 5.9.** Varijanse-kovarijanse (VCV) i korelacioni koeficijenti za uticaj nedostatka vode na genotipove šećerne repe za SM, broj listova, %SM i sadržaj prolina

	Suva masa	Broj listova/biljci	% Suve materije	Prolin u SM
<i>VCV i korelacije za kontrolu</i>				
Suva masa	<b>0,80</b>	0,19	0,25	-0,01
Broj listova/biljci	0,20	<b>1,39</b>	0,41	-0,06
% Suve materije	0,32	0,68	<b>1,94</b>	-0,06
Prolin u SM	-0,01	-0,06	-0,07	<b>0,74</b>
<i>VCV i korelacije za tretman</i>				
Suva masa	<b>0,95</b>	0,59	0,08	0,04
Broj listova/biljci	0,88	<b>2,34</b>	0,47	0,16
% Suve materije	0,27	2,60	<b>13,34</b>	0,66
Prolin u SM	0,05	0,35	3,45	<b>2,06</b>
<i>Korelacija za kontrolu-tretman</i>				
Suva masa	<b>0,37</b>	0,76	0,32	-0,09
Broj listova/biljci	0,94	<b>4,08</b>	0,26	-0,04
% Suve materije	0,28	0,74	<b>2,07</b>	0,15
Prolin u SM	-0,02	-0,03	0,07	<b>0,12</b>
<i>Unutarklasni koef. korelacije</i>				
Kontrola	0,38	0,18	0,11	0,25
Tretman	0,45	0,30	0,77	0,71

SM-suva materija

Varijanse su prikazane u glavnoj dijagonali (boldovane), kovarijanse u donjem levom, a korelacije u gornjem desnom trouglu.

Unutarklasni koeficijenti korelacije su merilo za genotipsku divergentnost i ovde je potvrđeno da je različitost genotipova veća za % SM i koncentraciju prolina nego za ukupnu SM i broj listova.

### 5.1.1. Uticaj suše na fotosintetske karakteristike testiranih genotipova

Fluorescencija hlorofila je veoma osetljiva na ekološke činioce i često se koristi kao unutrašnja kontrola fotosintetske reakcije i kao takva ima široku primenu.

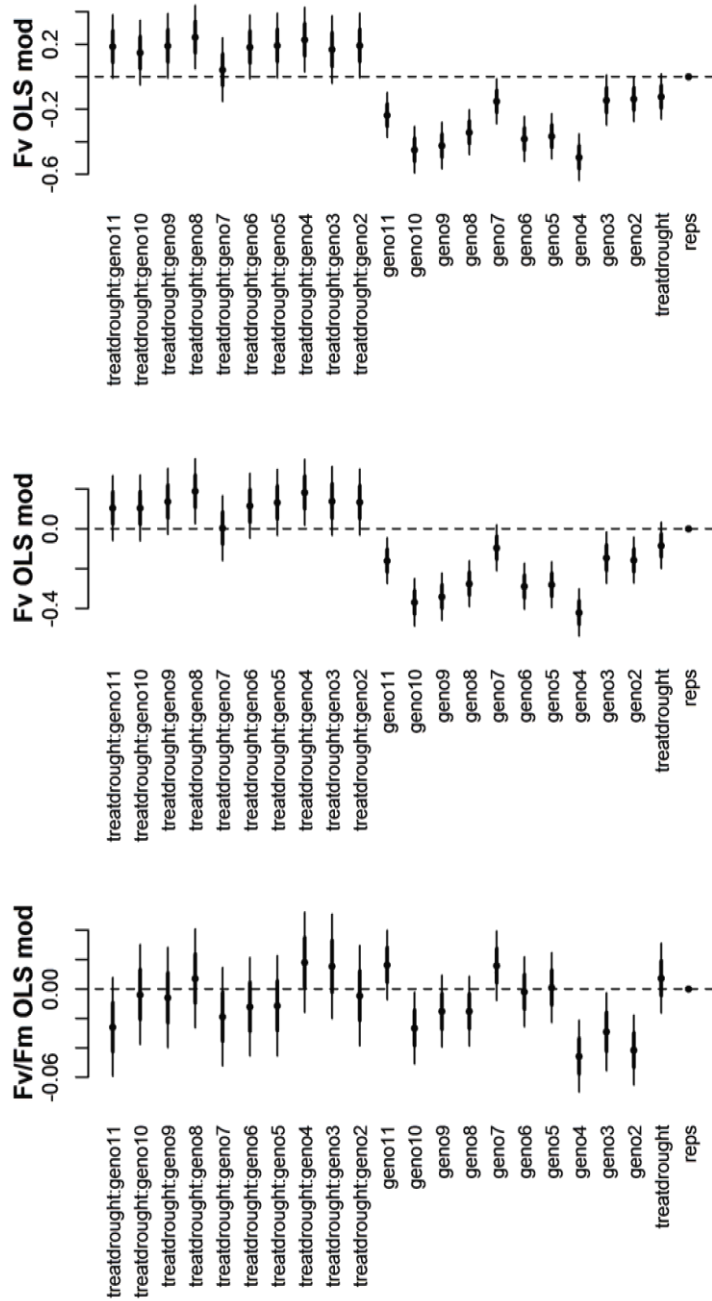
**Tabela 5.10.** Prosečne vrednosti parametara fluorescencije

Genotip	Tretman	$F_v/F_m$	$F_m$	$F_o$	$F_v$	$t_{1/2\text{ ms}}$
1	kontrola	0,762	1,44	0,34	1,10	88
	suša	0,769	1,32	0,31	1,02	78
2	kontrola	0,720	1,31	0,36	0,94	109
	suša	0,712	1,26	0,40	0,98	83
3	kontrola	0,740	1,30	0,34	1,06	115
	suša	0,755	1,34	0,33	1,01	108
4	kontrola	0,725	1,04	0,27	0,71	118
	suša	0,741	1,05	0,27	0,78	95
5	kontrola	0,763	1,08	0,29	0,82	104
	suša	0,756	1,14	0,28	0,81	92
6	kontrola	0,760	1,06	0,26	0,81	126
	suša	0,755	1,12	0,27	0,84	109
7	kontrola	0,778	1,29	0,28	1,01	109
	suša	0,766	1,21	0,27	0,93	110
8	kontrola	0,747	1,10	0,28	0,83	113
	suša	0,761	1,22	0,39	0,93	120
9	kontrola	0,746	0,98	0,26	0,76	133
	suša	0,748	1,09	0,27	0,81	137
10	kontrola	0,730	0,99	0,26	0,72	114
	suša	0,739	1,02	0,26	0,75	125
11	kontrola	0,778	1,21	0,27	0,94	111
	suša	0,759	1,27	0,31	0,96	127

( $F_o$ -nevarijabilna fluorescencija,  $F_m$ -maksimalna fluorescencija na P piku,  $F_v$ -varijabilna fluorescencija,  $F_v/F_m$ -fotohemijska efikasnost fotosistema II, t-vreme)

U ovom istraživanju stres izazvan nedostatkom vode inhibirao je transport elektrona kroz PS II (tabela 5.10.).

Parametri fluorescencije nisu pokazali značajne varijacije u uslovima stresa izazvanog nedostatkom vode, što se uočava na slici 5.12. Prosečni efekti suše marginalno su primetni za  $F_v$  i  $F_m$ , ali ne i za  $F_v/F_m$  odnos, gde su najveće razlike između genotipova (devijacije kontrole). Osim toga i preklapanje intervala interakcije stres x genotip, označava da je stres koji uzrokuje razlike u ovom slučaju sličan za sve genotipove.

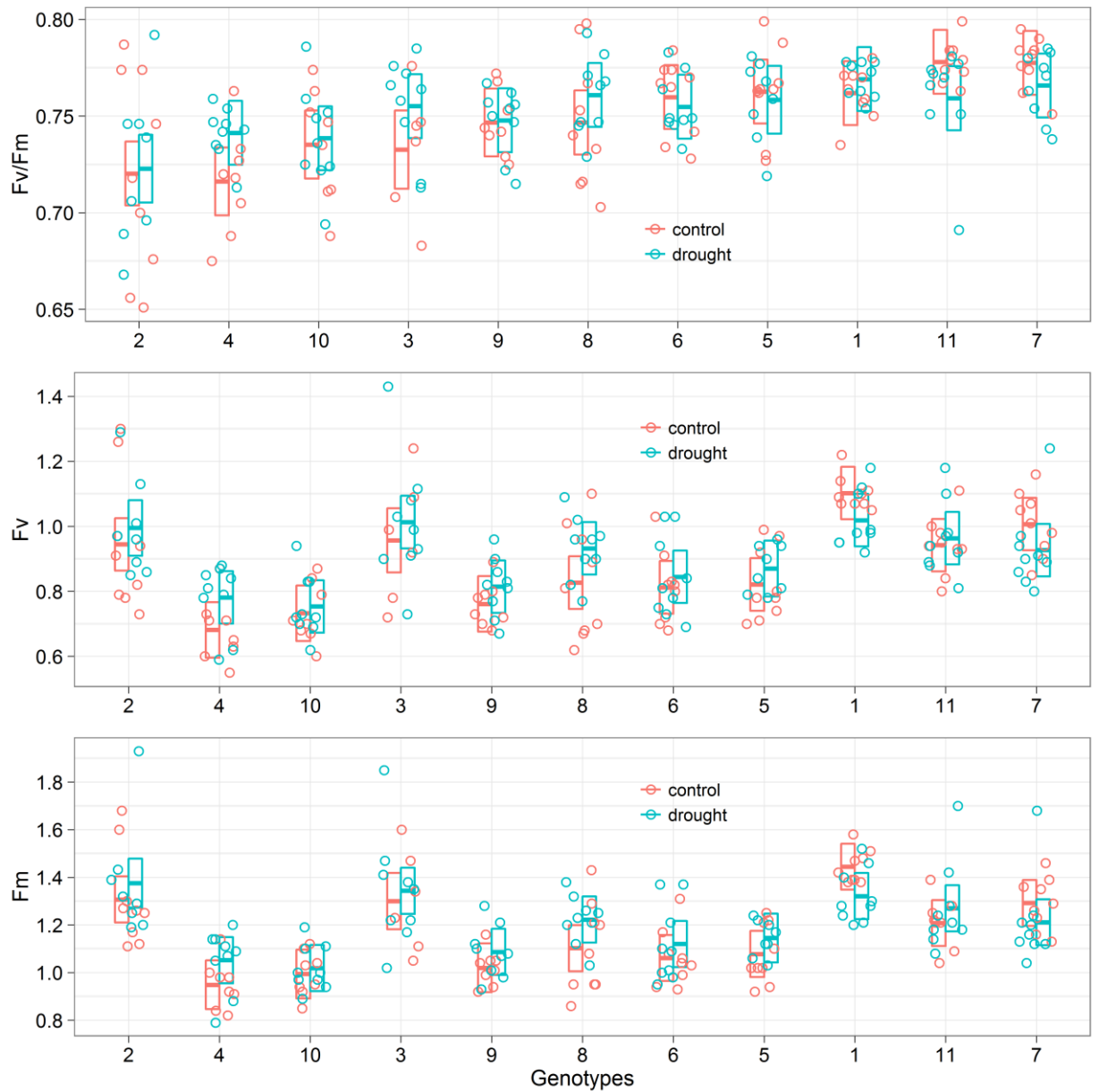


**Slika 5.12.** ANOVA za OLS model za parametre fluorescencije.

Horizontalne linije na slici predstavljaju 80% i 95% intervale poverenja za posmatrane efekte (treatdrought-tretman (nedostatak vode), geno-oznaka genotipa)



Očekivane vrednosti su predstavljene na slici 5.13., gde se jasno uočava da neki genotipovi imaju veću maksimalnu  $F_m$ ,  $F_v$  i  $F_v/F_m$  vrednost i da vodni stres ne menja ove parametre u značajnoj meri.



**Slika 5.13.** Predviđanja na osnovu OLS modela za parametre fluorescencije

95% interval poverenja prikazan pravougaonicima i originalna očitavanja prikazana krugovima.

(control-kontrola; drought-nedostatak vode; genotypes-oznaka genotipa)

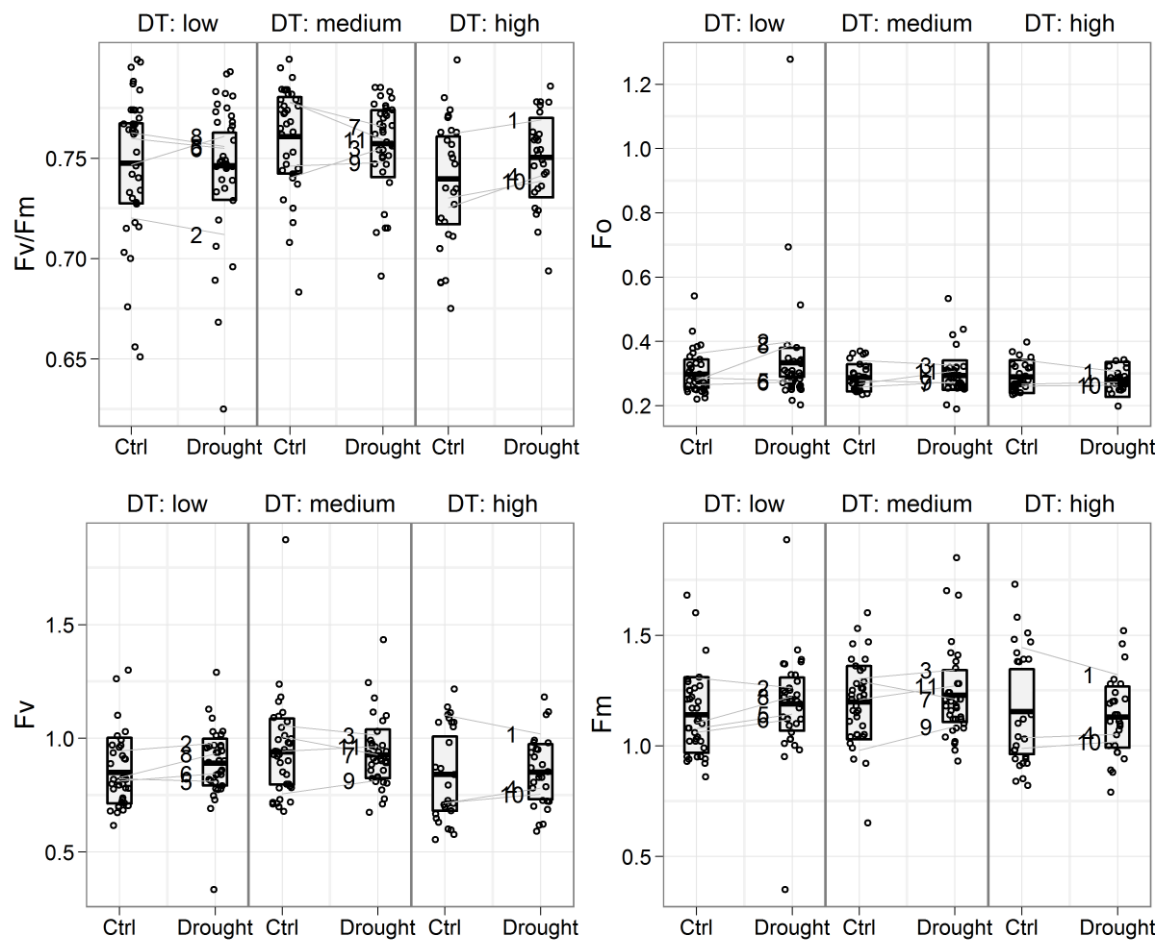
Visok koeficijent unutarklasne korelacije utvrđen je za  $F_v$  i  $F_m$ , a nizak za  $F_v/F_m$  što potvrđuje da je ovaj poslednji parametar više varira u okviru genotipova usled uticaja nedostatka vode. Varijanse parametara fluorescencije su prikazane u tabeli 5.11.

**Tabela 5.11.** Varijansa, kovarijansa i korelacije (mod i HPD interval) za parametre fluorescencije.

Parametar	Mod	HPD Interaval	
<i>F<sub>v</sub> varijansa</i>			
između genotipova	0,1841	0,0797	0,4506
unutar genotipa	0,0244	0,0213	0,0321
<i>F<sub>m</sub> varijansa</i>			
između genotipova	0,1683	0,0798	0,4980
unutar genotipa	0,0324	0,0269	0,0408
<i>F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub> varijansa</i>			
između genotipova	0,0002	0,0001	0,0006
unutar genotipa	0,0007	0,0005	0,0008
<i>F<sub>v</sub>,F<sub>m</sub> kovarijansa</i>			
između genotipova	-0,0109	-0,1651	0,2021
unutar genotipa	0,0166	0,0129	0,0231
<i>Unutarklasni koeficijenti korelacije</i>			
F <sub>v</sub>	0,90	0,80	0,96
F <sub>m</sub>	0,88	0,76	0,96
F <sub>v</sub> /F <sub>m</sub>	0,22	0,09	0,50

(F<sub>m</sub>-maksimalna fluorescencija na P piku, F<sub>v</sub>- varijabilna fluorescencija, F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub>- fotohemijska efikasnost fotosistema II, HPD interval (highest probability density)-interval pouzdanosti u kom će se sa 95% verovatnoće nalaziti vrednost parametra)

Uticaj nedostatka vode na parametre fluorescencije se može povezati sa ispoljavanjem tolerantnosti prema nedostatku vode u poljskim uslovima gde su genotipovi podeljeni, takode, u 3 grupe (slika 5.14.).

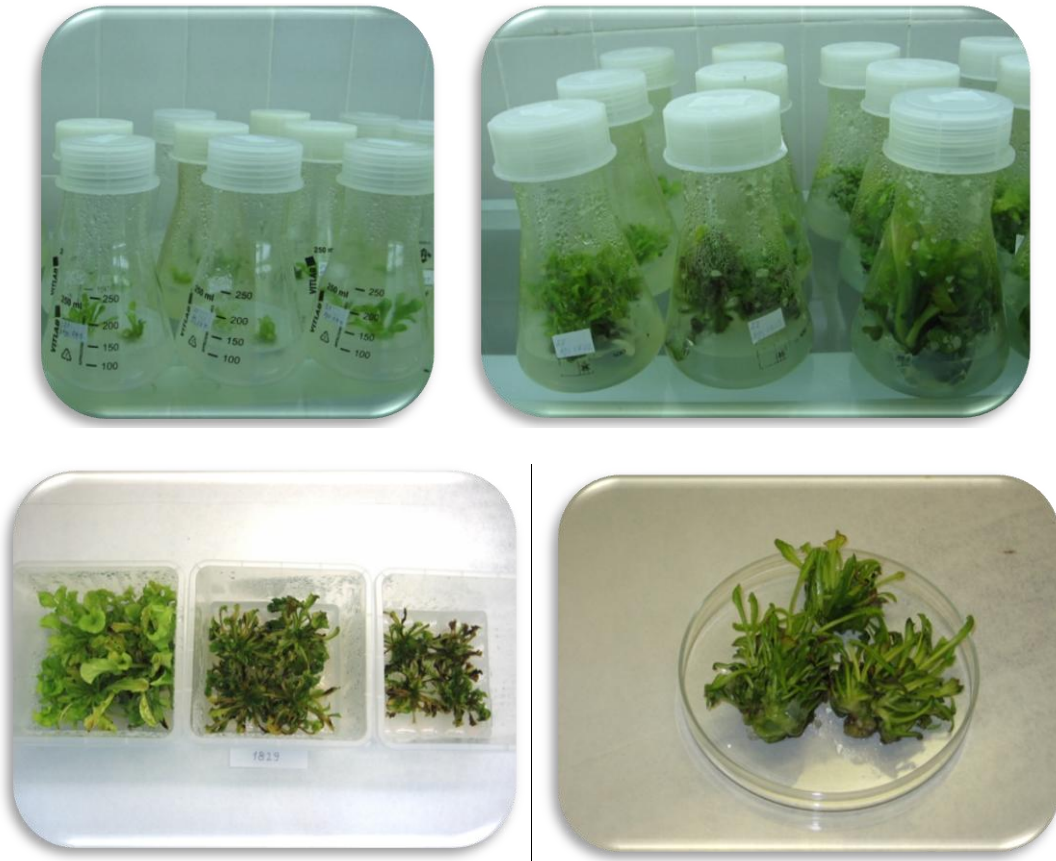


**Slika 5.14.** Parametri fluorescencije ( $F_m$ ,  $F_v$  i  $F_v/F_m$ ) iskazani u odnosu na podelu genotipova prema tolerantnosti na nedostatak vode u poljskim uslovima

(Ctrl-kontrola; Drought-nedostatak vode; DT-tolerantnost prema nedostatku vode; low-niska; medium-srednja; high-visoka)

## 5.2. Eksperiment u kontrolisanim uslovima (kultura tkiva)

Sa povećanjem koncentracije PEG-a genotipovi su ispoljili manji rast aksilarnih pupoljaka u odnosu na kontrolu, došlo je do pojave nekroze i vitrifikacije (slika 5.15.).



**Slika 5.15.** Genotipovi šećerne repe u kontrolisanim uslovima

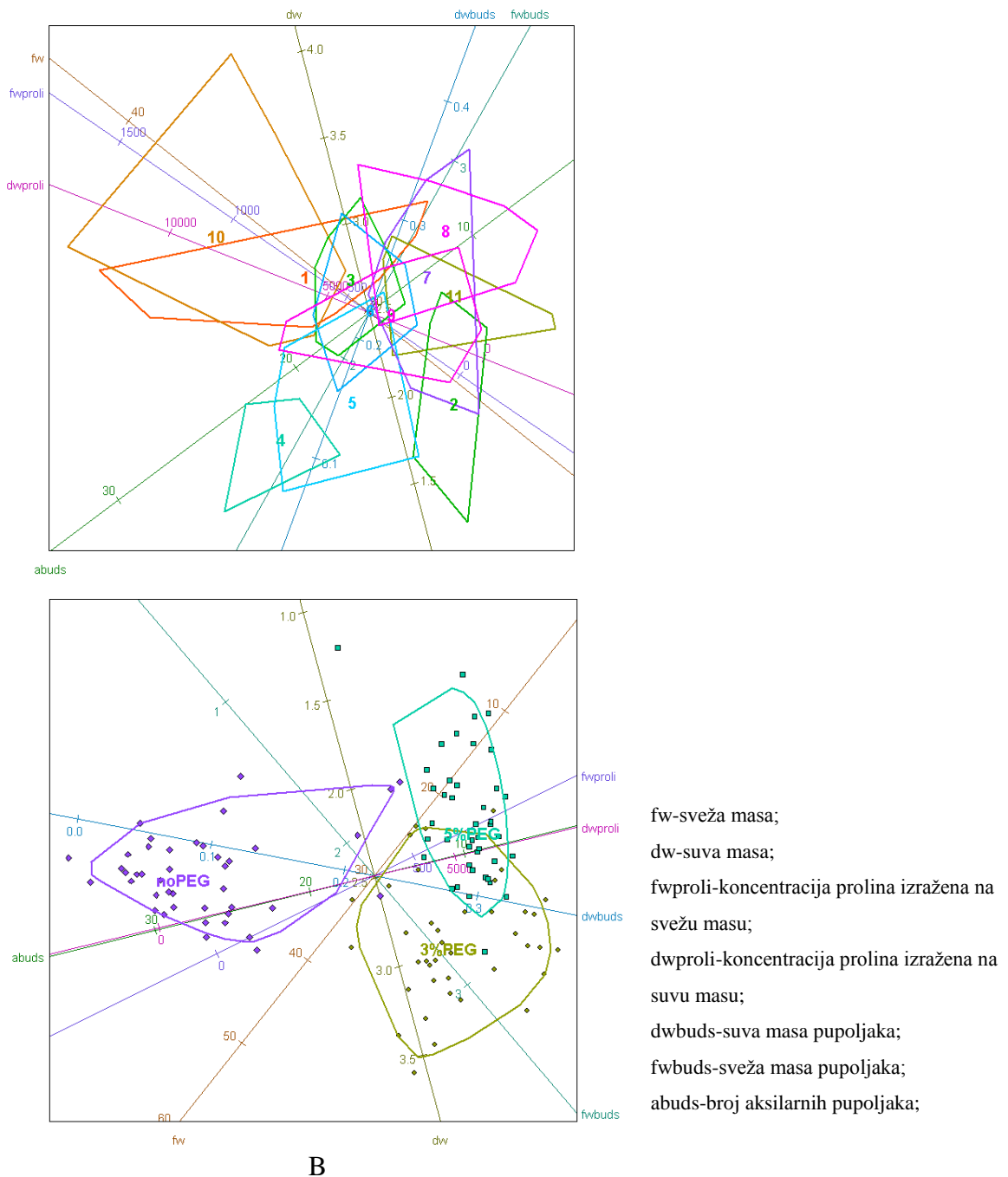
U ogledu *in vitro* na podlogama sa različitim koncentracijama PEG-a određivani su parametri porasta: broj aksilarnih izdanaka, sveža masa izdanaka, sadržaj suve materije kao i koncentracija prolina u izdancima (tabela 5.12.).

**Tabela 5.12.** Prosečne vrednosti broja aksilarnih pupoljaka, sveže mase, % SM i koncentracije prolina u eksperimentu u kontrolisanim uslovima

Genotip	Tretman	Prosečan broj aksilarnih pupoljaka	Prosečna masa jednog izdanka (g)	% suve materije kod 4 izdanka	µg prolina/g suve mase
1	kontrola	20,75	2,22	6,52	632,42
	3% PEG	9,50	3,25	10,75	16910,07
	5% PEG	10,33	2,48	11,22	8302,80
2	kontrola	16,00	1,73	4,53	1049,45
	3% PEG	11,50	2,56	8,82	517,90
	5% PEG	6,25	2,61	9,71	3666,69
3	kontrola	31,00	1,67	5,29	851,21
	3% PEG	16,50	1,99	9,83	2112,93
	5% PEG	11,25	2,40	10,59	5508,59
4	kontrola	38,00	0,99	4,65	1553,45
	3% PEG	18,33	1,31	8,68	5162,68
	5% PEG	15,00	1,27	9,89	6317,47
5	kontrola	35,50	1,10	5,00	1214,46
	3% PEG	10,75	3,57	8,21	4948,45
	5% PEG	8,50	2,10	9,30	5590,05
6	kontrola	26,50	1,46	5,93	845,26
	3% PEG	16,00	2,16	9,98	1459,12
	5% PEG	13,25	1,39	13,59	1226,99
7	kontrola	11,75	1,84	9,02	926,00
	3% PEG	7,00	3,46	12,57	6917,53
	5% PEG	7,25	2,27	15,79	5169,81
8	kontrola	23,00	2,07	5,42	608,04
	3% PEG	6,75	3,89	12,68	1909,26
	5% PEG	8,00	2,50	14,76	5385,13
9	kontrola	31,75	1,28	6,30	694,04
	3% PEG	9,75	2,78	10,32	2041,23
	5% PEG	8,50	2,69	12,39	3503,27
10	kontrola	30,00	1,37	6,66	702,18
	3% PEG	10,75	3,01	11,36	15407,24
	5% PEG	8,00	2,97	13,28	13573,50
11	kontrola	19,50	2,21	5,34	932,37
	3% PEG	12,00	2,64	10,74	1198,66
	5% PEG	7,50	2,53	12,65	1566,35

Broj aksilarnih izdanaka po ponavljanju može da ukaže na to kako različite koncentracije PEG, koji izaziva nedostatak vode, utiču na potencijal za mikropropagaciju pojedinih genotipova. Prosečne vrednosti (tabela 5.12.) broja aksilarnih izdanaka 11 testiranih genotipova pokazuju da se broj izdanaka smanjuje 2,2 puta u prisustvu 3% PEG-a, a 2,73 puta u prisustvu 5% PEG-a.

Biplotovi za ogled u kontrolisanim uslovima (za originalne promenljive) su prikazani na slici 5.16. (dijagrami A i B).



**Slika 5.16.** Razdvajanja genotipova na osnovu ogleđa u *in vitro* uslovima na 0, 3 i 5 % PEG (A), i grupisanje na bazi PEG tretmana (B)

Analizom parametara (sveža i suva masa, % suve materije, broj aksilarnih pupoljaka, suva i sveža masa aksilarnih pupoljaka, i sadržaj prolina izražen na svežu i suhu masu) dobijena je linearna funkcija PEG nivoa, sa varijansom i kovarijansom

(VCV) za devijaciju komponenti genotipova po tretmanima procenjenih na osnovu tri nivoa PEG (tabela 5.13.).

Razlike između genotipova su veće u odnosu na suhu masu aksilarnih pupoljaka i ukupnu suhu masu, bez obzira na tretman PEG-om, u odnosu na broj aksilarnih pupoljaka i ukupnu svežu masu. Često postoji inverzija između kontrole (0% PEG) i 3% PEG-a, dok paralelizam preovlađuje između 3% i 5% PEG-a. Inverzija pokazuje da genotipovima sa nižim vrednostima kod kontrole odgovara relativno povećanje na 3% PEG-u, i obrnuto. Paralelizam između 3% i 5% PEG-a dokazuje da se ne nastavlja dalji porast na 5% PEG, odnosno da se efekat ne povećava linearno sa porastom koncentracije PEG-a.

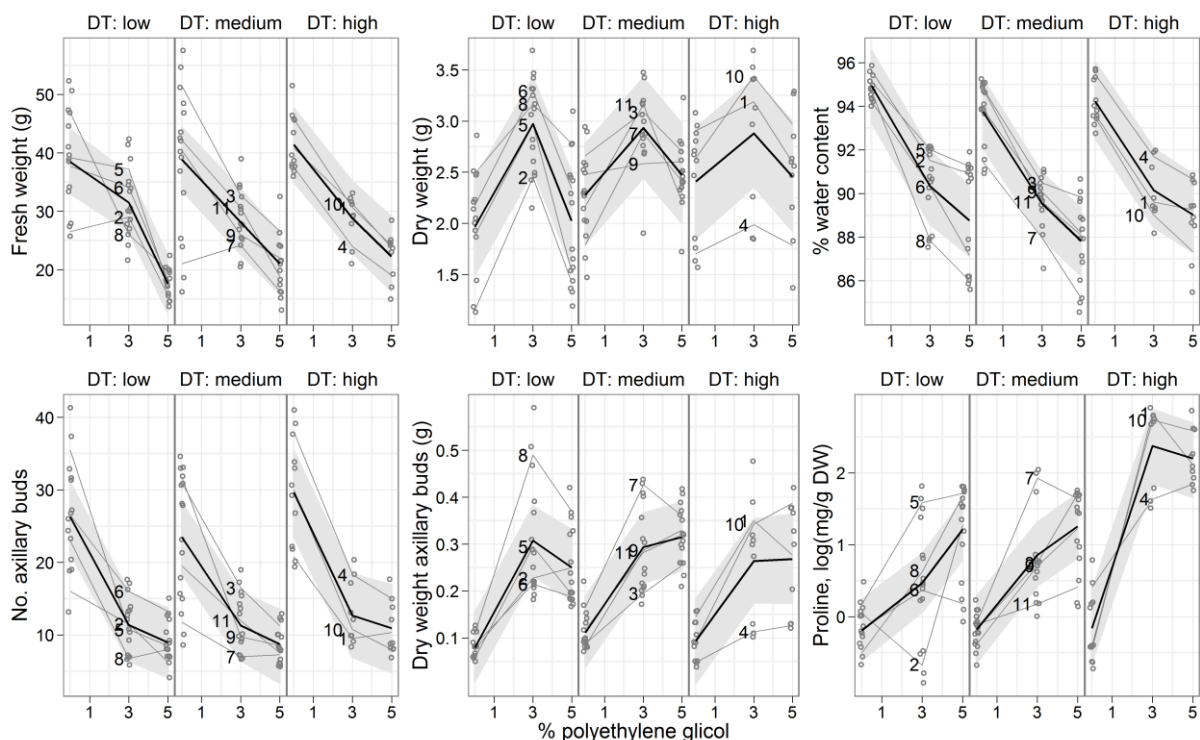
Efekat suše kod genotipova gajenih u kontrolisanim uslovima (slika 5.17.) pokazuje da je ocena tolerantnosti u uslovima ovog *in vitro* eksperimenta u saglasnosti sa ocenom u poljskim uslovima. Najveće razlike među grupama, na osnovu procene tolerantnosti u polju, se mogu konstatovati kod koncentracije slobodnog prolina.

**Tab 5.13.** Varijansa-kovarijansa, značajnost, HPD interval varijanse i % genotipskog udela za ogled *in vitro* procenjena mešovitim modelima i Monte Karlo metodom

Tretman	Srednje vrednosti		Matrica varijanse-kovarijanse				95% HPD interval varijanse		% Udela genotipa
	Ocena	95% HDP interval	kontrola	3% PEG	5% PEG				
Suva masa (g)									
kontrola	2,12	1,67	2,61	0,43			0,17	1,25	86
3% PEG	2,95	2,44	3,37	0,04	0,32		0,18	1,11	82
5% PEG	2,26	1,87	2,76	0,16	0,07	0,49	0,19	1,27	88
Rezidualna var.						0,07	0,05	0,10	
Sveža masa (g)									
kontrola	39,3	34,0	44,6	57,00			21,98	154,69	75
3% PEG	29,9	27,0	31,9	8,26	5,96		0,55	23,38	24
5% PEG	20,2	17,8	22,3	16,01	2,67	6,65	1,35	24,82	26
Rezidualna var.						18,55	14,12	25,41	
% Suve materije									
kontrola	5,6	4,9	6,6	1,14	0,81	0,87	0,43	3,49	75
3% PEG	9,9	9,1	11,0	0,81	1,48	2,03	0,75	4,81	80
5% PEG	11,4	10,1	12,7	0,87	2,03	3,52	1,55	9,37	90
Rezidualna var.						0,38	0,29	0,52	
Broj aksilarnih pupoljaka									
kontrola	22,9	15,3	34,8	1,38			1,17	2,61	57
3% PEG	12,0	7,4	16,6	1,07	1,41		1,16	2,59	58
5% PEG	9,9	6,1	13,3	1,03	1,06	1,34	1,15	2,33	56
Rezidualna var.						1,03	1,02	1,04	
Aksilarni pupoljci sveža masa (g)									
kontrola	1,58	1,16	2,07	0,35	0,10	0,06	0,17	1,04	66
3% PEG	2,88	2,19	3,44	0,10	0,71	0,16	0,26	2,06	80
5% PEG	2,23	1,77	2,73	0,06	0,16	0,40	0,19	1,23	69
Rezidualna var.						0,18	0,14	0,25	
Aksilarni pupoljci suva masa (g)									
kontrola	0,092	-0,245	0,413	0,225	0,013	0,002	0,097	0,640	99
3% PEG	0,305	-0,076	0,630	0,013	0,284	-0,031	0,112	0,656	99
5% PEG	0,346	-0,064	0,625	0,002	-0,031	0,218	0,103	0,683	99
Rezidualna var.						0,002	0,001	0,003	
Prolin (µg/g sveže mase)									
kontrola	51	33	72	1,42			1,16	2,35	58
3% PEG	294	132	669	1,04	2,74		1,75	36,07	73
5% PEG	557	295	855	1,00	1,59	1,90	1,37	5,98	65
Rezidualna var.						1,03	1,03	1,05	
Prolin (µg/g suve mase)									
kontrola	833	587	1248	1,38			1,12	2,28	57
3% PEG	2942	1394	6346	0,90	3,27		1,67	25,74	76
5% PEG	4336	2588	7714	1,00	1,42	1,79	1,32	5,94	63
Rezidualna var.						1,04	1,03	1,05	

Varijansa genotipova je prikazana na glavnoj dijagonali VC matrice, u formi trougla. U krajnjoj desnoj koloni izražna je u procentima od ukupne varijanse.



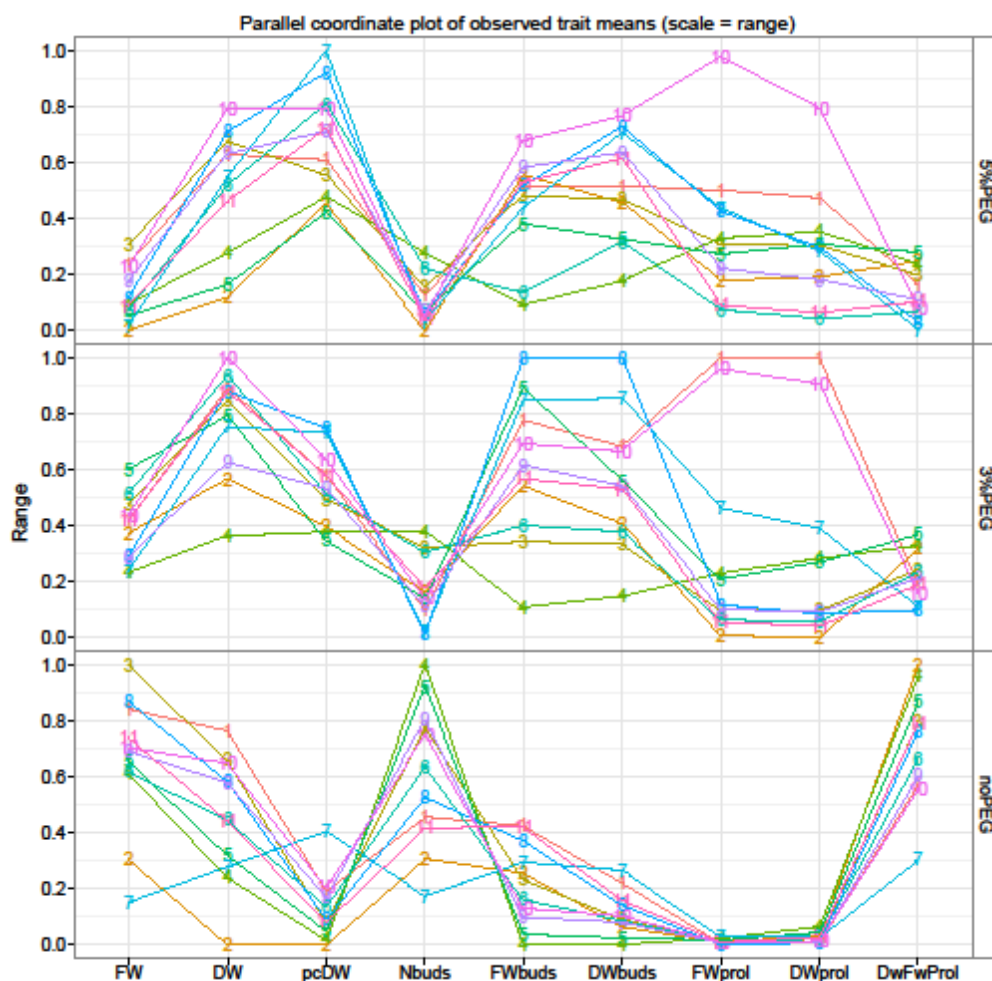


**Slika 5.17.** Efekti stresa izazvani tretmanom PEG-a na osobine rasta i produkciju prolina kod biljaka gajenih u kontrolisanim uslovima

(Fresh weight-sveža masa; Dry weight-suva masa; % water content-sadržaj vode u %; No. axillary buds-broj aksilarnih pupoljaka; Dry weight axillary buds-suva masa aksilarnih pupoljaka; Proline, log (mg/g DW)-koncentracija prolina, logaritamska transformacija; DT-tolerantnost prema nedostatku vode; low-niska; medium-srednja; high-visoka)

Genotipovi su raspoređeni u tri klase na osnovu vizuelno procenjene tolerantnosti prema suši u polju (DT). Sive linije predstavljaju prosečne pozicije genotipova. Siva linija povezana crnom predstavlja klasnu značajnost sa 95% intervalima poverenja.

Kako je cilj celokupnog istraživanja pronalaženje parametra koji bi bio najadekvatniji indikator tolerancije prema suši, upoređen je uticaj nedostatka vode na biomasu (cele biljke i aksilarnih pupoljaka) sa uticajem na koncentraciju prolina i odnos biomase i koncentracije prolina. Sinteza posmatrane interakcije genotip x tretman je u grafikonu paralelnih koordinata prikazana na slici 5.18. Ova vrsta prikaza je alternativa biplotu gde su varijable upoređene na paralelnoj osi, dok su genotipovi prikazani povezanim linijama. Za svrhu poređenja različitih reakcija genotipova, vrednosti su ujednačene i kreću se u opsegu 0:1 uzimajući u obzir tretman x genotip.



**Slika 5.18.** Grafikon paralelnih koordinata za biomasu uzoraka šećerne repe i sadržaj prolina uslovljenih PEG tretmanima

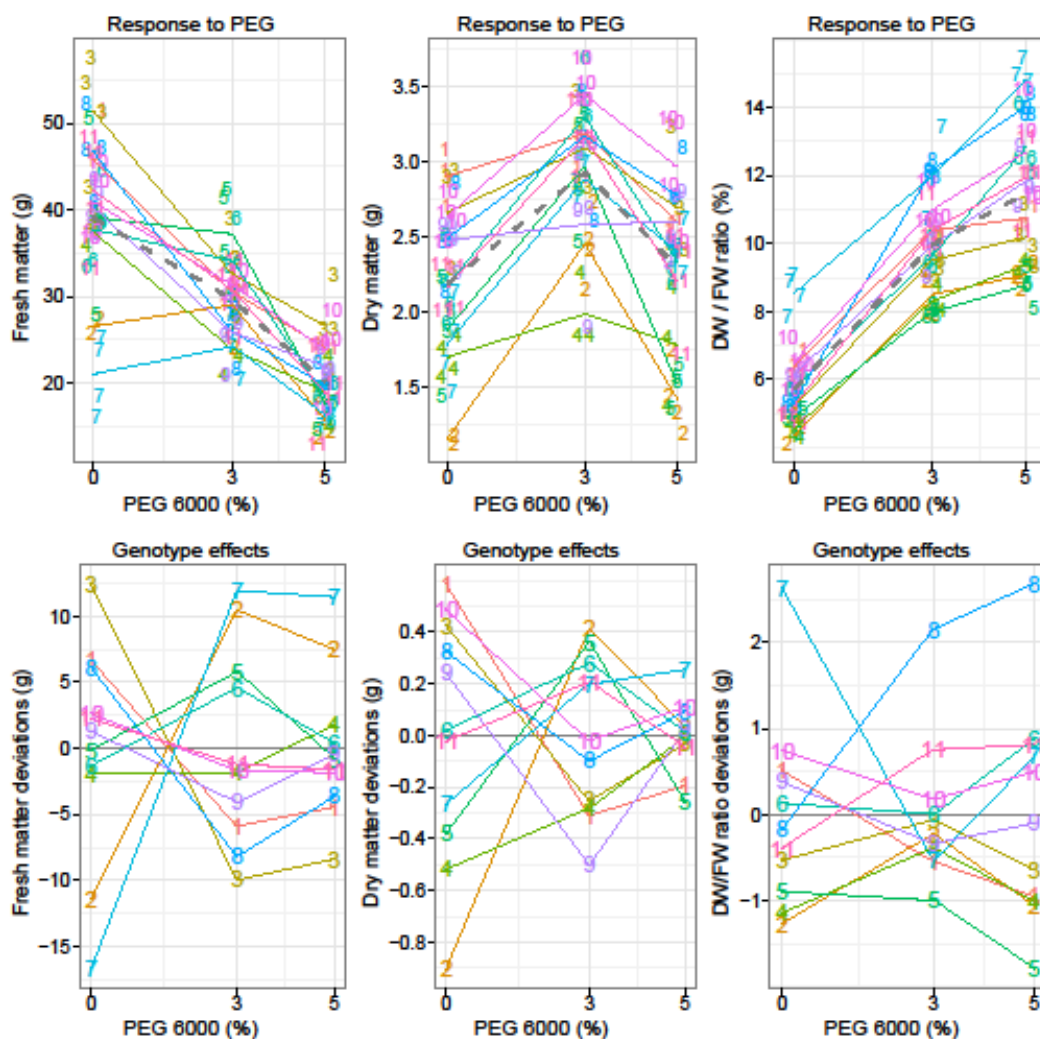
(FW-sveža masa, DW-suva masa, pcDW-% suve materije, Nbuds-broj aksilarnih izdanaka, FWbuds-sveža masa aksilarnih izdanaka, DWbuds-suva masa aksilarnih izdanaka, FWprol-sveža masa i koncentracija prolina (interakcija), DWprol-suva masa i koncentracija prolina (interakcija), DwFwProl-suva, sveža masa i koncentracija prolina (interakcija))

Uočava se da u odnosu na kontrolu (0% PEG), pri tretmanu 3% PEG-om dolazi do povećanja raspona razlika između genotipova u odnosu na sadržaj prolina (uglavnom zbog velikog uvećanja za genotip 1 i 10), zatim za masu aksilarnih pupoljaka i %SM, ali se raspon razlika smanjuje za broj aksilarnih pupoljaka i svežu masu biljaka, dok na suhu masu nema vidljiv uticaj. Ovo implicira da je sinteza prolina u pozitivnoj korelaciji sa formiranjem aksilarnih pupoljaka, ali ne i sa ukupnom biomasom. Kod PEG tretmana došlo je do očiglednog povećanja % suve materije. Postoje male varijacije između 3% i 5% PEG-a, a ono što ih bitnije razlikuje je varijabilnost koja je uticala na zakrivljenost do koje je došlo na 3% PEG-u. Genotipovi 1 i 10 su imali

najveću sintezu prolina i najveći sadržaj suve mase izdanaka pod tretmanom 5% PEG-a. Genotip 1 je na 3% PEG imao najveću vrednost suve mase. Varijabilnost ove osobine nije indukovana PEG tretmanom.

Urađena je analiza metodom najmanjih kvadrata s ciljem da se minimizira zbir kvadrata odstupanja podataka od prave koja bi najbolje aproksimirala skup podataka (slika 5.19.). Efekti 3% i 5% PEG-a odstupaju od odgovarajućih vrednosti kod kontrole. Na primer, genotip 2 (slika 5.19. donji panel, drugi dijagram) pokazuje pozitivnu devijaciju za suhu masu na 3% PEG-u, iako je njegov nivo suve mase među najnižim (sa genotipom 4 i 9), jer je povećanje kod 0% PEG-a i 3% PEG-a (nagib odgovarajućeg panela gore) iznad prosečnog povećanja uzorka (trend isprekidane linije).

Tretman PEG-om je imao pozitivan prosečan uticaj na suhu masu u koncentraciji od 3% dok je u koncentraciji od 5% pozitivan na ukupnu suhu masu i negativan uticaj na ukupnu svežu masu, odnosno smanjio se sadržaj vode i rast (slika 5.19.).



**Slika 5.19.** Ukupna sveža i suva masa i odnos suve i sveže mase pod uticajem PEG-a

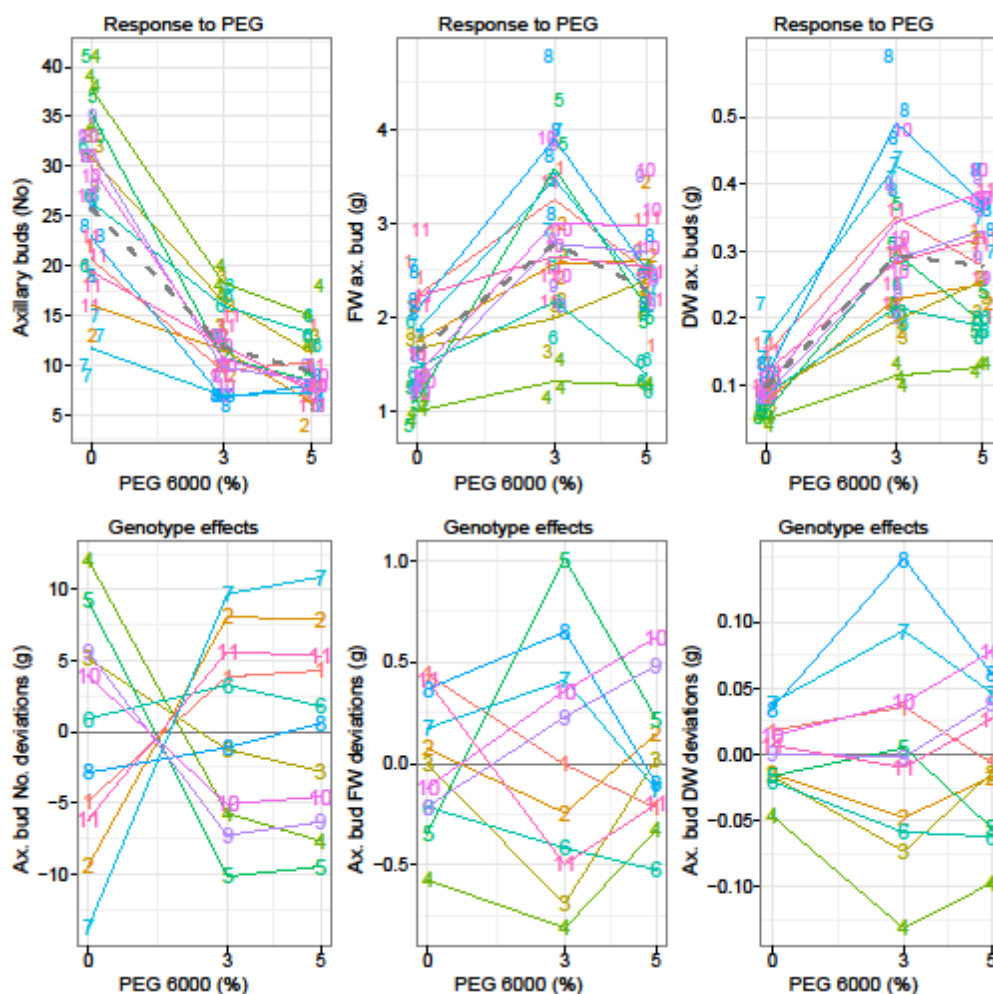
(fresh matter-sveža masa; Dry matter-suva masa; DW/FW ratio-odnos suve i sveže mase; Fresh matter deviations-odstupanja za svežu masu; Dry matter deviations-odstupanja za suhu masu; DW/FW ratio deviations-odstupanja odnosa suve i sveže mase; response PEG-reakcija na PEG; genotype effects-genotipski uticaj)

Isprekidana siva linija označava prosek koji odgovara za sve testirane genotipove (Slika 5.19. gornji panel). U donjem panelu su odstupanja genotipova u odnosu na koncentraciju PEG, povezana linijama za lakšu identifikaciju profila.

Genotipovi su na ovaj način jasno razdvojeni u odnosu na kontrolu, u smislu ukupne suve i sveže mase, ali rangiraju se potom i po parametrima. Postojala je inverzija uticaja na genotip pod tretmanom PEG-a, sa manjom masom i to smanjivanjem mase po biljci. Na genotipove 7, 2, 8 i 3 više je uticao tretman PEG-om.

Sveža i suva masa aksilarnih pupoljaka povećale su se pod uticajem 3% PEG-a, ali ne i daljim povećanjem koncentracije PEG, dok je broj izdanaka smanjen na podlozi sa 3% PEG-a, a nešto više na podlozi sa 5% PEG-a (slika 5.20.). Podaci dobijeni za svežu i suhu masu ukazuju da se udeo suve materije u izdanaku ne menja pod uticajem

PEG-a. Efekat PEG tretmana se čini manjim, kod težih aksilarnih pupoljaka. Efekat genotipa je izražen pojedinačno kod mase aksilarnih pupoljaka.

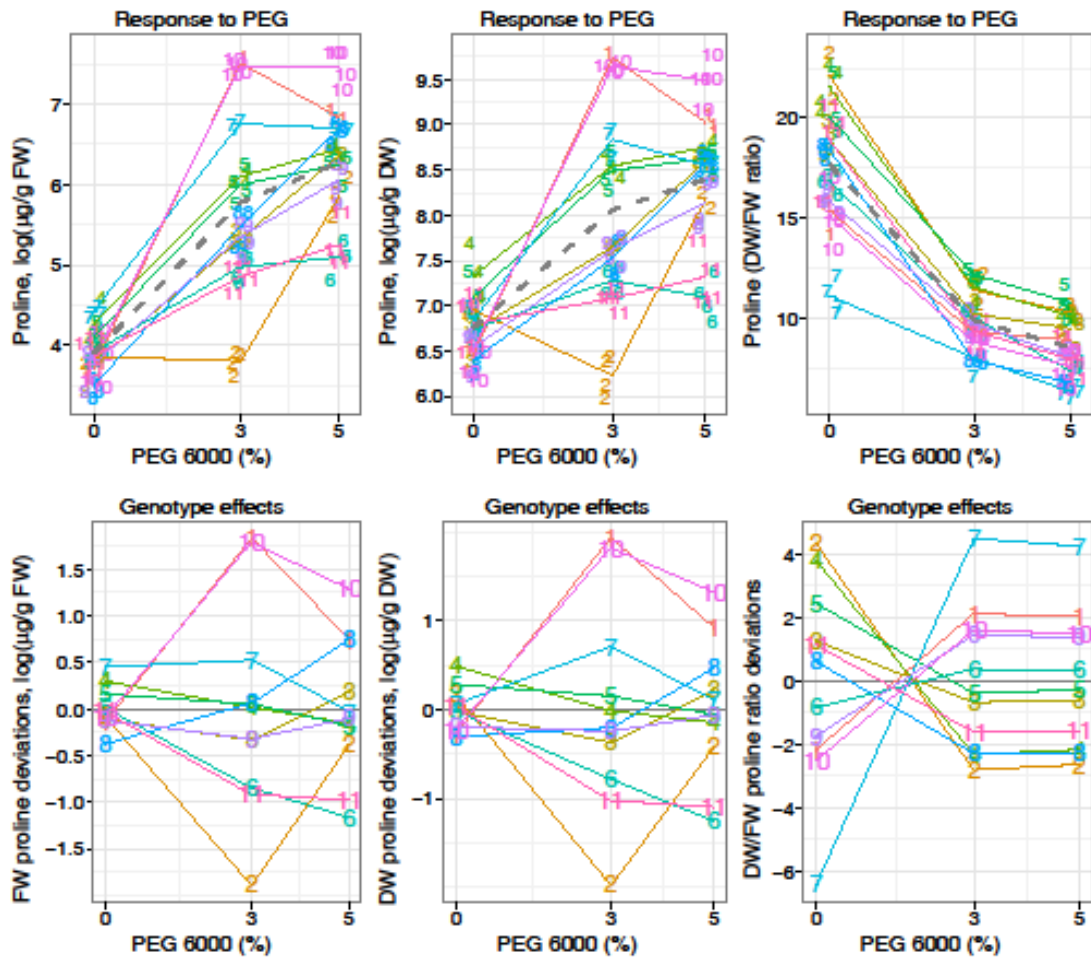


**Slika 5.20.** Reakcija aksilarnih izdanaka na PEG tretman

(axillary buds (No)-broj aksilarnih pupoljaka; FW ax. buds-sveža masa aksilarnih pupoljaka; DW ax. buds-suva masa aksilarnih pupoljaka; Ax. bud No. deviations-odstupanja broja aksilarnih pupoljaka; Ax. bud FW. deviations-odstupanja sveže mase aksilarnih pupoljaka; Ax. bud DW. deviations-odstupanja suve mase aksilarnih pupoljaka; response PEG-reakcija na PEG; genotype effects-genotipski uticaj)

Rangiranje genotipova se razlikuje u zavisnosti od analiziranog parametra. Tako je broj aksilarnih pupoljaka gotovo obrnuto proporcionalan suvoj i svežoj masi izdanaka. Osim toga genotipovi se razlikuju i po reakciji na tretmanu, širi raspon vrednosti je dobijen za 3% PEG. Prosečna log reakcija je pozitivna i približno eksponencijalna za sintezu prolina u opsegu PEG eksperimenta, ali genotipovi se međusobno znatno razlikuju (slika 5.21.).

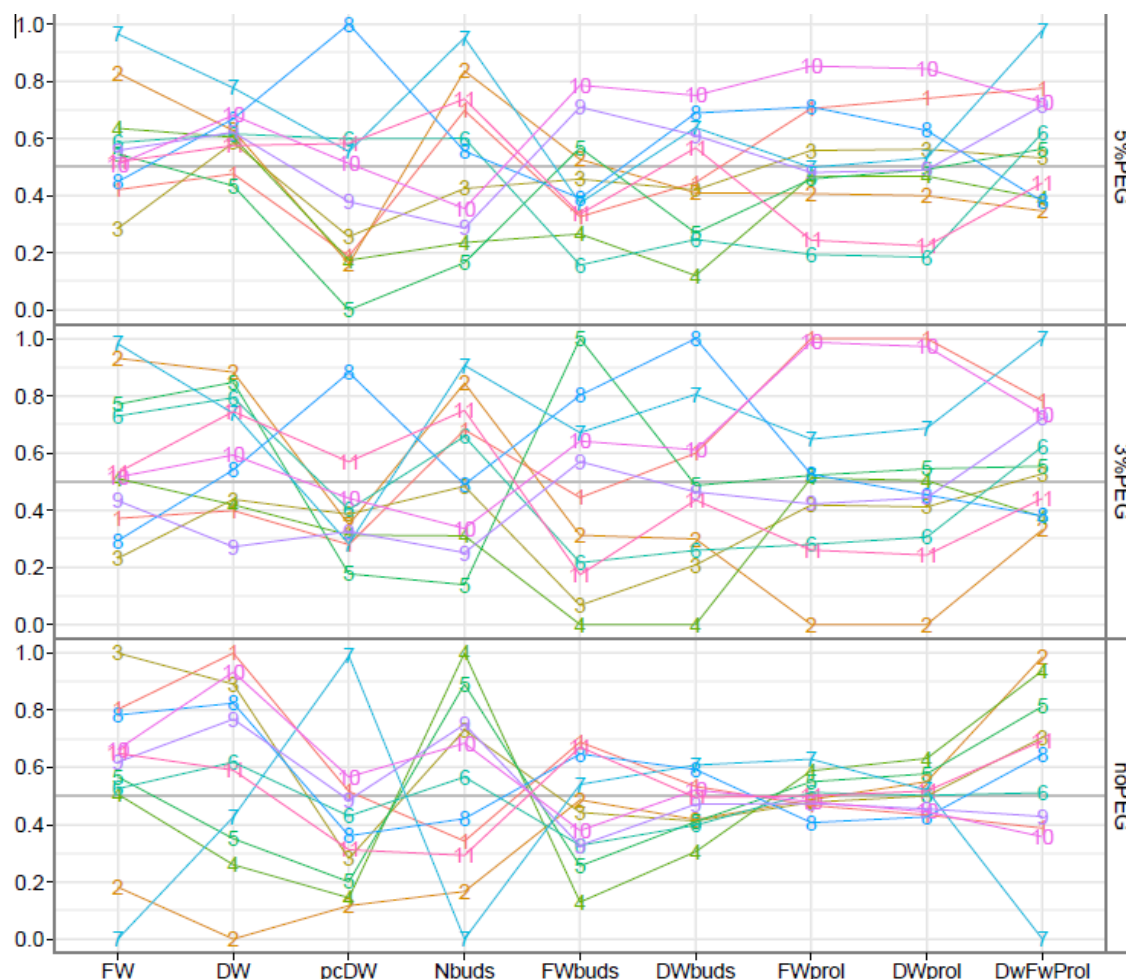
Genotipovi 1 i 10 stvaraju više, a 2, 6 i 11 manje od prosečne količine prolina pod uticajem PEG, posebno 3%.



**Slika 5.21.** Produkcija prolina u zavisnosti od PEG tretmana

(Proline, log (μg/gFW)-koncentracija prolina, logaritamska transformacija (μg/g sveže mase); Proline, log (μg/gDW)-koncentracija prolina, logaritamska transformacija (μg/g suve mase); Proline (DW/FW ratio)-koncentracija prolina (odnos suve i sveže mase); FWproline deviations, log (μg/gFW)-sveža masa-prolin odstupanja, logaritamska transformacija (μg/g sveže mase); DW proline deviations, log (μg/gDW)-suva masa-prolin odstupanja, logaritamska transformacija (μg/g suve mase); DW/FW proline ratio deviations- odstupanja odnosa sveže i suve materije i koncentracije prolina; response PEG-reakcija na PEG; genotype effects-genotipski uticaj)

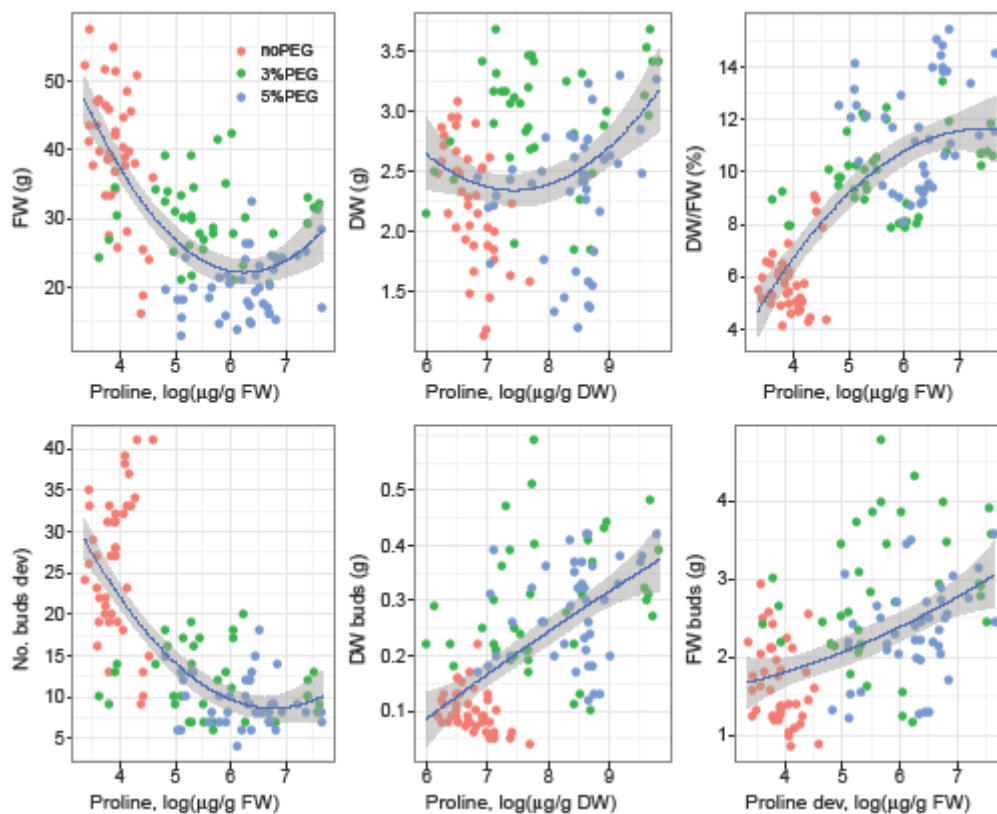
Za rangiranje genotipova, prolin kao potencijalni parametar-indikator tolerantnosti prema suši je adekvatniji od ukupne suve mase, što se može uočiti u paralelno koordiniranom plotu (slika 5.22.).



**Slika 5.22.** Grafikon paralelnih koordinata uticaja na biomasu i prolin kod testiranih genotipova šećerne repe kod kontrole i pod tretmanom 3% i 5% PEG-a

(Range-opseg; noPEG-kontrola; FW-sveža masa; DW-suva masa; pcDW-% suve materije; Nbuds-broj pupoljaka; FWbuds-sveža masa pupoljaka; DWbuds-suva masa pupoljaka; FWprol-koncentracija prolina i sveža masa interakcija; DWprol-koncentracija prolina i suva masa (interakcija); DwFwprol-koncentracija prolina, suva i sveža masa (interakcija))

Pod uticajem PEG tretmana dobijene su različite koncentracije prolina, kao i odnos biomase i koncentracije prolina (slika 5.23.).



**Slika 5.23.** Dijagram disperzije analize sadržaja biomase i koncentracije prolina sa visokom kvadratnom prilagođenošću (95% značajnost)

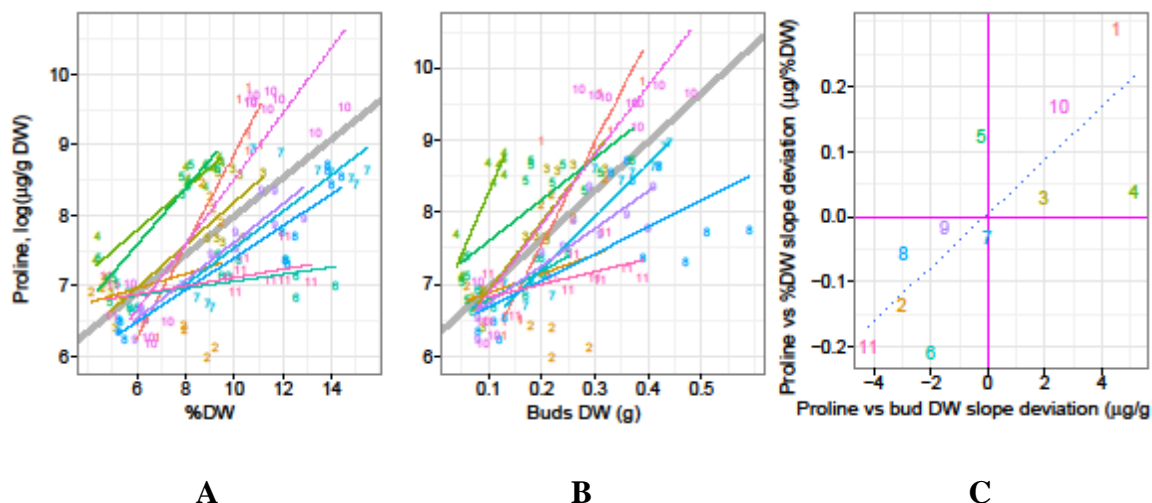
(noPEG-kontrola; Proline, log ( $\mu\text{g/gFW}$ )-koncentracija prolina, logaritamska transformacija ( $\mu\text{g/g}$  sveže mase); Proline, log ( $\mu\text{g/gDW}$ )-koncentracija prolina, logaritamska transformacija ( $\mu\text{g/g}$  suve mase); FW-sveža masa; DW-suva masa; No buds dev-devijacije broja pupoljaka; DW buds- suva masa pupoljaka; FW sveža masa pupoljaka)

Posmatranjem dva vrlo povezana parametra, %SM i SM aksilarnih pupoljaka u odnosu na koncentraciju prolina ustanovljena je različita reakcija genotipova u ovim odnosima. Svaki od ovih parametara je prikazan kao linearna funkcija koja je analizirana mešovitim linearnim modelom (slika 5.24. (A, B, C)).

Odnos koncentracije prolina i % suve materije i suve mase izdanaka, ima sličan oblik (u log skali) i to je uočljivo u poravnanju efekata, kod položaja genotipova duž tačkaste (dijagonalne) linije koja predstavlja prosek u panelnom prikazu (slika 5.24. C).

Genotipovi 1, 10, 3, 4 i 5 sintetišu prolin više od proseka po jedinici povećanja % suve materije i suve mase aksilarnih pupoljaka, a suprotno se može reći za genotipove 11, 6, 2, 8, 9 i 7 (slika 5.24.C).



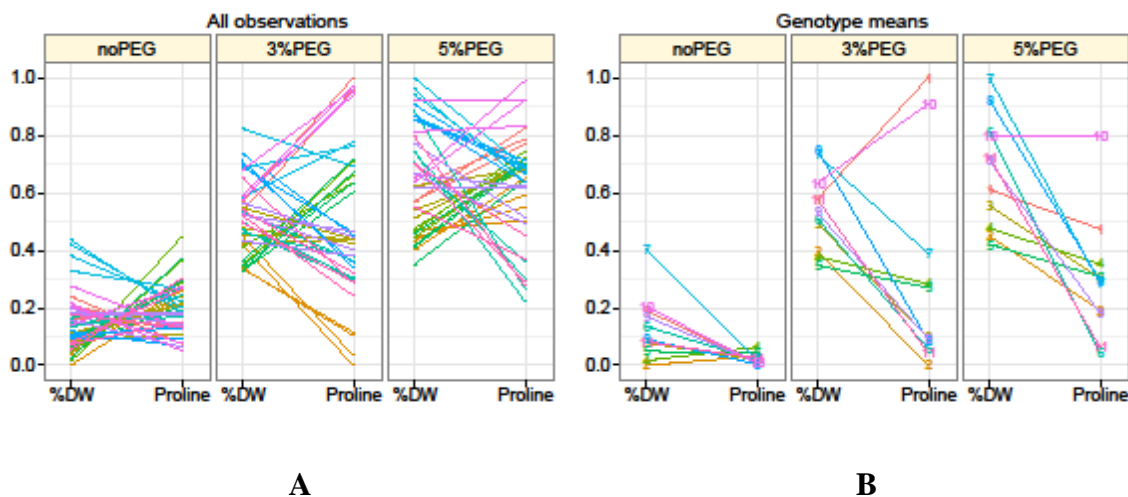


**Slika 5.24.** Dijagrami disperzije koncentracije prolina u odnosu na % suve materije i suhu masu izdanaka, usled uticaja PEG-a

Prosečne vrednosti su prikazane sivom podebljanom linijom.

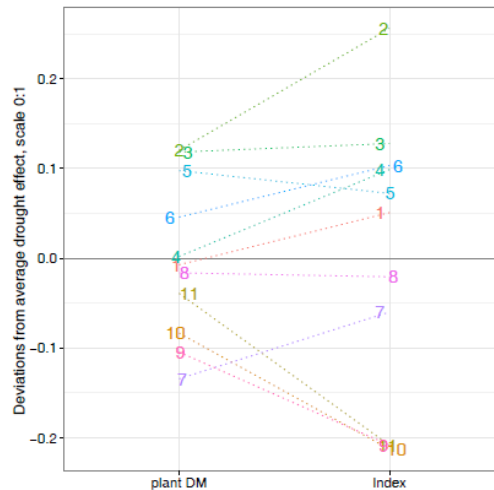
(proline, log (µg g/DW)-koncentracija prolina, logaritamska transformacija (µg g/SM); %DW-% suve materije; Buds DW (g)-pupoljci suva masa; Proline vs %DW slope deviation-odstupnja koncentracije prolina u odnosu na %SM u polukontrolisanim uslovima; Proline vs bud DW slope deviation-odstupnja koncentracije prolina u odnosu na %SM pupljaka u kontrolisanim uslovima)

Paralelnim prikazom %SM i koncentracije prolina u kontrolisanim uslovima uočava se razlika između genotipova pod uticajem PEG tretmana za ove parametre (slika 5.25.).



**Slika 5.25.** Grafikoni paralelnih koordinata za % suve materije (%DW) i koncentraciju prolina (proline) pod dejstvom PEG-a za sve tretmane (A), i u odnosu na genotipove (B)

Devijacije genotipova usled stresa u poređenju sa onima za ukupnu suhu masu su prikazane na slici 5.26.



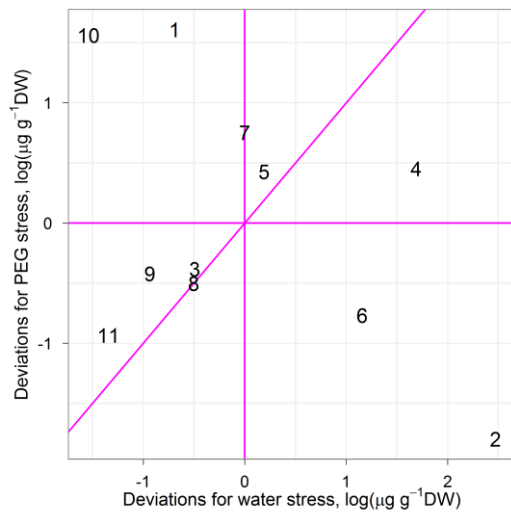
**Slika 5.26.** Poređenje efekata nedostatka vode na genotipove:ukupna suva masa i indeks ukupne suve mase

(Plant DM-ukupna suva masa; Index-indeks ukupne suve mase; Deviations from average drought effect, scale 0:1-odstupanja od prosečnih efekata suše, skala 0:1)

### 5.3. Poređenje rezultata eksperimenata u polukontrolisanim i kontrolisanim uslovima

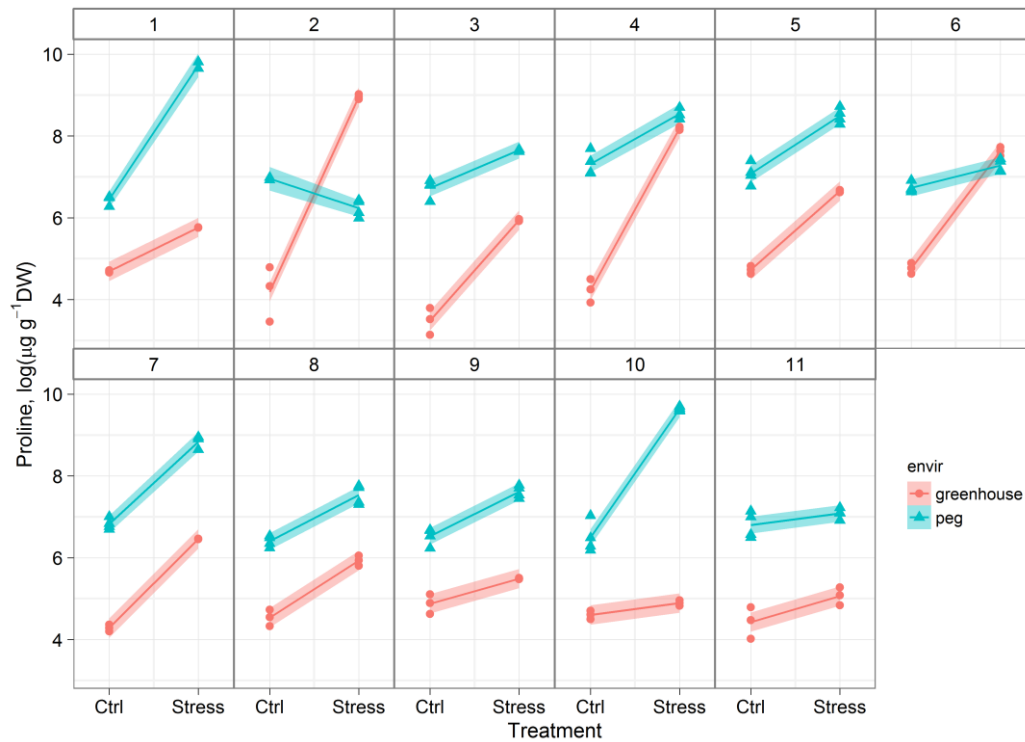
Promena koncentracije prolina pod uticajem nedostatka vode je praćena kako u polukontrolisanim uslovima, tako i u ogledu *in vitro* u kontrolisanim uslovima. Promenljive dobijene u ova dva eksperimenta su povezane i dalje analizirane.

ANOVA test za OLS model sa potpunom interakcijom (okruženje x genotip x stres) je pokazao značaj svih interakcija, a predviđanje ovog modela je predstavljeno na slici 5.27. B.



Ctrl-kontrola;  
 Stress-nedostatak vode izazvan u polukontrolisanim (greenhouse) i kontrolisanim (PEG) uslovima (envir);  
 treatment-tretman;  
 proline, log ( $\mu\text{g g}^{-1}\text{DW}$ )-koncentracija prolina, logaritamska transformacija ( $\mu\text{g g}^{-1}\text{SM}$ )

A



B

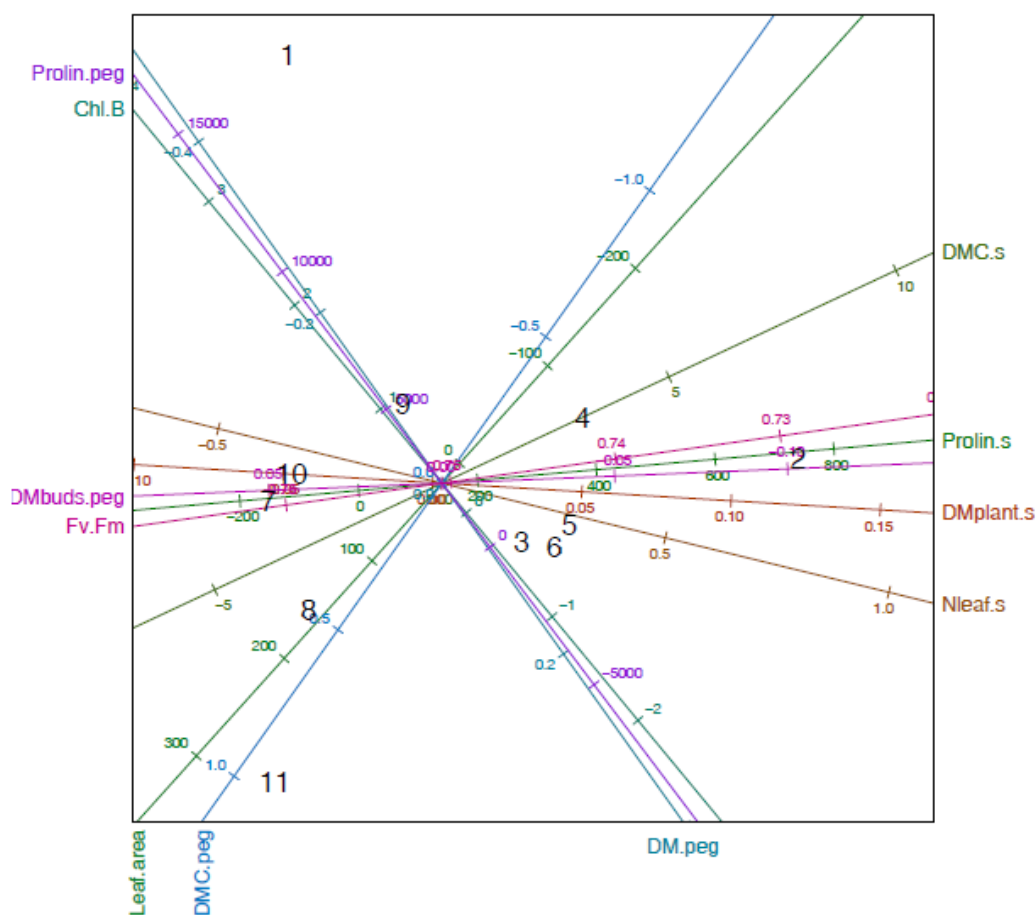
**Slika 5.27.** Dijagram raspršenja za stres izazvan vodnim deficitom (nezalivanjem u polukontrolisanim uslovima (Deviations for water stress log ( $\mu\text{g g}^{-1}\text{DW}$ )-logaritamska transformacija ( $\mu\text{g g}^{-1}\text{SM}$ ) i PEG tretmanom u kontrolisanim uslovima (Deviations for PEG stress log-logaritamska transformacija) za sve genotipove (A).

Sinteza prolina usled stresa izazvanog sušom u eksperimentima u polukontrolisanim i kontrolisanim uslovima, sa 95% intervalom poverenja (B).

U proseku, sinteza prolina je deset puta veća u eksperimentu u kontrolisanim uslovima pod uticajem PEG-a u poređenju sa podacima iz polukontrolisanih uslova, ali efekat izlaganja PEG-u ima manji uticaj na koncentraciju prolina od vodnog stresa izazvanog u polukontrolisanim uslovima, došlo je do trostrukog porasta spram sedmostrukog povećanja.

Razlike između genotipova u položaju (bez stresa) i nagibu (stres/efekat PEG-a) su očigledne iz OLS predviđanja, ali bolje su sažete u dijagramu raspršenja. Efekat devijacije je kalkulisan sa mešovitim modelom, kao na slici 5.27. A, gde se vidi da je kod većine genotipova paralelno povećanje sinteze prolina kao odgovor na stres nezalivanjem i tretmanom PEG-om (11, 9, 3, 8, 5, 7), dok genotipovi 1 i 10 imaju intenzivniju sintezu prolina u kontrolisanim, genotipovi 4, 6 i posebno 2 u polukontrolisanim uslovima. Genotipovi 2 i 6 povećavaju sintezu prolina više od proseka u polukontrolisanim, 1, 10, 7 i 5 u kontrolisanim uslovima, dok je kod genotipa 4 povećanje sinteze bilo jednako u oba eksperimenta.

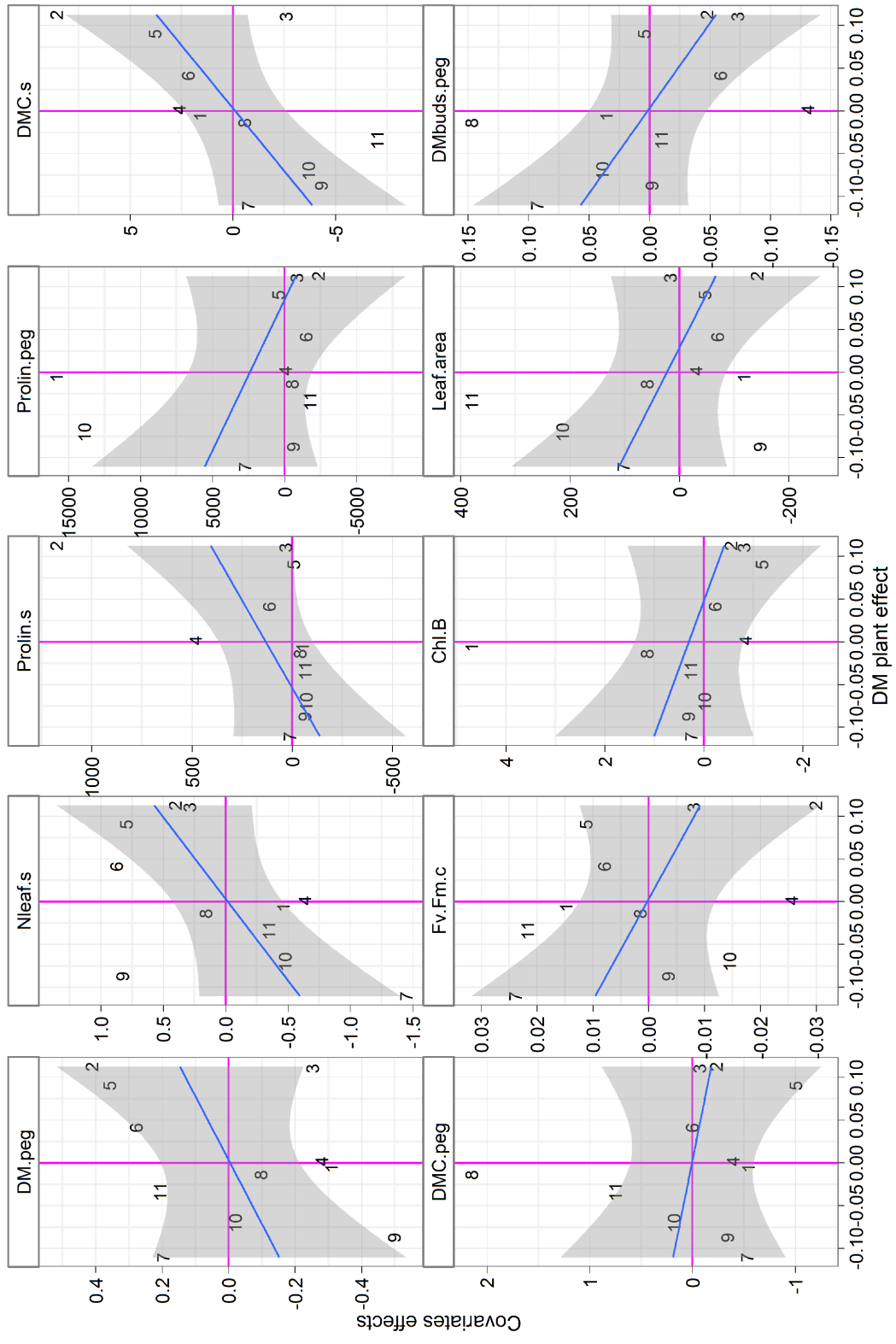
U daljoj analizi data je ocena za odnos genotipa i stresa izazvanog u polukontrolisanim i kontrolisanim uslovima (slika 5.28.). Devijacije genotipova u odnosu na prolin pod uticajem PEG-au pozitivnoj su korelaciji sa devijacijom sadržaja hlorofila i negativnoj sa devijacijom SM (PEG). Lisna površina je pozitivnoj korelaciji sa % SM (PEG).



**Slika 5.28.** Biplotovi korelacije parametara u polukontrolisanim i kontrolisanim uslovima

(sufiksi ukazuju na poreklo efekta kod ocenjivanja (s: stres izazvan sušom u stakleniku; peg: *in vitro* ogled; DM-suva masa; Nleaf-broj listova; DMC-suva materija, ogled u polukontrolisanim uslovima; Chl.B-koncentracija hlorofila b, Leaf area-lisna površina; DMbuds-suva masa pupoljaka; DMplant- SM cele biljke)

Prva glavna osa je uglavnom okarakterisana efektima nedostatka vode u eksperimentu u polukontrolisanim uslovima, što se uočava iz pozitivne korelacije koncentracije prolina, SM, %SM i broja listova. Ove promenljive su u negativnoj korelaciji sa Fv/Fm i sa SM aksilarnih pupoljaka analiziranih u ogledu u kontrolisanim uslovima. Ovi parametri su dalje analizirani (slika 5.29.) s ciljem razdvajanja genotipova na osnovu promene SM u eksperimentu u polukontrolisanim uslovima.

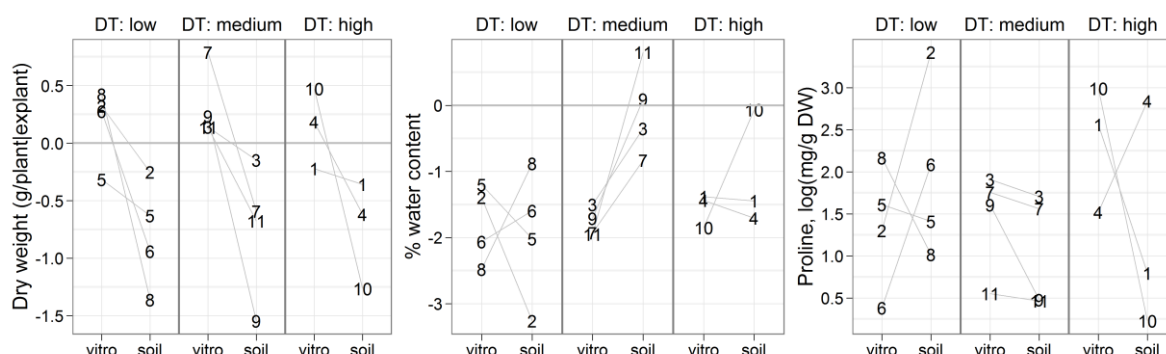


**Slika 5.29.** Kovarijance genotipova, efekat stresa za suhu masu (u polukontrolisanim uslovima), i drugi efekti stresa i parametri na koje stres nije imao uticaj

(s-stres u polukontrolisanim uslovima; peg-stres u kontrolisanim uslovima; DM-suva masa; Nleaf-broj listova; DMC-suva materija; DMC-suva materija, ogled u polukontrolisanim uslovima; Chl.B-konzentracija hlorofila b, Leaf area-lisna površina; DMbuds-suva masa pupoljaka; Covariates effects-kovarijansa; DM plant effect-efekat stresa na suhu masu)

Lakše je utvrditi razlike među ovim promenljivima, bilo u pozitivnoj ili negativnoj korelaciji sa ukupnom SM, jer se mogu sažeti u sintetički indeks tolerantnosti na vodni stres.

Ukoliko se u obzir uzmu i ocene genotipova u polju, u odnosu na parametre dobijene analizom biljaka u ogledu *in vitro* i *in vivo* (suva masa, sadržaj vode i koncentracija prolina) dolazi se do sledećih rezultata (slika 5.30.).



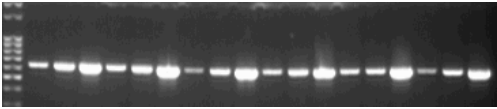
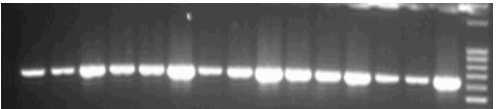
**Slika 5.30.** Poređenje efekta stresa usled suše u polukontrolisanim i kontrolisanim uslovima gajenja na suhu masu

(Dry weight (g/plant/explant)-(g/biljci/izdanku); %, water content-sadržaj vode; Proline log (mg/gDW)-sadržaj prolina, logaritamska transformacija (mg/g SM) (kod genotipova prethodno podeljenih u 3 grupe na osnovu tolerantnosti prema suši u poljskim uslovima (DT) (low-niska; medium-srednja; high-visoka)

## 5.5. Analize ekspresije kandidat gena

Za analize ekspresije gena korišćeni su najmlađi potpuno razvijeni listovi biljaka gajenih u polukontrolisanim uslovima u stakleniku. Uzorci kontrole i biljaka podvrgnutih tretmanu sušom analizirani su 5 dana nakon prestanka zalivanja biljaka u istom momentu kada su analizirani i fiziološki parametri. Iz tih uzoraka je ekstrahovana DNK, kao i mRNK, iz koje je potom sintetisana cDNK. Osim cDNK templejt za PCR reakciju je bila i genomska DNK kako bi se ustanovilo da li su kandidat geni uopšte prisutni u genomu ispitivanih genotipova šećerne repe, posebno što neki kandidat geni potiču iz drugih biljnih vrsta (tabela 4.5.). Ustanovljene su razlike u ekspresiji odabranih kandidat gena na nivou RNK u uslovima stresa kako u odnosu na kontrolu, tako i između genotipova.

**Tabela 5.14.** Prisustvo produkta amplifikacije fragmenta 1 (BI543470) koji odgovara genu za dehidrin šećerne repe

Fragment	Genotip	cDNKk	cDNKs	Gen DNK	Gel
1	1	+	+	+	 <p>genotipovi 1-6, 54°C</p>
	2	+	+	+	
	3	+	+	+	
	4	+	+	+	
	5	+	+	+	
	6	+	+	+	
	7	+	+	+	 <p>genotipovi 7-11, 54°C</p>
	8	+	+	+	
	9	+	+	+	
	10	+	+	+	
	11	+	+	+	

Brojevi na slici označavaju genotipove, slovo g-genomsku DNK, a k i s cDNK koji odgovaraju mRNA izolovanoj iz listova kontrole i listova biljaka izloženih nedostatku vode, redom, M-marker 100bp DNK lestvica.

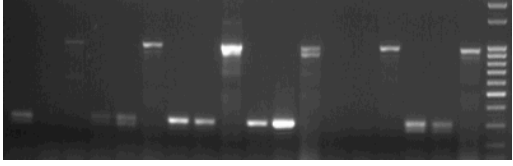
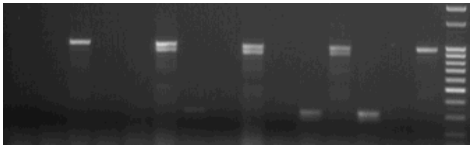
(+ vidljiv signal; \* jedva vidljiv signal; - nema signala)

Nakon reakcije amplifikacije fragmenta 1 produkt reakcije je dobijen kod svih uzoraka pri čemu je signal uvek najjači na genomskoj DNK (tabela 5.14.). Veličina produkta odgovara očekivanoj. Kod genotipova 1, 2, 3, 4, 6 i 9 signal je jači na cDNKs nego na cDNKk što se može objasniti indukcijom usled nedostatka vode. Kod genotipova 5, 7, 8 i 11 signal na cDNKs je jednak onom na cDNKk. Kod genotipa 10 signal na cDNKs je slabiji nego na cDNKk što se može objasniti represijom usled suše.

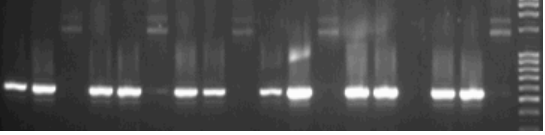
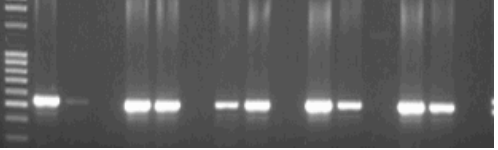
Produkt amplifikacije je kod uzoraka na genomskoj DNK bio dugačak oko 900 bp za fragment 3, a na cDNK 300 bp (tabela 5.15.). Ovo se može objasniti prisustvom introna na genomskoj DNK koji je isečen u toku procesa dozrevanja mRNA. Ovaj rezultat može da posluži i kao unutrašnja kontrola u smislu nepostojanja kontaminacije genomskom DNK u svim uzorcima cDNK.



**Tabela 5.15.** Prisustvo produkta amplifikacije fragmenta 3 (BI543243) koji odgovara genu iz šećerne repe i lucerke za protein, čija je ekspresija izazvana hladnoćom i sušom\*

Fragment	Genotip	cDNKk	cDNKs	Gen DNK	Gel
3	1	*	-	*	 <p>genotipovi 1-6, 54°C</p>
	2	*	*	+	
	3	+	+	+	
	4	+	+	+	
	5	-	-	+	
	6	+	+	+	
	7	-	-	+	 <p>genotipovi 7-11, 54°C</p>
	8	-	-	+	
	9	-	-	+	
	10	-	*	+	
	11	*	-	+	

**Tabela 5.16.** Prisustvo produkta amplifikacije fragmenta 4 (BI096135) koji odgovara genu iz šećerne repe za dehidrin cistein proteinazu, čija je ekspresija izazvana sušom\*\*

Fragment	Genotip	cDNKk	cDNKs	Gen DNK	Gel
4	1	+	+	+	 <p>genotipovi 1-6, 54°C</p>
	2	+	+	+	
	3	+	+	+	
	4	+	+	+	
	5	+	+	-	
	6	+	+	+	
	7	+	-	-	 <p>genotipovi 7-11, 54°C</p>
	8	+	+	-	
	9	+	+	-	
	10	+	+	*	
	11	+	+	-	

\* i \*\* Brojevi na slici označavaju genotipove, slovo g-genomsku DNK, a k i s cDNK koji odgovaraju mRNA izolovanoj iz listova kontrole i listova biljaka izloženih nedostatku vode, redom, M-marker 100bp DNK lestvica.  
(+ vidljiv signal; \* jedva vidljiv signal; - nema signala)

Nakon reakcije amplifikacije fragmenta 4 dobijeni produkti na genomskoj DNK su bili veći nego na cDNK (tabela 5.16.). To se može objasniti prisustvom introna, koji je eliminisan pri sintezi mRNK. Signal je znatno jači na cDNK u odnosu na genomsku DNK. Jači signal na cDNKs u odnosu na kontrolu je dobijen kod genotipova 1, 2, 4, 6 i 9 što se može objasniti indukcijom usled nedostatka vode, obrnuto su reagovali genotipovi 3, 5, 7, 8, 10 i 11 što se može objasniti represijom usled suše.

**Tabela 5.17.** Prisustvo produkta amplifikacije fragmenta 5 (AW697770) koji odgovara genu iz šećerne repe i *Arabidopsis*-a za protein čija je ekspresija izazvana sušom

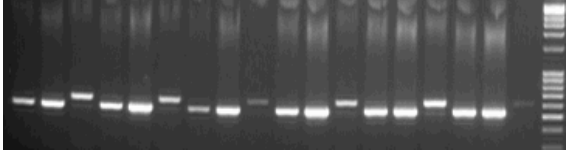
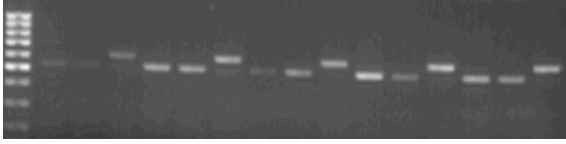
Fragment	Genotip	cDNKk	cDNKs	Gen DNK	Gel
5	1	+	+	-	<p>genotipovi 1-3, 54°C</p> <p>genotipovi 4-6, 54°C</p> <p>genotipovi 7-9, 54°C</p> <p>genotipovi 10-11, 54°C</p>
	2	+	+	-	
	3	+	+	-	
	4	+	+	-	
	5	+	+	-	
	6	+	+	-	
	7	+	+	-	
	8	+	+	-	
	9	+	*	-	
	10	+	+	-	
	11	+	+	-	

Brojevi na slici označavaju genotipove, slovo g-genomsku DNK, a k i s cDNK koji odgovaraju mRNA izolovanoj iz listova kontrole i listova biljaka izloženih nedostatku vode, redom, M-marker 100bp DNK lestvica.

(+ vidljiv signal; \* jedva vidljiv signal; - nema signala)

Amplifikacijm fragmenta 5 na genomskoj DNK nije dobijen nikakav produkt, a na cDNK mogla su se uočiti dva produkta, što ukazuje da se verovatno radi o na familiji gena (tabela 5.17.). Veća razlika u ekspresiji gena između tretmana i kontrole je uočena jedino kod genotipa 9.

**Tabela 5.18.** Pristupstvo produkta amplifikacije fragmenta 6 (BI543640) koji odgovara genu iz šećerne repe i *Arabidopsis*-a za protein čija je ekspresija izazvana sušom

Fragment	Genotip	cDNKk	cDNKs	Gen DNK	Gel
6	1	+	+	+	<p><b>genotipovi 1-6, 54°C</b></p>  <p>1k 1s 1g 2k 2s 2g 3k 3s 3g 4k 4s 4g 5k 5s 5g 6k 6s 6g M</p> <p><b>genotipovi 7-11, 54°C</b></p>  <p>M 7k 7s 7g 8k 8s 8g 9k 9s 9g 10k 10s 10g 11k 11s 11g</p>
	2	+	+	+	
	3	+	+	*	
	4	+	+	+	
	5	+	+	+	
	6	+	+	*	
	7	+	*	+	
	8	+	+	+	
	9	+	+	+	
	10	+	+	+	
	11	+	+	+	

Brojevi na slici označavaju genotipove, slovo g-genomsku DNK, a k i s cDNK koji odgovaraju mRNA izolovanoj iz listova kontrole i listova biljaka izloženih nedostatku vode, redom, M-marker 100bp DNK lestvica.

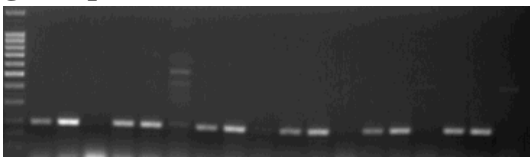
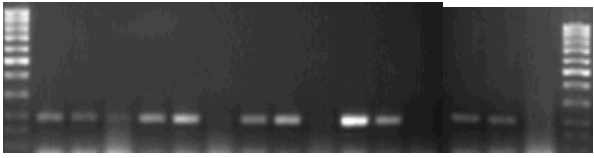
(+ vidljiv signal; \* jedva vidljiv signal; - nema signala)

Produkti amplifikacije fragmenta 6 na genomskoj DNK su bili nešto veći od 600 bp, a na cDNK oko 530 (očekivano na cDNK 541 bp) (tabela 5.18.). Jači signal na cDNKs je dobijen kod većine genotipova (1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 11) što se može objasniti indukcijom usled nedostatka vode. Genotip 7 je imao veoma slabo vidljive produkte naročito kod cDNKs.

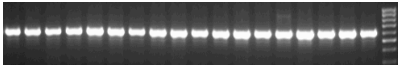
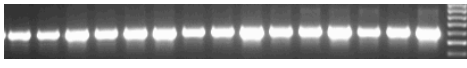
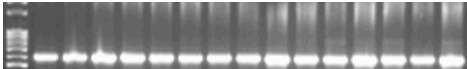
Amplifikacijom fragmenata 7 (X15290), 9 (BG932913) i 10 (BI096146) nisu dobijeni produkti ni na jednoj matričnoj DNK. Fragment 7 odgovara mRNA za dehidrin iz kukuruza, a 9 i 10 stres indukujući protein iz šećerne repe koji je indukovano u uslovima stresa.

Veličina produkata amplifikacije fragmenta 11 na genomskoj DNK za genotipove 2, 5 i 6 iznosila je oko 500 bp, ali je signal bio veoma slab (tabela 5.19.). Kod svih ostalih je oko 200 bp (očekivano je za cDNK 203 bp). Genotip 7 ima jedva vidljiv signal genomске DNK i to veličine cDNK.

**Tabela 5.19.** Prisustvo produkta amplifikacije fragmenta 11 (BQ060651) koji odgovara genu iz šećerne repe za fruktozu-bisfosfat aldolazu\*

Fragment	Genotip	cDNKk		cDNKs		Gen DNK	Gel
		+	-	+	-		
11	1	+	-	+	-	-	<b>genotipovi 1-6, 54°C</b> 
	2	+	-	+	*		
	3	+	-	+	-		
	4	+	-	+	-		
	5	+	-	+	*		
	6	+	-	+	*		
	7	+	-	+	+	+	<b>genotipovi 7-11, 54°C</b> 
	8	+	-	+	-		
	9	+	-	+	-		
	10	+	-	+	-		
	11	+	-	+	-		

**Tabela 5.20.** Prisustvo produkta amplifikacije fragmenta 12 (BF011094) koji odgovara genu iz šećerne repe za protein specifičan za list\*\*

Fragment	Genotip	cDNKk		cDNKs		Gen DNK		Gel
		58°C	54°C	58°C	54°C	58°C	54°C	
12	1	+	-	+	-	+	-	<b>genotipovi 1-6, 58°C</b> 
	2	+	-	+	-	+	-	
	3	+	-	+	-	+	-	
	4	+	-	+	-	+	-	
	5	+	-	+	-	+	-	<b>genotipovi 7-11, 58°C</b> 
	6	+	-	+	-	+	-	
	7	+	+	+	+	+	+	
	8	+	+	+	+	+	+	<b>genotipovi 7-11, 54°C</b> 
	9	+	+	+	+	+	+	
	10	+	+	+	+	+	+	
	11	+	+	+	+	+	+	




\* i \*\* Brojevi na slici označavaju genotipove, slovo g-genomsku DNK, a k i s cDNK koji odgovaraju mRNA izolovanoj iz listova kontrole i listova biljaka izloženih nedostatku vode, redom, M-marker 100bp DNK lestvica. (+ vidljiv signal; \* jedva vidljiv signal; - nema signala)

Količina dobijenog produkta amplifikacije fragmenta 12 je kod svih uzoraka bila ujednačena (tabela 5.20.). Ovaj fragment može da posluži i kao unutrašnja pozitivna kontrola, jer je svugde prisutan. Fragment je i kod cDNKs i cDNKk i gDNK iste veličine, i iznosi oko 600 bp (očekivano 604 bp). Ovo pokazuje da je približno ista količina templejta cDNK korišćena u PCR reakcijama u ovom istraživanju i da razlike u jačini signala dobijene u reakcijama amplifikacije drugih kandidat gena potiču od različitih količina informacione RNK u uzorku (listu), a ne od različite količine templejt cDNK u reakciji. Razlike u količini iRNK mogu da budu i rezultat uzimanja različitog lista za analizu, razlike u položaju lista, osvetljenja, itd.

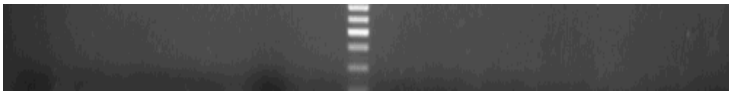


Amplifikacijom fragmenta 13 dobijen je produkt svugde iste veličine, i iznosi skoro 600 bp (očekivano 581 bp) (tabela 5.21.). Kod uzoraka genotipa 1 nije došlo do sinteze produkta. Kod genotipova 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9 i 11 produkt je prisutan samo na genomskoj DNK. Kod genotipova 8 i 10 produkt je prisutan i na obe cDNK.

Produkt reakcije amplifikacije fragmenta 14 na genomskoj DNK je bio približno veličine 700 bp (očekivano 686 bp) (tabela 5.22.). Kod genotipova 3, 5 i 6 nigde nema produkata, ni pri manje strogim uslovima, na 54°C. Kod genotipova 1, 2, 3, 4, 7, 8, 9, 10, 11 produkti su samo dobijeni na genomskoj DNK. Na cDNK nigde nema produkta na 60°C.

**Tabela 5.21.** Prisustvo produkta amplifikacije fragmenta 13 (BI096078) koji odgovara genu iz šećerne repe čija je ekspresija indukovana prisustvom fosfata\*

Fragment	Genotip	cDNKk		Gen DNK	Gel	
		60°C	54°C			
13	1	-	-	-	<b>genotipovi 1-3, 54°C</b> 	<b>genotipovi 4-6, 54°C</b> 
	2	-	-	+		
	3	-	-	+		
	4	-	-	*	<b>genotipovi 7-11, 54°C</b> 	
	5	-	-	+		
	6	-	-	+		
	7	-	-	+		
	8	+	+	+		
	9	-	-	+		
	10	+	+	+		
	11	-	-	+		

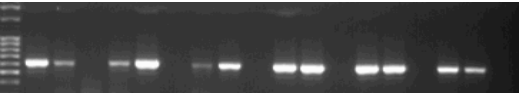
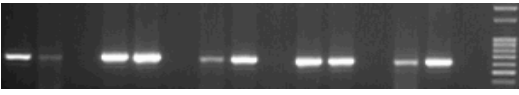
**Tabela 5.22.** Prisustvo produkta amplifikacije fragmenta 14 (BI073246) koji odgovara genu iz šećerne repe i mrkve za glikoprotein čija je ekspresija izazvana mehaničkom povredom\*\*

Fragment	Genotip	cDNKk		cDNKs		Gen DNK	Gel	
		60°C	54°C	60°C	54°C			
		60°C	54°C	60°C	54°C			
14	1	-	-	-	-	+	<b>genotipovi 1-11, 60°C</b> 	
	2	-	-	-	-	*		
	3	-	-	-	-	+		
	4	-	-	-	-	+	<b>genotipovi 1-11, 60°C</b> 	
	5	-	-	-	-	-		
	6	-	-	-	-	-		
	7	-	-	-	-	+	*	<b>genotipovi 7-11, 54°C</b> 
	8	-	-	-	-	+	*	
	9	-	-	-	-	+	+	
	10	-	-	-	-	+	+	
	11	-	-	-	-	+	-	

\* i \*\* Brojevi na slici označavaju genotipove, slovo g-genomsku DNK, a k i s cDNK koji odgovaraju mRNK izolovanj iz listova kontrole i listova biljaka izloženih nedostatku vode, redom, M-marker 100bp DNK lestvica.

(+ vidljiv signal; \* jedva vidljiv signal; - nema signala)

**Tabela 5.23.** Prisustvo produkta amplifikacije fragmenta 15 (BF011254) koji odgovara genu iz šećerne repe za protein čija je ekspresija izazvana auksinom

Fragment	Genotip	cDNKk	cDNKs	Gen DNK	Gel
15	1	+	+	-	<p><b>genotipovi 1-6, 58°C</b></p>  <p>M1k 1s 1g 2k 2s 2g 3k 3s 3g 4k 4s 4g 5k 5s 5g 6k 6s 6g</p> <p><b>genotipovi 7-11, 58°C</b></p>  <p>7k 7s 7g 8k 8s 8g 9k 9s 9g 10k 10s 10g 11k 11s 11g M</p>
	2	+	+	-	
	3	+	+	-	
	4	+	+	-	
	5	+	+	-	
	6	+	+	-	
	7	+	*	-	
	8	+	+	-	
	9	+	+	-	
	10	+	+	-	
	11	+	+	-	

Brojevi na slici označavaju genotipove, slovo g-genomsku DNK, a k i s cDNK koji odgovaraju mRNA izolovanoj iz listova kontrole i listova biljaka izloženih nedostatku vode, redom, M-marker 100bp DNK lestvica.

(+ vidljiv signal; \* jedva vidljiv signal; - nema signala)

Produkt amplifikacije fragmenta 15 je bio iste veličine kod svih uzoraka i iznosi 600 bp što odgovara očekivanom broju baznih parova (tabela 5.23.). Produkt je prisutan kod svih genotipova samo na cDNK što ukazuje na malu zastupljenost tog gena u genomu.

## **6. DISKUSIJA**

Istraživanja vezana za reakciju biljaka na nedostatak vode najčešće uključuju relativno brzo nametanje vodnog stresa u sudovima gde su kratkoročno gajene biljke ili u eksperimentima u hidroponima pod kontrolisanim uslovima, uz korišćenje biljaka u tačno određenim fazama razvoja. Primena takvih rezultata u cilju povećanja tolerantnosti gajenih biljaka prema suši zbog kompleksnosti uslova gajenja na otvorenom, bila bi nemoguća. U poljskim uslovima razvoj biljaka može biti inhibiran na različite načine, interakcijom između suše i drugih ekoloških stresova, dostupnošću i pravovremenim padavinama i temperaturom, kao i interakcijama s različitim mikroorganizmima (Neumann, 2008). Sa druge strane u kontrolisanim uslovima jedino je moguće eliminisati učešće drugih faktora i na taj način omogućiti da rešenje problema u polukontrolisanim ili kontrolisanim uslovima bude u kasnijim fazama implementirano u kompleksne uslove životne sredine. Dobijeni rezultati su poređeni sa opservacionim testovima genotipova u poljskim uslovima kako bi rezultati zaista bili upotrebljivi u selekciji. Oplemenjivanje ima veoma složen zadatak da prati klimatske promene i prilagodi sortiment uslovima koji se menjaju u velikoj meri kako na lokalnom tako i na globalnom nivou, a da pri tom prinos i kvalitet ima tendenciju rasta.

### **6.1. Statističke transformacije analiziranih podataka fizioloških testova**

Kada se dobiju nehomogeni rezultati tokom merenja pojedinih fizioloških parametara, teško je izvući pouzdane zaključke o efektima primenjenih tretmana bez dodatnih statističkih analiza podataka. Samo neke od mogućih statističkih transformacija osnovnih podataka su: Box-Cox, po Džonsonu i logaritamska. Posebno je naglašen efekat ovih transformacija na konačan zaključak o uticaju nedostatka vode na koncentraciju slobodnog prolina u listovima šećerne repe (Putnik-Delić et al., 2010). Kod rezultata koncentracije slobodnog prolina utvrđena je heterogenost varijanse i za genotipove i za tretmane na osnovu testova homogenosti varijanse. Putnik-Delić et al. (2010) su ustanovili da je raspodela osnovnih podataka vrlo neravnomerna. S ciljem primene parametarske analize varijanse i upoređenja tretmana, transformacija podataka je bila neophodna. Distribucija Box-Cox transformisanih podataka je mnogo bliža normalnoj raspodeli, jer je eliminisala heterogenost varijabli u grupama tretmana i



smanjila je u grupama genotipova. Transformacija po Džonsonu je bila efikasna u otklanjanju odstupanja od normalne distribucije i u stabilizovanju varijanse. Transformisani podaci nisu uticali na ukupni F test i F test za interakciju genotip x tretman (nedostatak vode), ali su uticali na rezultat upoređivanja ovih parova.

Box-Cox se obično primenjuje u biometriji za eliminisanje odstupanja od normalne raspodele i kako bi se stabilizovala varijansa. Iako je ova transformacija lako razumljiva i primenljiva, često ne dovodi do odgovarajućeg rešenja, odnosno zaključka. Samo kod obrade preliminarnih rezultata korišćena je Box-Cox transformacija, a potom je utvrđeno da transformacija po Džonsonu realizovana u statističkom softveru (Mini Tab R), može da bude dobra alternativa. Za poređenje koncentracija slobodnog prolina dobijena je konzistentnost rezultata primenom obe transformacije. Kao što je prethodno navedeno postojala je velika varijabilnost podataka i neophodno je bilo transformisati ih u normalne slučajne promenljive najadekvatnijim metodom. Logaritamske transformacije su bile treći metod normalizacije podataka. Pomoću transformacije po Džonsonu dobijena je vrlo korektna normalizacija, ali ne značajno bolja od logaritamske, koja se u ovom slučaju pokazala praktičnijom za tumačenje, jer se za razliku od transformacije po Džonsonu, vrednosti dobijene logaritamskim transformacijama mogu lako prevesti u procenat. Iz tog razloga u daljim fazama analiziranja podataka dobijenih na osnovu fizioloških testova kod genotipova šećerne repe usled nedostatka vode u polukontrolisanim uslovima korišćene su logaritamske transformacije.

## **6.2. Diferencijacija genotipova na osnovu fizioloških testova**

Vodni stres primenjen na biljke gajene u polukontrolisanim uslovima u stakleniku izazvao je gubitak vode iz biljnih tkiva kod slabo tolerantnih i veoma tolerantnih genotipova. Najveće gubitke ispoljila su tri genotipa iz grupe slabo tolerantnih (2, 5, 6) i dva iz grupe visoko tolerantnih (1, 4). Kao posledica gubitka vode procenat suve materije, kod korena i nadzemnih delova, povećan je pod stresnim uslovima za slabo i visoko tolerantnu grupu, a izuzetak su genotipovi 6 u grupi slabo tolerantnih (koren) i 10 u grupi visoko tolerantnih (nadzemni deo). Grupa srednje tolerantnih genotipova pokazala je vrlo mali prosek povećanja %SM usled nedostatka vode, naročito genotip 11, koji je imao potpuno suprotnu tendenciju. Nasuprot tome,

prema rezultatima Jun et al. (2000) umerena tolerantnost prema stresu, iskazana količinom SM zasnovana je na porastu nadzemnog dela koji je u vezi sa izlaganjem biljaka uslovima suše.

Postoje značajne razlike između genotipova šećerne repe u odnosu na stomatenu provodljivost, indeks sukulentnosti, specifičnu masu lista, i osmotsko prilagođavanje (Ober et al., 2005), ali se ne uočavaju značajne razlike za fotosintetske parametre, relativni sadržaj vode ili ukupnu potrošnju vode što se slaže sa rezultatima za pojedine parametre koji su dobijeni u ovom radu. Utvrđen je veći sadržaj fotosintetičkih pigmenata (hl a i hl b i smeše karotenoida), kao genotipske karakteristike kod genotipova 1 i delimično 8. Međusobno, koncentracije fotosintetičkih pigmenata imaju pozitivne koeficijente korelacija. Koncentracija prolina se kod svih genotipova u uslovima suše povećala, kao što se i % SM povećao u uslovima suše osim kod genotipova 9 i 11. Uočava se da su procentualno izražene promene usled stresa u odnosu na kontrolu znatno manje za suhu masu, a mnogo veće razlike su dobijene za % SM i RWC korena, stabla i lista. Pod uticajem nedostatka vode smanjili su se suva masa i RWC, a %SM se povećao. Pozitivni koeficijenti korelacije su dobijeni poređenjem suve mase, %SM i RWC različitih organa. Unutarklasni koeficijenti korelacije za %SM su viši i takođe pozitivni u odnosu na %SM i RWC. Relativne vrednosti za suhu masu, %SM, broj listova i prolina, ukazuju da uticaj stresa na ukupnu suhu masu, nije statistički značajan, dok je uticaj na broj listova, %SM i sadržaj prolina znatno veći. Biljke izložene stresu u proseku imaju oko tri lista manje, za četiri procenta veći %SM i sedmostruko veći sadržaj prolina. I unutarklasni koeficijenti korelacije kao merilo genotipske divergentnosti potvrđuju da je različitost genotipova veća za %SM i koncentraciju prolina nego za ukupnu SM i broj listova. Parametri fluorescencije nisu pokazali značajne varijacije u uslovima stresa izazvanog nedostatkom vode. Visok koeficijent unutarklasne korelacije utvrđen je za  $F_v$  i  $F_m$ , a nizak za  $F_v/F_m$  što govori da ovaj poslednji parametar više varira u okviru genotipova usled uticaja nedostatka vode, ali nedovoljno da bi genotipove razlikovali samo na osnovu ovog parametra.

Prema Ober et al. (2005) masa zelenih listova tokom suše je u pozitivnoj korelaciji s indeksom tolerancije na sušu, koji je u negativnoj korelaciji sa indeksom sukulentnosti i ocenom uvenuća lista i starenjem. Prinos šećera iz oblasti zahvaćene sušom je bio u pozitivnoj korelaciji sa količinom vode u zemljištu, a u negativnoj sa porastom lista merenim u kasno leto. U uslovima navodnjavanja, postojala je pozitivna korelacija između transpiracije i prinosa šećera. Rezultati ovih autora pokazuju da bi

indeks sukulentnosti i uvenuća mogao da se koristi za procenu genotipova u ranim fazama oplemenjivanja. Nažalost, u našem eksperimentu nije bilo mogućnosti za utvrđivanje prinosa u polju pod istim uslovima nedostatka vode kao i u polukontrolisanim uslovima gajenja tih genotipova, što bi u značajnoj meri olakšalo rešavanje problema. Kako bi se ipak pronašla veza sa gajenjem na otvorenom, parametri odabrani za ovaj ogled su poređeni sa promenom turgora kod testiranih genotipova u uslovima suše u polju. Poređenje rezultata dobijenih u polukontrolisanim i poljskim uslovima je važno da bi se mogli sigurnije primeniti ovi rezultati u selekciji genotipova šećerne repe prema tolerantnosti na sušu.

Poznato je da je povećanje koncentracije prolina u vezi sa smanjenjem vodnog potencijala lista (Morot-Guadry et al., 2001) i da se prolin uključuje u smanjenje šteta izazvanih u membranama tilakoida usled aktivnosti kiseoničnih radikala. Prolin se javlja i često akumulira u velikim količinama kod biljaka kao odgovor na stresne uslove životne sredine (Kavi Kishore et al. 2005; Ashraf i Foolad 2007). Analiza podataka dobijenih u eksperimentu u polukontrolisanim uslovima u stakleniku ukazuje da je interakcija stres x genotip značajna za koncentraciju prolina i % suve materije, ali ne i za suhu masu korena, stabla, lista i cele biljke, ili broj listova. Češće objašnjenje za nakupljanje prolina, je da postoje prednosti u vidu zaštite membrana i proteina kada se relativan sadržaj vode smanjuje. U biljnim ćelijama, osmoliti su obično ograničeni na hloroplaste i citoplazmatične delove koji zajedno zauzimaju 20% i manje od zapremine ćelije (Ain-Lhout et al., 2001).

U *in vitro* uslovima sinteza prolina se povećala porastom koncentracije PEG, u proseku eksponencijalno za slabo i srednje tolerantnu grupu, u prisustvu 3% PEG, dok u prisustvu 5% PEG je malo opala. Ukupno prosečno povećanje na 5% PEG bilo je četverostruko za slabo i srednje tolerantnu grupu, ali jedanaestostruko za grupu visoke tolerantnosti. Genotipovi su se razlikovali u okviru grupe i kod kontrole.

Sadržaj prolina je u većoj pozitivnoj korelaciji sa masom aksilarnih pupoljaka, skoncentrisanih u manje pupoljke, nego sa ukupnom biomasom.

Koncentracija prolina je značajno povećana u listovima i aksilarnim pupoljcima, i u pozitivnoj je korelaciji sa koncentracijom PEG-a što je u skladu s rezultatima Al-Khairi i Bahrani (2004) i Liu et al. (2011). Vrlo slične rezultate su dobili Sun et al, 2011. na *Amaranthus mangostanus*.

Sinteza prolina je bila stimulirana nedostatkom vode kod svih genotipova, a posebno kod genotipova 2 i 6 iz slabo tolerantne i genotipa 4 iz visoko tolerantne grupe.

Za slabo tolerantnu grupu prosečno povećanje je bilo 15 puta, a za srednje i visoko tolerantnu grupu 4 i 6 puta. Genotipovi kod kojih je koncentracija prolina najmanje promenjena su bili iz srednje (9, 11) i visoko (10) tolerantne grupe.

Povećanje akumulacije prolina usled suše pokazalo je pozitivnu korelaciju sa rastom i u fazi sejanaca kod pšenice i pirinča (Shah et al., 2002; Song et al., 2005). Kod kukuruza, sadržaj prolina je povećan usled nedostatka vode i maksimum koncentracije je ustanovljen posle 10 dana, a zatim se smanjuje iako je izlaganje stresu nastavljeno, što je konstatovano analizom nakon 15 dana (Anjum et al., 2011). U ovom eksperimentu u polukontrolisanim uslovima u stakleniku, stepen akumulacije prolina u uslovima suše se povećao u odnosu na kontrolu što je u skladu sa rezultatima drugih autora. Međutim, postoje nejasnoće u ispoljavanju tolerantnosti pojedinih genotipova u polukontrolisanim uslovima i u polju, u smislu pojave da neki genotipovi u određenim grupama tolerantnosti u polju ispoljavaju potpuno suprotnu reakciju u odnosu na ostale genotipove iz te grupe. To može biti rezultat relativno velikih razlika u uslovima koji vladaju u polju i faze ontogeneze šećerne repe.

Rong-hua et al. (2006), radeći sa ječmom, pokazali su da su indirektne i brže metode merenja fotosintetske aktivnosti, kao što su fluorescencija hlorofila, naročito maksimalna fotohemijska efikasnost photosistema II - PSII (što se može oceniti putem promenljive maksimalne fluorescencije hlorofila a (Fm), i odnos Fv/Fm) i procena sadržaja hlorofila (SPAD indeks), efikasne tehnike merenja fotosintetičke razmene gasova u otkrivanju razlike između genotipova u odnosu na tolerantnost prema suši. Drugi fiziološki parametri kao što su temperatura lista i relativni sadržaj vode (RWC) su takođe veoma osetljivi na stres izazvan sušom i pokazuju dobru korelaciju sa tolerancijom na sušu (Jamaux et al, 1997; Altinkut et al, 2001; Colom i Vazzana, 2003). Pouzdanost ovih parametara za razlikovanje genotipova u odnosu na reakciju prema nedostatku vode verovatno zavisi od biljne vrste (Colom i Vazzana, 2003; O'Neill et al, 2006; Rong-hua et al, 2006), jer različite vrste mogu posedovati različite mehanizme otpornosti i/ili tolerancije na stres. Prema Silva et al. (2007) pažljiva selekcija odgovarajućih fizioloških parametara kao što su Fv/Fm odnos, SPAD indeks, i RWC lista i brzih / nedestruktivnih metoda njihove kvantifikacije je veoma dragocena za ocenu tolerantnosti prema suši.

Stres izazvan sušom uglavnom se vidi i kroz smanjenu Fv/Fm vrednost, što je evidentno samo kod osetljivih genotipova (Silva et al., 2007). Smanjenje Fv/Fm

indukovano stresom je pokazatelj fotoinhibicije koja je povezana sa većom redukcijom PSII (Maxwell i Johnson, 2000). Sposobnost održavanja visokog Fv/Fm odnosa pod stresnim uslovima ukazuje na visoku efikasnost iskorišćavanja svetlosti koja se koristi u fotohemijskim reakcijama i asimilaciji ugljenika. Colom i Vazzana (2003) su objavili slične korelacije između Fv/Fm odnosa i suše sa visokim Fv/Fm vrednostima koje su u vezi sa tolerancijom na sušu, a niske Fv/Fm vrednosti se povezuju sa malom adaptibilnošću na stres usled suše. Relativno brza promena u uslovima blagog stresa ukazuje da je Fv/Fm perspektivan parametar za skrining šećerne trske na tolerantnost prema suši. Parametri fluorescencije nisu pokazali značajne varijacije kod testiranih genotipova šećerne repe u uslovima stresa izazvanog nedostatkom vode. Efekti suše marginalno su primetni za Fv i Fm, ali ne i za Fv/Fm odnos, gde su najveće razlike između genotipova (devijacije od kontrole). Osim toga, stres koji uzrokuje razlike u slučaju preklapanja intervala interakcije stres x genotip sličan je za sve genotipove. Visok koeficijent unutarklasne korelacije utvrđen je za Fv i Fm, a nizak za Fv/Fm što potvrđuje da fotohemijska efikasnost fotosistema II više varira u okviru genotipova usled uticaja nedostatka vode, nego što je genotipsko svojstvo.

Svi genotipovi u tolerantnoj grupi u ovom eksperimentu su imali relativno visoke vrednosti RWC u odnosu na one u osetljivoj grupi čime je potvrđena empirijska klasifikacija tolerantnosti prema suši (Silva et al., 2007). Takvi genotipovi bi eventualno mogli da održe hidrataciju protoplasta na duže vreme pod uslovima vodnog deficita i time osiguraju produktivnost u semi-aridnim regionima. U stvari, RWC je najvažniji pokazatelj stepena hidratacije ćelija i tkiva, koja je od ključnog značaja za optimalnu fiziološku funkcionalnost, i procese rasta, tako da održavanje relativno visokog RWC tokom blage suše ukazuje na tolerantnost prema suši (Jamaux et al, 1997; Altinkut et al, 2001; Colom i Vazzana, 2003).

Relativni sadržaj vode (RWC) lišća, meren odmah nakon prestanka suše, zavisi od faze razvoja, ali smanjenje je uočeno samo kod starijih listova (Choluj et al., 2008). Shaw et al. (2002) su pokazali da veće smanjenje RWC kod šećerne repe može biti posledica šestodnevog nezalivanja bez značajnog efekta suše na sadržaj vode u glavnom korenu. U eksperimentu u polju je uočeno da su samo stariji listovi izgubili turgor u toku dana, što je povezano sa smanjenjem RWC, ali njihov sadržaj vode tokom noći se povratio. Kevrešan et al. (1997/1998) su pokazali da je simptom drastičnijeg snižavanja vodnog potencijala lista kod linija šećerne repe usled suše, kontinuirano

pojavljivanje simptoma venjenja na listovima. Ovi autori nisu ustanovili razliku u ovoj osobini između starijih i mlađih listova.

Pored navedenih parametara na osnovu rezultata dobijenih u ovom radu, kod šećerne repe se kao veoma efikasan parametar za diferenciranje genotipova može koristiti i sadržaj prolina (Putnik-Delić et al., 2013).

U *in vitro* eksperimentalnim uslovima cilj je bio da se međusobno uporede genotipovi i da se ustanovi parametar po kom se genotipovi mogu grupisati u odnosu na tolerantnost prema nedostatku vode. U svom radu Roy et al. (2009) su ustanovili da se tretiranjem pirinča PEG-om može doći do relevantnih rezultata u smislu procene genotipova na tolerantnost prema nedostatku vode. Kod šećerne repe procena je napravljena na osnovu logaritamskih transformacija podataka za broj aksilarnih pupoljaka i koncentraciju prolina i procenjene vrednosti su vraćene, transformisane nazad u skale u kojima su testirani parametri.

Tretmanom PEG smanjuje se ukupna suva masa i više nego duplo se smanjuje broj aksilarnih izdanaka. PEG u koncentraciji od 3% utiče na povećanje ukupne sveže mase. Pod uticajem PEG, sa smanjenjem sadržaja vode u tkivima, smanjuje se broj pupoljaka, ali se povećava masa pupoljaka, i procenat suve materije. Koncentracija prolina kao što je i očekivano je znatno povećana. Vrednosti varijanse za genotipove su najviše kod kontrole (0% PEG) za ukupnu svežu masu, kod 3% PEG-a za koncentraciju prolina i svežu masu aksilarnih pupoljaka, a kod 5% PEG za % suve materije. Kovarijanse između 3% i 5% PEG su značajne za % suve mase i aksilarne izdanke, koji su više od drugih parametara podložni pozitivnom, a potom negativnom uticaju, povećanjem koncentracije PEG preko 3%. Statistički značajne razlike među genotipovima su dobijene i testiranjem 3, 5 i 7% PEG-om, kako kod broja aksilarnih pupoljaka tako i kod sadržaja suve materije i koncentracije prolina (Nagl et al., 2010).

U *in vitro* eksperimentu sveža masa eksplantata šećerne repe gajenih na podlozi koja sadrži 3 i 5% PEG smanjuje se u skladu sa povećanjem koncentracije PEG za grupu genotipova tolerantnih prema suši, ali gubitak mase je pri najvišoj koncentraciji PEG bio neznatno veći. Genotipovi iz grupe visoko tolerantnih, pokazali su paralelne tendencije, ali genotip 2 iz slabo tolerantne i 7 iz srednje tolerantne grupe pokazali su smanjenje mase manje od drugih i slabije su se razvijali u odsustvu PEG. Prosečna suva masa eksplantata sa povećanjem koncentracije PEG ne povećava se linearno, već dostiže maksimum na 3% PEG, a zatim na 5% PEG opada do približno istog nivoa kao i

kod kontrole (0% PEG). Kriva pokazuje veće razlike među tretmanima za slabo tolerantnu grupu genotipova, ali je trend isti.

Sadržaj vode u tkivima se linearno smanjuje sa povećanjem koncentracije PEG, i pokazuje prosečan pad od 6% za tretman 5% PEG, sa malom prosečnom razlikom među grupama tolerantnosti i većom razlikom između genotipova u okviru grupe. Genotipovi 8, 7 i 10 su pokazali najveći gubitak vode za slabo, srednje i visoko tolerantnu grupu, odnosno broj aksilarnih pupoljaka je smanjen u prisustvu 3% PEG-a, ali ne i u prisustvu 5% PEG-a. Genotipovi se razlikuju više po osnovnom broju nego prema tendencijama i proseci tri grupe tolerantnosti se ne razlikuju značajno. Suva masa aksilarnih pupoljaka povećava se na 3% PEG, ali ne i na 5%. Tri genotipa sa najvećim gubitkom vode takođe su imali najmanji broj izdanaka i najveću suhu masu aksilarnih izdanaka u odgovarajućim grupama.

Kod većine genotipova (11, 9, 3, 8, 5, 7) dolazi do paralelnog povećanja koncentracije prolina kao odgovor na stres u polukontrolisanim i u *in vitro* uslovima. Genotipovi 1 i 10 imaju intenzivniju produkciju prolina pod uticajem stresa u uslovima gajenja *in vitro*, dok je kod genotipova 4, 6 i 2 ona bila najintenzivnija pri vodnom deficitu izazvanom u polukontrolisanim uslovima. Kod genotipova 2 i 6 povećala se koncentracija prolina više od proseka u uslovima vodnog stresa i u polukontrolisanim i kontrolisanim uslovima, kod genotipova 1, 10, 7 i 5 je do znatnijeg povećanja došlo posle izlaganja PEG-u, a kod genotipa 4 oba tretmana su imala isti efekat.

Pod uticajem PEG je ustanovljena pozitivna korelacija između koncentracije prolina i sadržaja hlorofila, a negativna između koncentracije prolina i količine SM. Lisna površina utvrđena kod biljaka gajenih u stakleniku je u pozitivnoj korelaciji sa % SM biljaka gajenih u kontrolisanim uslovima (u prisustvu PEG).

Ovo navodi na zaključak da je sinteza prolina u pozitivnoj korelaciji sa formiranjem aksilarnih pupoljaka, koncentrisanih u manje pupoljke, ali ne i sa ukupnom biomasom. Povećanje % suve mase pod uticajem PEG je očigledno. Ima malo varijacija u rezultatima dobijenim u prisustvu 3% i 5% PEG. Genotipovi 1 i 10 su imali najveću koncentraciju prolina na 3% i na 5% PEG-u, a u proseku genotip 1 je na 3% PEG-u imao i najveću suhu masu.

Sinteza prolina pod uslovima stresa je u oba eksperimenta bila povećana pod uticajem tretmana, ali postojala je značajna razlika u odnosu na kontrolu: u *in vitro* uslovima šest puta, a u polukontrolisanim uslovima u stakleniku šesnaest puta. Međusobna sličnost je uočena kod genotipova 3, 7 i 11 iz srednje grupe tolerantnosti, ali

su značajna odstupanja između genotipova u slabo i visoko tolerantnoj grupi: 2 i 6 sa većim koncentracijama prolina u stakleniku u odnosu na 8, u slabo tolerantnoj grupi; 1 i 10 sa većim vrednostima u odnosu na genotip 4 u *in vitro* uslovima u visoko tolerantnoj grupi. Sva ova odstupanja koja ne obuhvataju suhu materiju, sadržaj vode i sadržaj prolina, pokazuju da postoje dva pristupa za razdvajanje genotipova šećerne repe u odnosu na odgovor prema vodnom stresu koji ne mogu da budu zamena jedan drugom. Dok se na osnovu rezultata koncentracije prolina za ekperiment u *in vitro* uslovima genotipovi mogu razdvojiti i svrstati na najviši nivo tolerantnosti prema nedostatku vode u skladu s observacionim testom u poljskim uslovima, test u polukontrolisanim uslovima u stakleniku je manje efikasan u tom smislu. Razlog može biti vremenska ograničenost, jedinstvenost, a stres može biti izazvan kontinuiranim ili isprekidanim nedostatkom vode u polju.

Tretman PEG-om je imao pozitivan prosečan uticaj na suhu masu u koncentraciji od 3% dok je u koncentraciji od 5% imao pozitivan uticaj na ukupnu suhu masu i negativan uticaj na ukupnu svežu masu, odnosno uticao je na smanjenje sadržaja vode i rast. Genotipovi su na ovaj način jasno razdvojeni kod kontrole, u smislu ukupne suve i sveže mase, ali su potom rangirani i po parametrima (sveža i suva masa i njihov odnos izražen u %). Sa povećanjem koncentracije PEG-a došlo je do smanjivanja mase po biljci. Na genotipove 7, 2, 8 i 3 bio je veći uticaj tretmana PEG-om.

Sveža i suva masa aksilarnih pupoljaka povećale su se pod uticajem 3% PEG-a, ali ne i u 5% PEG-u. Broj izdanaka je smanjen u prisustvu 3% PEG-a, a nešto više u prisustvu 5% PEG-a. Slične reakcije za svežu i suhu masu ukazuju da, suprotno onome što važi za celu biljku, udeo suve materije u aksilarnim pupoljcima nije podložan uticaju PEG, te bi ostali delovi biljke trebalo da ispolje veće reakcije od cele biljke. Kod težih aksilarnih pupoljaka efekat PEG se čini manjim. Prolin kao potencijalni parametar-indikator tolerantnosti genotipova prema suši je adekvatniji od ukupne suve mase, što se može uočiti u paralelno koordiniranom plotu. Posmatranjem dva vrlo povezana parametra, %SM i SM aksilarnih pupoljaka u odnosu na koncentraciju prolina ustanovljena je različita reakcija genotipova u ovim odnosima. Dijagrami rasturanja koncentracije prolina u odnosu na % suve materije i suhu masu izdanaka su omogućili da se genotipovi svrstaju u dve različite grupe: genotipovi 1, 10, 3, 4 i 5 čine grupu kod koje je prolin sintetisan više od proseka, za razliku od genotipova 11, 6, 2, 8, 9 i 7 kod kojih to nije bio slučaj.



U oba eksperimenta uočeno je znatno povećanje sadržaja slobodnog prolina u tkivima eksplantata šećerne repe ili listovima izloženim nedostatku vode, kao i smanjenje mase, svežeg tkiva, sadržaja vode i aksilarnih izdanaka. Efekti stresa su statistički značajni među genotipovima svrstanim u grupe slabo, srednje i visoko tolerantne u polju, slični su u proseku, osim za sadržaj prolina u kontrolisanim uslovima, koji je znatno veći kod genotipova iz grupe visoke tolerantnosti. Koncentracija prolina u listu je bila veća u *in vitro* eksperimentu u odnosu na eksperiment u polukontrolisanim uslovima, ali je efekat izlaganja PEG-u bio slabiji u odnosu na efekat izazvan dejstvom stresa usled nedostatka vode u stakleniku. Sadržaj slobodnog prolina u uslovima deficita vode, u kontrolisanim uslovima sa PEG tretmanom, može da omogući razdvajanje genotipova šećerne repe na osnovu tolerancije prema suši. Tolerantnost je potvrđena i vizuelnim ocenjivanjem sposobnosti genotipova da održe turgor u kritičnom vremenskom periodu pri dužem izostanku padavina u polju.

Interakcija stres-genotip je značajna za sadržaj slobodnog prolina i za % suve materije u polukontrolisanim uslovima u stakleniku. Tretman PEG-om doveo je do smanjenja suve mase i broja aksilarnih pupoljaka, ali pri 3% PEG-u sveža masa se povećala. Znatno se povećala i koncentracija prolina, posebno u prisustvu 3 % PEG-a (genotipovi 1 i 10). U eksperimentu u kulturi tkiva dobijene su sedam puta veće vrednosti sadržaja prolina nego kod kontrolnih biljaka. Eksperiment u stakleniku je ukazao na trostruko povećanje sadržaja prolina u poređenju sa 3 i 5% PEG-om. Međutim, trendovi kod obe metode su isti kad je u pitanju porast u koncentraciji prolina zabeležen kao odgovor na oba načina izazivanja vodnog stresa kod genotipova šećerne repe. Prema tome, sinteza prolina kao reakcija na deficit vode može se uspešno primeniti za diferenciranje genotipova šećerne repe kad je u pitanju tolerancija prema suši. Eksperiment u *in vitro* uslovima je brži, a ponekad i prikladniji, posebno tretman 3% PEG-om, za ocenu stepena tolerancije šećerne repe na deficit vode.

Sadržaj prolina u pšenici progresivno se povećavao sa vremenom izloženosti stresu i brža akumulacija prolina je zabeležena kod tolerantnijih genotipova (Nayyar i Walia, 2003). Prema rezultatima Koskeroglu i Tuna (2010), inhibicija rasta biljaka kukuruza je značajna pod tretmanom PEG, posebno je smanjena suva masa korena i stabla. Povećan sadržaj prolina u listovima kukuruza gajenog u uslovima vodnog stresa (tretman PEG-om) je ustanovljen u odnosu na kontrolne biljke, što je u skladu sa rezultatima dobijenim u ovom eksperimentu.

Rezultati u eksperimentu *in vitro* sa PEG podržavaju hipotezu da visoka akumulacija prolina označava genotipove koji bolje tolerišu stres, uzevši u obzir nivoe tolerancije prema suši na osnovu procene vizuelnih simptoma u polju, iako se značajno ne razlikuju prema ovim nivoima tolerantnosti u polukontrolisanim uslovima u stakleniku. *In vitro* rezultati se slažu sa zaključkom Koskeroglu i Tuna (2010) i Roy et al. (2009), koji su ustanovili da je visok sadržaj prolina dobar indikator tolerantnosti prema nedostatku vode kod pirinča. I u ovom eksperimentu svi genotipovi šećerne repe imali su sličan način variranja sadržaja slobodnog prolina pod uticajem stresa. Genotipovi 1 i 10 sintetisali su više, a 2, 6 i 11 manje od prosečne količine prolina u kulturi tkiva, posebno na 3% PEG-u. DW/FW odnos za sadržaj prolina pokazuje inverziju rangiranja genotipova u zavisnosti od koncentracije PEG.

Postoji mnogo načina da se podigne nivo akumulacije osmolita kako bi se prevazišli neželjeni efekti vezani za njihovu akumulaciju i da se dokažu predviđene koncentracije osmolita kod najzastupljenijih kultura u uslovima stresa. Eksperimentalno je na različitim vrstama ustanovljeno da tolerantniji genotipovi imaju povećan sadržaj prolina. S tim u vezi bi i dalja istraživanja na šećernoj repi mogla da budu usmerena na testiranje kandidat-gena čija bi ekspresija bila promenjena u uslovima stresa. Oplemenjivanje sa zadatkom unošenja gena koji bi omogućili ispoljavanje ove osobine moglo bi biti veoma korisno i tada sadržaj prolina ne bi morao da bude samo parametar za diferenciranje genotipova prema nedostatku vode. U ovom istraživanju naročito se velike razlike u sintezi slobodnog prolina uočavaju kod eksperimenta u *in vitro* uslovima pri korišćenju 3% PEG, što bi moglo da bude vrlo primenljivo u selekciji.

Različiti mehanizmi mogu biti pokrenuti kao odgovor biljaka na stresne uslove. Tako, zatvaranje stoma pomaže smanjenju gubitka vode i održavanju turgora pod uslovima niskog vodnog potencijala zemljišta (Fleury et al., 2010). Dva mehanizma će se ukrstiti kada se visoka temperatura i suša dešavaju istovremeno, što je često slučaj u uslovima mediteranske klime. Osim toga, osmo-protaktant amino kiselina prolin ima toksično dejstvo kod toplotnog stresa i njegova akumulacija ne može biti odgovarajući mehanizam tolerancije u poljskim uslovima kada su stresovi izazvani toplotom i sušom kombinovani (Rizhsky et al., 2004; Salekdeh et al., 2009), ali svakako akumulacija prolina kao parametar za diferenciranje genotipova može da bude koristan u oplemenjivanju (Putnik-Delić et al, 2013).

Postoji dilema da li suša dominantno ograničava fotosintezu zatvaranjem stoma ili metaboličkim prilagođavanjem (Tezara et al., 1999; Lawson et al., 2003). Reakcija

biljaka putem zatvaranja stoma je opšte prihvaćena kao glavna odrednica smanjenja fotosinteze pod uticajem suše (Cornic, 2000). Ovo se pripisuje smanjenju koncentracije CO<sub>2</sub>, što dovodi do inhibicije ukupnog fotosintetskog metabolizama. I nekoliko efekata koji nisu u direktnoj vezi sa stomama pripisuju se zatvaranju stoma tokom suše (Attipalli et al., 2004). Ipak, naglašeno je da postoji visok stepen koregulacije između otvaranja stoma i fotosinteze (Farquhar et al., 2001; Hubbard et al., 2001.).

Adaptacija biljaka na promene uslova životne sredine, kao što je stres izazvan sušom, je od suštinskog značaja za opstanak i rast. Reakcije biljaka na sušu su veoma složene, posebno u vezi sa metabolizmom hloroplasta. Poznato je da suša uzrokuje inhibiciju fotosintetske aktivnosti u tkivima usled neravnoteže između usvajanja svetlosti i njenog iskorišćavanja (Foyer i Noctor, 2000).

U našem eksperimentu veća tolerantnost je ustanovljena sa većim od prosečnog smanjenja vrednosti SM izdanaka pod uticajem PEG tretmana i nižim Fv/Fm rezultatima. Drugi efekti posmatrani u *in vitro* uslovima ne mogu da se dovedu u vezu sa onima uočenim u stakleniku. Kod genotipova 1 i 11, najveći su efekti na koncentraciju pigmenata i PEG tretman. Genotipovi 2, 4, 5, 6 i 3 su imali manje od prosečnog smanjenja ukupne SM i broja listova i više od prosečnog povećanja % SM i prolina posle stresa izazvanog nedostatkom vode, što se razlikuje od reakcije genotipova 7, 10 i 8.

Uticaj stresa na suhu masu bio je negativan za sve genotipove gajene u polukontrolisanim uslovima, u rasponu između -0.2 i -1.5 standardne devijacije, dok je bio pozitivan u *in vitro* uslovima za devet genotipova, izuzev genotipova 5 i 1. Razlike između genotipova su takođe nešto veće kod biljaka gajenih u zemlji. Neki genotipovi su ispoljili paralelizam, tj. praćeni parametri su imali slične vrednosti 2 i 5 u grupi slabe tolerantnosti i 7, 9 i 11 u grupi srednje tolerantnosti. Razlike su bile najviše među genotipovima grupe visoke tolerantnosti (ustanovljene u polju).

Diferenciranje genotipova pomoću parametara fluorescencije je manje efikasno, jer su dobijene manje razlike među genotipovima u poređenju sa eksperimentom u kulturi tkiva (0, 3 i 5%PEG). Razlike u koncentraciji hlorofila su bile veće u odnosu na lisnu površinu, naravno posmatrane kao genotipske karakteristike nezavisno od tretmana.

Efekat gajenja u uslovima nedostatka vode na sadržaj vode u biljkama je bio negativan u ogledu u stakleniku i u uslovima *in vitro* za slabo i visoko tolerantnu grupu.

Za srednje tolerantnu grupu efekat je bio negativan u *in vitro* uslovima, a pozitivan u stakleniku.

## 6.5. Molekularne analize

Tolerantnost prema suši se postiže specifičnostima ćelije i tkiva, te fiziološkim, biohemijskim i molekularnim mehanizmima, koji uključuju specifične genske ekspresije i akumulaciju specifičnih proteina u uslovima suše. Različiti geni mogu da budu indukovani usled suše, i funkcija nekih od tih gena se može pretpostaviti na osnovu homologih sekvenci sa poznatim proteinima (Bohnert i Jenson, 1996; Shinozaki i Yamaguchi-Shinozaki, 1999). Geni indukovani u uslovima nedostatka vode nemaju samo funkciju u zaštiti biljne ćelije od dehidratacije, već i u regulisanju određenih gena koji učestvuju u prenosu signala u ćelijama u uslovima suše (Attipalli et al., 2004). U ovom eksperimentu je ispitano da li su pojedini kandidat-geni prisutni u genomu testiranih genotipova šećerne repe, i da li postoji potencijal za dalji razvoj markera. Korišćene su homologe i heterologe probe.

Regulacija transkripcije gena indukovanih sušom trebalo bi da bude potpuno proučena kako bi se razumela ekspresija ovih gena usled vodnog deficita (Attipalli et al., 2004).

Iako redukcionički pristup proučavanja izolovanog stresa (stresa izazvanog u kontrolisanim uslovima) znatno povećava naše znanje o mehanizmima tolerancije, interakcija između više stresova i kombinacija stresova treba da bude uzeta u obzir kako bi se napravio napredak relevantan i za poljske uslove. Pored ekoloških faktora, istraživački program vezan za sušu takođe bi trebalo da razmotri fenologiju biljaka, jer završetkom životnog ciklusa pre početka vodnog deficita, biljke su često u stanju da izbegnu sušu (Chaves et al., 2003).

Istraživanja genoma nude mogućnost za stvaranje sveobuhvatne baze podataka o promenama u ekspresiji gena, metabolizmu proteina i metabolitima koji nastaju kao rezultat izlaganja suši (Fleury et al., 2010). Upoređivanjem ekspresije gena u *Arabidopsis*-u i pirinaču pokazalo se da ove dve vrste imaju mnoge zajedničke gene koji se indukuju putem stresa (Shinozaki i Yamaguchi-Shinozaki, 2007). Tolerantnost prema abiotičkom stresu podrazumeva slične transkripcione faktore kod dikotiledonih i monokotiledonih biljaka i neke molekularne mehanizme tolerancije prema suši koji su

ranije opisani (Yamaguchi-Shinozaki i Shinozaki, 2006). To uključuje prenos signala i aktivaciju/regulaciju transkripcije, funkcionalnu zaštitu proteina (npr. dehidrini) akumulaciju osmolita (prolina, glicin betaina, trehaloze, manitola, mio-inozitola), indukciju hemijskih antioksidanata (askorbinske kiseline i glutaciona) i enzimsku redukciju toksičnosti reaktivnih kiseonikovih jedinjenja (superoksid dizmutaze, glutation S-transferaze). Homologni geni su identifikovani u eksperimentima na transkriptima u uslovima nedostatka vode u odnosu na linije pšenice koje se gajene u uslovima dovoljne količine vode i (Xue et al., 2006; Mohammadi et al., 2007, 2008; Aprile et al., 2009; Ergen i Budak, 2009; Ergen et al., 2009).

Iako je ustanovljena jednostavnost nekih regulatornih mehanizama kod različitih biljnih vrsta, molekularni pristup rešavanja problema dehidracije eksperimentima (Mohammadi et al., 2007; Aprile et al., 2009) je i dalje problematičan zbog varijacija koje se javljaju u dinamici stresa, kao i faze razvoja analiziranog tkiva. Zanimljivo je da su testovi kod kojih se koriste biočipovi otkrili neočekivane rezultate, kao što je smanjenje ekspresije glutation-vezanih gena, usled uskraćivanja vode tolerantnim linijama pšenice (Mohammadi et al., 2007), ili akumulacija prolina kod linija pšenice osetljivih na sušu (Ergen i Budak, 2009), što ukazuje da neki putevi / mehanizmi zavise od genotipa, trajanja, intenziteta i vrste stresa.

Veliki problem predstavlja što nije ustanovljena direktna veza između ekspresije gena i specifičnih fizioloških mehanizama (Fleury et al., 2010). Mohammadi et al. (2007) identifikovali su u korenu gene za tolerantnost na sušu kod linija heksaploidne pšenice i smatraju da se njihovom aktivacijom na taj način izbegava suša. Ova linija je zadržala veću neto produktivnost fotosinteze i relativni sadržaj vode u poređenju sa osetljivom linijom. Međutim, ovi istraživači nisu mogli da uspostave uzročno-posledične veze između transkripata i održavanja relativnog sadržaja vode u tkivu. U drugom eksperimentu, linija je pokazala veću stabilnost ćelijske membrane i nižu stopu gubitka vode u lišću, duži i razgranatiji korenov sistem nego kod osetljive linije (Mohammadi et al., 2008).

Postoji koncept da je moguće da smanjenje oksidativnog stresa omogućava i suprotstavljavanje stresovima prouzrokovanim drugim uzrocima u toku vegetacije. Takva istraživanja imaju tendenciju da se prošire na sve nivoe analiza biljaka kao i na uticaj gena u uslovima suše koji se procenjuje na nekoliko metaboličkih procesa (Attipalli et al., 2004). Praktična primena svih ovih istraživanja treba da bude fokusirana na inženjering nekoliko vodećih biljnih vrsta (pirinač, pšenica, šećerna trska, kukuruz,

šećerna repa....) koje su veoma zastupljene u ishrani i industriji sa ciljem povećanja tolerantnosti prema suši. Pošto se tu očekuju najveći ekonomski efekti molekularne analize su često usmerene na proučavanje efekata gena za tolerantnost na sušu u nerealnim uslovima (desikacijom izdvojenog lišća ili sejancima koji su prešli iz hidropona na vazduh, osmotski šok primenom polietilen glikola) i retko prikazuju fenotip u polju i očekivane vrednosti u oplemenjivanju (Blum, 2005, Passioura, 2007). U ovom ogledu su primenjene neke od prethodno kritikovanih metoda, ali su rezultati tih istraživanja baš iz gore navedenih razloga povezani sa rezultatima observacionih testova u poljskim uslovima za date genotipove šećerne repe.

Našim saznanjima o mehanizmu tolerancije prema suši doprineli su rezultati istraživačkih programa namenjenih specifičnim fiziološkim, genetskim ili molekularnim aspektima odgovora na sušu. U ovom istraživanju, analizom promena u ekspresiji 13 kandidat gena kod različitih genotipova šećerne repe, utvrđene su promene u ekspresiji na nivou mRNK u uslovima nedostatka vode u odnosu na kontrolu, a pronađene su i razlike između genotipova. Na ovaj način je potvrđeno prisustvo pojedinih testiranih kandidat gena u genomu analiziranih genotipova i ustanovljeno je da postoji potencijal za dalji razvoj markera za neke od kandidata.

PCR produkti koji odgovaraju fragmentima 3, 4, 6, 13 i 15, dobijeni na templejtima cDNKs i cDNKk, su se razlikovali. Neophodno je naglasiti da su se PCR produkti za fragmente 4, 6 i 15 kod genotipa 7 razlikovali od ostalih genotipova. Na cDNKs PCR produkti za fragmente 6 i 15 su kod ovog genotipa bili slabije vidljivi što znači da je količina produkta bila manja, dok PCR produkt koji odgovara fragmentu 4 uopšte nije bio prisutan. Kod svih genotipova i na cDNKs i na cDNKk dobijeni su PCR produkti koji odgovaraju fragmentima 1, 5, 11 i 12. Najveće razlike među genotipovima dobijene su kod umnožavanja fragmenta 3. Fragment 1, koji odgovara genu koji kodira dehidrin iz šećerne repe, je kod genotipova 1, 2, 3, 4, 6 i 9 bio umnožen u većoj količini na cDNKs nego na cDNKk templejtu, što se može objasniti indukcijom usled nedostatka vode. Kod genotipova 5, 7, 8 i 11 dobijene su jednake količine PCR produkata koji odgovaraju ovom genu na cDNKs i na cDNKk. Kod genotipa 10 količina produkta je bila manja na cDNKs nego na cDNKk što se može objasniti represijom usled suše. Kod fragmenta 3 koji odgovara genu iz šećerne repe i lucerke koji kodira protein čija je ekspresija izazvana hladnoćom i sušom, dobijen je rezultat koji ukazuje na prisustvo introna na genomskoj DNK, a koji je isečen pri sintezi iRNK. Ovo je poslužilo kao veoma korisna unutrašnja kontrola, kojom je dokazano da ne

postoji kontaminacija genomskom DNK u preparatu cDNK. I kod fragmenta 4 su dobijeni različiti rezultati za testirane genotipove. Fragment 4, koji odgovara genu iz šećerne repe koji kodira dehidrin cistein proteinazu, a čija je ekspresija izazvana sušom, je kod genotipova 1, 2, 4, 6 i 9 umnožen u većoj količini u uslovima nedostatka vode, dok je kod genotipova 3, 5, 7, 8, 10 i 11 umnožen u manjoj količini u uslovima suše u odnosu na kontrolu. Ustanovljeno je da najverovatnije postoji familija gena koji odgovaraju fragmentu 5. Fragment 5 odgovara genu iz šećerne repe i *Arabidopsis*-a koji kodira protein čija je ekspresija izazvana sušom. Veća razlika u količini PCR produkta koji odgovara fragmentu 5 umnoženog na cDNKs i cDNKk je uočena jedino kod genotipa 9. Fragment 6 koji odgovara genu iz šećerne repe i *Arabidopsis*-a, za sada nepoznate funkcije, umnožen je u različitim količinama na cDNKs, cDNKk i na genomskoj DNK. Pojedini fragmenti (7, 9 i 10) nisu dali produkt ni kod jednog testiranog genotipa. Fragment 7 heterologna proba koja odgovara dehidrinu kukuruza nije amplifikovan ni na jednom uzorku. Fragmenti 9 i 10 odgovaraju genima koji kodiraju proteine šećerne repe koji se indukuju u uslovima stresa. Moguće je da je broj kopija ovih gena u genomu šećerne repe veoma mali i da u testiranim uzorcima nije bilo njihove ekspresije pa zbog toga nije bilo ni odgovarajućih PCR produkata. Takođe, ne može da se isključi mogućnost da odabrani prajmeri ili uslovi polimeraznih lančanih reakcija nisu bili odgovarajući pa je rezultat odsustvo produkata reakcija u kojima je očekivano umnožavanje ovih fragmenata. Na osnovu rezultata PCR reakcija u kojima je umnožavan fragment 12 koji odgovara genu koji kodira protein specifičan za list iz šećerne repe utvrđeno je da su razlike u količinama PCR produkata isključivo rezultat različitih količina odgovarajuće iRNK prisutne u listu u momentu uzimanja, a nisu rezultat različitih količina cDNK korišćenih u PCR reakcijama. Ovaj rezultat je poslužio kao dodatna kontrola kvaliteta cDNK korišćene u ovim istraživanjima, pomoću koje je ustanovljeno da su cDNK templejti korišćeni u ovom radu veoma dobrog kvaliteta i da su, shodno tome, rezultati PCR reakcija zaista odraz razlika u nivoima ekspresija kandidat-gena koji su proučavani u ovom istraživanju. Iako su kod svih genotipova i tretmana za ekstrakcije nukleinskih kiselina uzimani najmlađi, potpuno razvijeni listovi sa više biljaka, ne može se savim isključiti mogućnost da su razlike u sastavu iRNK u listovima rezultat i različitih mikroklimatskih uslova kao što su npr. osvetljenost i položaj konkretnog lista. Fragment 13 koji odgovara genu čija je ekspresija indukovana prisustvom fosfata je kod genotipova 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9 i 11 bio prisutan samo na genomskoj, a kod genotipova 8 i 10 i na obe cDNK, dok kod genotipa 1 nije bilo

produkta. Produkt reakcija umnožavanja fragmenta 14, koji odgovara genu iz šećerne repe i šargarepe koji kodira glikoprotein, je kod genotipova 1, 2, 3, 4, 7, 8, 9, 10 bio prisutan samo na genomskoj DNK, a kod genotipova 5 i 6 nije uopšte bilo produkta, čak ni pri manje strogim uslovima za PCR reakciju (niža temperatura hibridizacije). Ovaj gen je inače indukovano mehaničkim povredama pa, iako je i mehanička povreda vrsta abiotičkog stresa, ne iznenađuje odsutvo odgovarajuće iRNK u uslovima nedostatka vode. PCR produkti za gene koji kodiraju fruktozu-bisfosfat aldolazu iz šećerne repe (fragment 11) i protein čija je ekspresija izazvana auksinom (fragment 15) su dobijeni samo na cDNKs i cDNKk, dok na genomskoj DNK nisu, najverovatnije zato što su prisutni u veoma malom broju kopije u genomu. Ovim istraživanjima je ustanovljeno da analiza razlika u ekspresiji kandidat-gena može da posluži za razvoj DNK markera za pojedina svojstva po kojima se genotipovi šećerne repe razlikuju u odgovoru na nedostatak vode. Ovde je posebno interesantno to što je funkcija kandidat-gena uglavnom poznata, pa bi opsežnijim istraživanjima, koja bi uključila veći broj kandidat gena, ali i njihovih produkata, bilo moguće saznati više o mehanizmima koji na molekularnom nivou čine deo odgovora šećerne repe na vodni deficit.

Testiranje selekcionog materijala na ovaj način je korisno, jer omogućuje ispitivanje upotrebljivosti pojedinih već objavljenih sekvenci povezanih sa reakcijom biljaka na osmotski, vodni i uopšte abiotički stres (kandidat gena). Unapređenje oplemenjivanja u cilju povećanja tolerantnosti prema nedostatku vode, omogućeno je boljim razdvajanjem genotipova na osnovu potencijala tolerantnosti prema nedostatku vode u ispitivanoj fazi razvoja biljke bazirano na prisustvu/odsustvu pojedinih gena.



## **7. ZAKLJUČAK**

- Biljke izložene stresu u proseku imaju oko tri lista manje, za četiri procenta veći % SM i sedmostruko veći sadržaj prolina.
- Diferenciranje genotipova pomoću parametara fluorescencije hlorofila je manje efikasno, jer su dobijene manje razlike između genotipova u poređenju sa eksperimentom u kulturi tkiva (0, 3 i %PEG) i u polukontrolisanim uslovima gde je analiziran sadržaj prolina.
- Veća tolerantnost se pojavljuje sa većim od prosečnog smanjenja vrednosti SM izdanaka pod uticajem PEG tretmana i nižim Fv/Fm rezultatima.
- Sinteza prolina je bila stimulisana nedostatkom vode u polukontrolisanim uslovima kod svih genotipova, a posebno kod nekih iz slabo tolerantne (2, 6) i visoko tolerantne (4) grupe, sa povećanjem od 160% i 90 puta i višim prosečnim povećanjem za slabo tolerantnu grupu (15 puta) nego za srednje i visoko tolerantnu (4 i 6 puta). Genotipovi kod kojih je koncentracija prolina najmanje promenjena su bili iz srednje (9, 11) i visoko (10) tolerantne grupe.
- Tretmanom PEG-om smanjuje se ukupna suva masa i više nego polovi broj aksilarnih izdanaka. PEG u koncentraciji od 3% utiče na povećanje ukupne sveže mase. Pod uticajem PEG-a smanjuje se broj pupoljaka, ali se povećava masa pupoljaka, i procenat suve materije, sa smanjenjem sadržaja vode u tkivima. U *in vitro* uslovima sinteza prolina se povećava sa porastom koncentracije PEG.
- Tretman PEG-om je imao pozitivan prosečan uticaj na suhu masu u koncentraciji od 3% dok je u koncentraciji od 5% imao pozitivan na ukupnu suhu masu i negativan uticaj na ukupnu svežu masu, odnosno uticao je na smanjenje sadržaja vode i rast biljaka.
- Sinteza prolina u uslovima stresa je kod oba eksperimenta bila značajno povećana u odnosu na kontrolu i to u *in vitro* uslovima šest puta, a u polukontrolisanim uslovima u stakleniku šesnaest puta. Povećanje sadržaja prolina u biljkama gajenim u polukontrolisanim uslovima je bilo tri puta veće u odnosu na eksperiment sa 3 i 5% PEG-om.
- Dok se na osnovu koncentracije prolina ustanovljene u ekperimentu *in vitro* genotipovi mogu razdvojiti i svrstati na najviši nivo tolerantnosti prema nedostatku

vode u skladu s observacionim testom u poljskim uslovima, test u polukontrolisanim uslovima u stakleniku je manje efektan u tom smislu.

- Oba eksperimenta u kontrolisanim uslovima sa rastućim nivoom PEG-a i izazivanje stresa nedostatkom vode u eksperimentu u polukontrolisanim uslovima, pokazali su znatno povećanje sadržaja slobodnog prolina u tkivima eksplantata šećerne repe ili listovima izloženim nedostatku vode, kao i smanjenje mase, sadržaja vode i broja aksilarnih izdanaka.
- Kod većine genotipova dolazi do paralelnog povećanja koncentracije prolina kao odgovor na stres i u polu i u kontrolisanim uslovima (genotipovi: 11, 9, 3, 8, 5, 7). Neki genotipovi imaju veću koncentraciju prolina pod uticajem stresa u *in vitro* uslovima (1 i 10), a neki pri vodnom deficitu izazvanom u polukontrolisanim uslovima (4, 6 i posebno 2).
- Prolin kao potencijalni parametar - indikator tolerantnosti genotipova prema suši je adekvatniji od ukupne suve mase.
- Trendovi kod oba metoda su isti kad je u pitanju porast koncentracije prolina zabeležen kao odgovor na oba načina nametanja vodnog stresa kod genotipova šećerne repe. Rezultati su pokazali da je test u *in vitro* uslovima (posebno tretman 3% PEG-om) efikasniji i brži za ocenu tolerantnosti prema suši od eksperimenta u polukontrolisanim uslovima. Grupisanje genotipova prema nivou tolerisanja nedostatka vode na osnovu koncentracije prolina ustanovljene u ekperimentu *in vitro* dalo je isti rezultat kao i opservacioni test u poljskim uslovima. Dakle, sinteza prolina kao reakcija na deficit vode može se uspešno primeniti za diferenciranje genotipova šećerne repe kad je u pitanju tolerancija prema suši.
- Analizom ekspresije 13 kandidat gena kod testiranih genotipova šećerne repe, utvrđene su promene na nivou iRNK u uslovima nedostatka vode u odnosu na kontrolu, i pronađene su i razlike između genotipova. Rezultati umnožavanja fragmenata 3, 4, 6, 13 i 15 bili su različiti za različite genotipove kada je templejt bila cDNKs i cDNKk, s tim što se kod fragmenata 4, 6 i 15 produkt reakcije razlikovao jedino kod genotipa 7 u smislu što je na cDNKs količina produkata reakcije bila manja kod fragmenata 6 i 15, odnosno nije ga bilo kod fragmenta 4. Testiranjem fragmenata 1, 5, 11 i 12 dobijen je produkt kod svih genotipova i na cDNKk i na cDNKs. Najveće razlike među genotipovima su dobijene testiranjem fragmenta 3. Fragmenti 7, 9 i 10 nisu bili umnoženi ni kod jednog genotipa, pri

različitim testiranim uslovima reakcije. Fragment 14 je dao rezultate samo na genomskoj DNK i to ne kod svih genotipova. Ustanovljeno je da postoji potencijal za dalji razvoj markera.

- Rezultati ovog rada ukazuju na stepen varijabilnosti analiziranog selekcionog materijala - genotipova šećerne repe i na najrelevantnije fiziološko-molekularne kriterijume za ocenu tolerantnosti prema nedostatku vode. Ovi rezultati mogu da se primene u procesu oplemenjivanja šećerne repe koje je usmereno na povećanje tolerantnosti prema ovom abiotičkom činiocu.

## **8. LITERATURA**

- Achard P, Cheng H, De Grauwe L, Decat J, Schoutteten H, Moritz T, Van Der Straeten D, Peng J, Harberd NP (2006) Integration of plant responses to environmentally activated phytohormonal signals. *Science* 311: 91-94.
- Ain-Lhout F, Zunzunegui M, Diaz Barradas MC, Tirado R, Clavijo A, Gracia Novo F (2001) Comparison of proline accumulation in two Mediterranean shrubs subjected to natural and experimental water deficit. *Plant and Soil* 230: 175-183.
- Al-Khayri JM (2002) Growth, proline accumulation and ion content in sodium chloride-stressed callus of date palm. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant* 38: 79-82.
- Al-Khayri JM, Al-Bahrany AM (2004) Growth, water content, and proline accumulation in drought-stressed callus of date palm. *Biologia Plantarum (Prague)* 48: 105-108.
- Altinkut A, Kazan K, Ipekci Z, Gozukirmizi N (2001) Tolerance to paraquat is correlated with the traits associated with water stress tolerance in segregating F<sub>2</sub> populations of barley and wheat. *Euphytica* 121: 81-86.
- Anjum SA, Wang LC, Farooq M, Hussain M, Xue LL, Zou CM (2011) Brassinolide application improves the drought tolerance in maize through modulation of enzymatic antioxidants and leaf gas exchange. *Journal of Agronomy and Crop Science* 197, 3: 177-185.
- Aprile A, Mastrangelo AM, De Leonardis AM, Galiba G, Roncaglia E, Ferrari F, De Bellis L, Turchi L, Giuliano G, Cattivelli L (2009) Transcriptional profiling in response to terminal drought stress reveals differential responses along the wheat genome. *BioMed Central Genomics* 10, 279.
- Ashraf M, Foolad MR (2007) Roles of glycinebetaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environmental and Experimental Botany* 59: 206-216.
- Attipalli RR, Kolluru VC, Munusamy V (2004) Drought-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants. *Journal of Plant Physiology* 161: 1189-1202.

- Atwell S, Huang YS, Vilhjálmsson BJ, Willems G, Horton M, Li Y, Meng D, Platt A, Tarone AM, Hu TT, Jiang R, Mulyati NW, Zhang X, Amer MA, Baxter I, Brachi B, Chory J, Dean C, Debieu M, Meaux J, Ecker JR, Faure N, Kniskern JM, Jones JDG, Michael T, Nemri A, Roux F, Salt DE, Tang C, Todesco M, Traw MB, Weigel D, Marjoram P, Borevitz JO, Bergelson J, Nordborg M (2010) Genome-wide association study of 107 phenotypes in *Arabidopsis thaliana* inbred lines. *Nature* 465: 627-631.
- Bartels D, Sunkar R (2005) Drought and salt tolerance in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences* 24: 23-58.
- Bates D, Maechler M, Bolker B (2011) *lme4: Linear mixed-effects models using Eigen and syntax*. R package version 0.999375-42. <http://CRAN.R-project.org/package=lme4>.
- Bates LS (1973) Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil* 39: 205-207.
- Behnam B, Kikuchi A, Celebi-Toprak F, Yamanaka S, Yamanaka S, Kasuga M, Yamaguchi-Shinozaki K, Watanabe K (2006) The *Arabidopsis* DREB1A gene driven by the stress-inducible rd29A promoter increases salt-stress tolerance in proportion to its copy number in tetrasomic tetraploid potato (*Solanum tuberosum*). *Plant Biotechnology* 23: 169-177.
- Blum A (2005) Drought resistance, water-use efficiency, and yield potential - are they compatible, dissonant, or mutually exclusive? *Australian Journal of Agricultural Research* 56: 1159-1168.
- Bohnert HJ, Jenson RG (1996) Plant stress adaptations - making metabolism move. *Trends in Biotechnology* 14: 267-74.
- Brdar-Jokanovic MD, Maksimovic IV, Nikolic-Djoric EB, Kraljevic-Balalic MM, Kobiljski BD (2010) Selection Criterion to Assess Wheat Boron Tolerance at Seedling Stage: Primary Vs. Total Root Length. *Pakistan Journal of Botany* 42, 6: 3939-3947.
- Campbell LG (2002) Sugar beet quality improvement. *Journal of Crop Production* 5: 395-413.
- Celebi-Toprak F, Behnam B, Serrano G, Kasuga M, Yamaguchi-Shinozaki K, Naka H, Watanabe JA, Yamanaka S, Watanabe KN (2005) Tolerance to salt stress of the transgenic tetrasomic tetraploid potato, *Solanum tuberosum*

cv. Desiree appears to be induced by the DREB1A gene and rd29A promoter of *Arabidopsis thaliana*. *Breeding Science* 55: 311-319.

- Chaves MM, Maroco JP, Pereira JS (2003) Understanding plant responses to drought: from genes to the whole plant. *Functional Plant Biology* 30: 239-264.
- Chaves MM, Flexas J, Pinheiro C. (2009) Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. *Annals of Botany* 103: 551-560.
- Chazen O, Hartung W, Neumann PM (1995) The different effects of PEG 6000 and NaCl on leaf development are associated with differential inhibition of root water transport. *Plant Cell and Environment* 18: 727-735.
- Chazen O, Neumann PM (1994) Hydraulic signals from the roots and rapid cell wall hardening in growing maize leaves, are primary responses to PEG induced water deficits. *Plant Physiology* 104: 1385-1392.
- Choluj D, Karwowska R, Ciszewska A, Jasinska M (2008) Influence of long-term drought stress on osmolyte accumulation in sugar beet (*Beta vulgaris* L.) plants. *Acta Physiologiae Plantarum* 30: 679-687.
- Close TJ, Kortt AA, Chandler PM (1989) A cDNA-based comparison of dehydration-induced proteins (dehydrins) in barley and corn. *Journal of Plant Molecular Biology* 13, 1: 95-108.
- Coca M, Garcia MT, Gonzalez G, Pena M, Garcia JA (2004) Study of coloured components formed in sugar beet processing. *Food Chemistry* 86: 421-433.
- Collins NC, Tardieu F, Tuberosa R (2008) Quantitative trait loci and crop performance under abiotic stress: where do we stand? *Plant Physiology* 147: 469-486.
- Colom MR, Vazzana C (2003) Photosynthesis and PSII functionality of drought-resistant and drought-sensitive weeping lovegrass plants. *Environmental and Experimental Botany* 49: 135-144.
- Conde A, Chaves MM, Geros H (2011) Membrane transport, sensing and signaling in plant adaptation to environmental stress. *Plant and Cell Physiology* 52, 9: 1583-1602.
- Cornic G (2000) Drought stress inhibits photosynthesis by decreasing stomatal aperture-not by affecting ATP synthesis. *Trends in Plant Science* 5: 187-8.

- Čulafić Lj, Naunović G, Cerović G, Konjević R (1992) Fiziologija biljaka, praktikum, Naučna knjiga, Beograd: 63.
- Davies WJ, Bacon MA, Thompson DS, Sobeigh W, Rodriguez LG (2000) Regulation of leaf and fruit growth in plants in drying soil: exploitation of the plant's chemical signaling system and hydraulic architecture to increase the efficiency of water use in agriculture. *Journal of Experimental Botany* 51: 1617-1622.
- Davies WJ, Kudoyarova G, Hartung W (2005) Long-distance ABA signaling and its relation to other signaling pathways in the detection of soil drying and the mediation of the plant's response to drought. *Journal of Plant Growth Regulation* 24: 285-295.
- Davies WJ, Zhang JH (1991) Root signals and the regulation of growth and development of plants in drying soil. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 42: 55-76.
- Delauney AJ, Verma DPS (1993) Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. *The Plant Journal* 4: 215-223.
- De los Reyes BG, McGrath JM, Myers S, Derrico C (2000) Differential gene expression in sugar beet seedlings (*Beta vulgaris*) germinated under stress conditions. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucest/>
- De los Reyes BG, McGrath JM, Myers S (2001) Differential gene expression in sugar beet seedlings (*Beta vulgaris*) germinated under stress conditions. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucest/>
- De los Reyes BG, McGrath JM, Myers S, Trebbi D(2001a) Expressed Sequence Tags of *Beta vulgaris*. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucest/>
- Demiral T, Turkan I (2005) Comparative lipid peroxidation, antioxidant defense systems and proline content in roots of two rice cultivars differing in salt tolerance. *Environmental and Experimental Botany* 53: 247-257.
- DeRonde JA, Spreeth MH, Cress WA (2000) Effect of antisense proline-5-carboxylate reductase transgenic soybean plants subjected to osmotic and drought stress. *Plant Growth Regulation* 32: 13-26.
- Djakovic-Petrovic T, De Wit M, Voisenek LACJ, Pierik R (2007) DELLA protein function in growth responses to canopy signals. *Plant Journal* 51: 117-126.

- Demmers-Derks H, Mitchell RAC, Mitchell VJ, Lawlor DW (1998) Response of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) yield and biochemical composition to elevated CO<sub>2</sub> and temperature at two nitrogen applications. *Plant, Cell and Environment* 21: 829-836.
- Dickison WC (2000) *Integrative Plant Anatomy*. Academic Press, San Diego.
- Dodd IC (2007) Soil moisture heterogeneity during deficit irrigation alters root-to-shoot signaling of abscisic acid. *Functional Plant Biology* 34: 439-448.
- Ergen NZ, Budak H (2009) Sequencing over 13 000 expressed sequence tags from six subtractive cDNA libraries of wild and modern wheats following slow drought stress. *Plant, Cell and Environment* 32: 220-236.
- Ergen NZ, Thimmapuram J, Bohnert HJ, Budak H (2009) Transcriptome pathways unique to dehydration tolerant relatives of modern wheat. *Functional and Integrative Genomics* 9: 377-396.
- Fahn A, Cutler DF (1992) In: Braun HJ, Carlquist S, Ozenda P Roth I, eds. *Xerophytes (Encyclopedia of Plant Anatomy, Vol. XIII, No. 3)*. Berlin, Stuttgart: Gebru » der Borntraeger.
- FAO (2002) *Deficit Irrigation Practices*. Water Reports No. 22. Rome <http://faostat.fao.org/site>
- Farquhar GD, Von Caemmerer S, Berry JA (2001) Models of photosynthesis. *Plant Physiology* 125: 42-45.
- Feuillet C, Langridge P, Waugh R (2008) Cereal breeding takes a walk on the wild side. *Trends in Genetics* 24: 24-32.
- Fleury D, Jefferies S, Kuchel H, Langridge P (2010) Genetic and genomic tools to improve drought tolerance in wheat. *Journal of Experimental Botany* 61, 12: 3211-3222.
- Foulkes MJ, Sylvester-Bradley R, Weightman R, Snape JW (2007) Identifying physiological traits associated with improved drought resistance in winter wheat. *Field Crops Research* 103: 11-24.
- Foyer CH, Noctor G (2000) Oxygen processing in photosynthesis: regulation and signaling. *New Phytologist* 146: 359-88.
- Ghoulam CA, Foursy A, Fares K (2002) Effects of salt stress on growth, inorganic ions and praline accumulation in relation to osmotic adjustment in five sugarbeet cultivars. *Environmental and Experimental Botany* 47: 39-50.



- Gupta P, Langridge P, Mir R (2010) Marker-assisted wheat breeding: present status and future possibilities. *Molecular Breeding* 26: 145-161.
- Gzik A (1996) Accumulation of protein and pattern of  $\alpha$ -amino acids in sugar beet plants in response to osmotic, water and salt stress. *Environmental and Experimental Botany* 36: 29-38.
- Hadfield J (2010) Metode MCMC Methods for Multi-Response Generalized Linear Mixed Models: MCMCglmm R paket. *Journal of Statistical Software* 33, 2: 1-22.
- Heinisch O (1949) Zuckerrüben-Samenbau, Band 14. Greif Graphischer Grossbetrieb, Berlin.
- Helm J (1957) Versuch einer morfologisch-systematischen Gliderung der Art *Beta vulgaris* L. *Züchter* 27: 203-222.
- Hoai NTT, Shim IS, Kobayashi K, Kenji U (2003) Accumulation of some nitrogen compounds in response to salt stress and their relationships with salt tolerance in rice (*Oryza sativa*L.) seedlings. *Plant Growth Regulation* 41: 159-164.
- Holm G (1954) Chlorophyll mutations in barley. *Acta Agriculturae Scandinavica* 4: 457-471.
- Hu H, Dai M, Yao J, Xiao B, Li X, Zhang Q, Xiong L (2006) Over expressing a NAM, ATAF, and CUC (NAC) transcription factor enhances drought resistance and salt tolerance in rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 103: 12987-12992.
- Huang X, Wei X, Sang T, Zhao Q, Feng Q, Zhao Y, Li C, Zhu C, Lu T, Zhang Z, Li M, Fan D, Guo Y, Wang A, Wang L, Deng L, Li W, Lu Y, Weng Q, Liu K, Huang T, Zhou T, Jing Y, Li W, Lin Z (2010) Genome-wide association studies of 14 agronomic traits in rice landraces. *Nature Genetics* 42: 961-967.
- Hubbard RM, Ryan MG, Stiller V, Sperry JS (2001) Stomatal conductance and photosynthesis vary linearly with plant hydraulic conductance in *Ponderosa* pine. *Plant, Cell and Environment* 24: 113-21.
- Iannucci A, Rascio A, Russo M, Di Fonzo N, Martiniello P (2000) Physiological responses to water stress following a conditioning period in berseemclover. *Plant and Soil* 223: 217-227.

- Ito Y, Katsura K, Maruyama K, Taji T, Kobayashi M, Seki M, Shinozaki K, Ymaguchi-Shinozaki K (2006) Functional analysis of rice DREB1/CBF-type transcription factors involved in cold-responsive gene expression in transgenic rice. *Plant and Cell Physiology* 47: 141-153.
- Jamaux I, Steinmertz A, Belhassen E (1997) Looking for molecular and physiological markers of osmotic adjustment in sunflower. *New Phytologist* 137: 117-127.
- Jinyou Du, Xiaoyang Chen, Wei Li and Qiong Gao (2004) Osmoregulation mechanism of drought stress and genetic engineering strategies for improving drought resistance in plants. *Forestry Studies in China* 6, 2: 56-62.
- Jones PD, Listeri DH, Jaggard KW, Pidgeon JD (2003) Future climate impact on the productivity of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) in Europe. *Climatic change* 58: 93-108.
- Joyce DC, Aspinall D, Edwards GR (1983) Water deficit and the growth and anatomy of the radish fleshy axis. *New Phytologist* 93: 439-446.
- Jun H, Hariji R, Adam L, Rozwadowski KL, Hammerlindl JL, Keller WA, Selvaraj G (2000) Genetic engineering of glycine betaine production towards enhancing stress tolerance in plants. *Plant Physiology* 122: 747-756.
- Kanaoka MM, Pillitteri LJ, Fujii H, Yoshida Y, Bogenschutz NL, Takabayashi J, Zhu JK, Torii KU (2008) SCREAM/ICE1 and SCREAM2 specify three cell-state transitional steps leading to *Arabidopsis* stomatal differentiation. *Plant Cell* 20: 1775-1785.
- Kastori R, Petrović N (1992) Rastenje i razviće šećerne repe: 173-189. U: Spasić, P. et al. (1992): Šećerna repa, Jugošćećer DD, Beograd: 751.
- Kastori R, Petrović N (1992a) Disanje šećerne repe: 213-223. U: Spasić et al. (1992): Šećerna repa, Jugošćećer DD, Beograd: 751.
- Kavi Kishor PB, Sangam S, Amrutha RN, Sri Laxmi P, Naidu KR, Rao KRSS, Rao S, Reddy KJ, Theriappan P, Sreenivasulu N (2005) Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: Its implications in plants growth and abiotic stress tolerance. *Current Science* 88: 424-438.
- Казаков ЕД, Казакова СМ, Гуляев БИ (1986) Действие и последствие засухи на фотосинтез листьев в онтогенезе сахарной свеклы. *Физ. и биох. куль. рас.* 5: 459-466.

- Kenter C, Hoffmann CM, Bernward M (2006) Effects of weather variables on sugar beet yield development (*Beta vulgaris* L.). *European Journal of Agronomy* 24: 62-69.
- Kevrešan S, Kristić B, Popović M, Kovečec L, Pajević S, Kandrač J, Malenčić Đ (1997/1998) Biochemical changes in sugar beet lines in dependence on soil moisture. *Biologia Plantarum* 40: 245-250.
- Knapp E (1958) Beta Rüben. In: T. Roemer and W. Rudorf (eds.) *Handbuch der Pflanzenzüchtung*. Paul Parey, Berlin, 3.
- Koskeroglu S, Tuna AL (2010) The investigation on accumulation levels of proline and stress parameters of the maize (*Zea mays* L.) plants under salt and water stress. *Acta Physiologiae Plantarum* 32: 541-549.
- Lawson T, Oxborough K, Morison JIL, Baker NR (2003) The responses of guard and mesophyll cell photosynthesis to CO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>, light, and water stress in a range of species are similar. *Journal of Experimental Botany* 54: 1743-1752.
- Lebreton C, Lazić-Jančić V, Steed A, Pekić S, Quarrie SA (1995) Identification of QTL for drought responses in maize and their use in testing causal relationships between traits. *Journal of Experimental Botany* 46: 853-865.
- Levitt J (1980) Responses of plants to environmental stress: chilling, freezing and high temperature stresses, 2<sup>nd</sup> ed. New York: Academic Press.
- Liu J, Zhu JK (1997) Proline accumulation and salt-stress-induced gene expression in a salt-hypersensitive mutant of *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 114: 591-596.
- Liu Q, Kasuga M, Sakuma Y, Abe H, Miura S, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (1998) Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA-binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low-temperature-responsive gene expression in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 10, 8: 1391-1406.
- Liu W, He Y, Xiang J, Fu C, Yu L, Zhang J, Li M (2011) The physiological response of suspension cell of *Capparis spinosa* L to drought stress. *Journal of Medicinal Plants Research* 5, 24: 5899-5906.
- Luković J, Maksimović I, Zorić L, Nagl N, Perčić M, Polić D, Putnik-Delić M (2009) Histological characteristics of sugar beet leaves potentially linked to drought tolerance, *Industrial Crops and Products* 30, 281-286.

- Maksimovic L, Dragovic S (2001) Potrebe za vodom i efekat navodnjavanja ratarskih biljaka. Zbornik radova X Kongresa JDPZ, Beograd, CD.
- Maksimović I, Ćurčić Ž, Nagl N, Kovačev L (2006) Changes in petioles and leaf blades in response to progressive drought in young sugar beet plants. XV FESPB Congress, Federation of European Societies of Plant Biology, Lyon, France: 184.
- Maksimović I, Nagl N, Malenčić Đ, Kovačev L, Petrović N, Perčić M, Milić S (2004) Effect of short-term water deficiency on sugar beet genotypes. The 14th FESPB Congress Book of Abstracts, August 23-27, Cracow, Poland, Acta Physiologiae Plantarum 26, 3: 85-86.
- Maksimović I, Pajević S (2002) Praktikum iz fiziologije biljaka. Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet, Prirodno-matematički fakultet.
- Marschner H, Kylin A, Kuiper PJC (1981) Differences in salt tolerance of three sugar beet genotypes. Physiologia Plantarum 51: 234-238.
- Maxwell K, Johnson GN (2000) Chlorophyll fluorescence – a practical guide. Journal of Experimental Botany 51: 659-668.
- Mc Cree KJ, Richardson G (1987) Stomatal Closure vs Osmotic Adjustment: A Comparison of Stress Responses. Crop Science 27, 539-543.
- Mezei S, Kovacev L, Nagl N (2006) Sugar beet micropropagation. Biotechnology & Biotechnological Equipment 20, 1: 9-14.
- Milford GFJ, Lawlor DV (1976) Water and physiology of sugar beet. Proceedings IIRB39: 95-108.
- Milošević S, Savić S, Stikić R, Zečević B, Đorđević R, Zdravković J (2005) Delimično sušenje korenova - novi pristup u gajenju i navodnjavanju paprike (*Capsicum annuum* L) i paradajza (*Lycopersicon esculentum* L). Journal of Scientific Agricultural Research 66, 1: 69-73.
- Mizoguchi M, Umezawa T, Nakashima K, Kidokoro S, Takasaki H, Fujita Y, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (2010) Two closely related subclass II SnRK2 protein kinases cooperatively regulate drought-inducible gene expression. Plant and Cell Physiology 51: 842-847.
- Mohammadi M, Kav NN, Deyholos MK (2007) Transcriptional profiling of hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.) roots identifies novel, dehydration-responsive genes. Plant, Cell and Environment 30: 630-645.

- Mohammadi M, Kav NN, Deyholos MK (2008) Transcript expression profile of water-limited roots of hexaploid wheat (*Triticum aestivum* 'Opata'). *Genome* 51: 357-367.
- Monreal JA, Jimenez ET, Remesal E, Morillo-Velarde S, Garcia- Maurino S, Echevarria C (2007) Proline content of sugar beet storage roots: Response to water deficit and nitrogen fertilization at field conditions. *Environmental and Experimental Botany* 60, 2: 257-267.
- Morot-Guadry JF, Job D, Lea PJ (2001) Amino acid metabolism. In: Lea PJ, Morot-Guadry J-F, editors. *Plant nitrogen*. Berlin: Springer; 167-211.
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, HornG, Erlich H (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 51, 263-273.
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.
- Nagl N, Maksimovic I, Curcic Z, Putnik-Delic M, Kovacev L (2010) Effect of induced water deficit on sugar beet micropropagation. 72nd IIRB Congress – 72e Congrès de l'IIRB – 72. IIRB Kongress – 22-24/06/2010 – Copenhagen (DK), Proceedings of Papers – Compte Rendu des Communications – Tagungsbeiträge: 179-185.
- Nakashima K, Ito Y, Yamaguchi-Shinozaki K (2009) Transcriptional regulatory networks in response to abiotic stresses in *Arabidopsis* and grasses. *Plant Physiology* 149: 88-95.
- Nakashima K, Tran LSP, Van Nguyen D, Fujita M, Maruyama K, Todaka D, Ito Y, Hayashi N, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2007) Functional analysis of a NAC-type transcription factor OsNAC6 involved in abiotic and biotic stress-responsive gene expression in rice. *The Plant Journal* 51: 617-630.
- Nayyar H, Walia DP (2003) Water stress induced proline accumulation in contrasting wheat genotypes as affected by calcium and abscisic acid. *Biologia Plantarum* 46, 2: 275-279.
- Nelson DE, Repetti PP, Adams TR, Creelman RA, Wu J, Warner DC, Anstrom DC, Bensen RJ, Castiglioni PP, Donnarummo MG, Hinchey BS, Kumimoto RW, Maszle DR, Canales RD, Krolikowski KA, Dotson SB, Gutterson N, Ratcliffe OJ, Heard JE (2007) Plant nuclear factor Y (NF-Y) B subunits confer drought

tolerance and lead to improved corn yields on water-limited acres. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 104: 16450-16455.

- Neumann PM (2008) Coping Mechanisms for Crop Plants in Drought-prone Environments. *Annals of Botany* 101: 901–907.
- Noghabi AM, Williams BF (2000) Drought stress and weed competition in sugar beet. *British Sugar Beet Review* 1: 47-49.
- Ober ES, Le Bloa M, Clark CJA Royal A, Jaggard KW, Pidgeon JD (2005) Evaluation of physiological traits as indirect selection criteria for drought tolerance in sugar beet. *Field Crops Research* 91, 231-249.
- Ober ES, Luterbacher MC (2002) Genotypic variation for drought tolerance in *Beta vulgaris*. *Annals of Botany* 89: 917-924.
- Oh SJ, Song SI, Kim YS, Jang HJ, Kim SY, Kim M, Kim YK, Nahm BH, Kim JK (2005) *Arabidopsis* CBF3/DREB1A and ABF3 in transgenic rice increased tolerance to abiotic stress without stunting growth. *Plant Physiology* 138: 341-351.
- O'Neill PM, Shanahan JF, Schepers JS (2006) Use of chlorophyll fluorescence assessments to differentiate corn hybrid response to variable water conditions. *Crop Science* 46: 681-687.
- Panković D, Sakač Z, Jocić S, Škorić D (2004) Molekularni markeri u oplemenjivanju suncokreta. *Zbornik radova, Sveska* 40: 301-311.
- Passioura J. (2007) The drought environment: physical, biological and agricultural perspectives. *Journal of Experimental Botany* 58: 113-117.
- Petrović M, Stikić R (1992) Vodni režim šećerne repe: 225-240. U: Spasić et al. (1992): *Šećerna repa, Jugošecer DD, Beograd*: 751.
- Petrović N (1992) Fotosinteza šećerne repe: 191-212. U: Spasić et al. (1992): *Šećerna repa, Jugošecer DD, Beograd*: 751.
- Putnik-Delic M, Maksimovic I, Djoric E, Nagl N (2010) Analyses of statistical transformations of row data describing free proline concentration in sugar beet exposed to drought. *Matica Srpska, Proceedings for Natural Sciences* 119: 7-16.
- Putnik-Delić M, Maksimović I, Venezia A, Nagl N (2013) Free proline accumulation in young sugar beet plants and in tissue culture explants under water deficiency as tools for assessment of drought tolerance. *Romanian Agricultural Research* 30, (online: [www.incda-fundulea.ro](http://www.incda-fundulea.ro)).

- Qi Y, Denli AM, Hannon GJ (2005) Biochemical specialization within *Arabidopsis* RNA silencing pathways. *Molecular Cell* 19: 421-428.
- Qin F, Sakuma Y, Tran LSP, Maruyama K, Kidokoro S, Fujita Y, Fujita M, Umezawa T, Sawano Y, Miyazono K, Tanokura M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2008) *Arabidopsis* DREB2A-interacting proteins function as RING E3 ligases and negatively regulate plant drought stress-responsive gene expression. *Plant Cell* 20: 1693-707.
- Qin F, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2011) Achievements and challenges in understanding plant abiotic stress responses and tolerance. *Plant and Cell Physiology* 52: 1569-1582.
- R Development Core Team (2012) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <http://www.R-project.org/>.
- Rathinasabapathi B (2000) Metabolic engineering for stress tolerance: Installing osmoprotectant synthesis pathways. *Annals of Botany* 86: 709-716.
- Raymond MJ, Smirnoff N (2002) Proline metabolism and transport in maize seedlings at low water potential. *Annals of Botany* 89: 813-823.
- Reynolds M, Manes Y, Izanloo A, Langridge P (2009) Phenotyping approaches for physiological breeding and gene discovery in wheat. *Annals of Applied Biology* 155: 309-320.
- Richards RA, Rebetzke GJ, Watt M, Condon AG, Spielmeier W, Dolferus R (2010) Breeding for improved water productivity in temperate cereals: phenotyping, quantitative trait loci, markers and the selection environment. *Functional Plant Biology* 37: 85-97.
- Rivero RM, Kojima M, Gepstein A, Sakakibara H, Mittler R, Gepstein S, Blumwald E (2007) Delayed leaf senescence induces extreme drought tolerance in a flowering plant. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 104: 19631-19636.
- Rizhsky L, Liang HJ, Shuman J, Shulaev V, Davletova S, Mittler R (2004) When Defense pathways collide. The response of *Arabidopsis* to a combination of drought and heat stress. *Plant Physiology* 134: 1683-1696.

- Rong-hua L, Pei-guo G, Baum M, Grando S, Ceccarelli S (2006) Evaluation of chlorophyll content and fluorescence parameters as indicators of drought tolerance in barley. *Agricultural Sciences in China* 5: 751-757.
- Roy R, Mazumder PB, Sharma GD (2009) Proline, catalase and root traits as indices of drought resistance in bold grained rice (*Oryza sativa*) genotypes *African Journal of Biotechnology* 8, 23: 6521-6528.
- Szabados L, Saviouré A (2009) Proline: a multifunctional amino acid. *Trends in Plant Science* 15, 2: 89-97.
- Sadeghian SY, Fazli H, Mohammadian R, Taleghani DF, Mesbah M (2000) Genetic variation for drought stress in sugarbeet. *Journal of Sugar Beet Research* 37: 55-77.
- Sakuma Y, Liu Q, Dubouzet JG, Abe H, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2002) DNA-binding specificity of the ERF/AP2 domain of *Arabidopsis* DREBs, transcription factors involved in dehydration- and cold-inducible gene expression. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 290: 998-1009.
- Sakuma Y, Maruyama K, Osakabe K, Qin F, Seki M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2006) Functional analysis of an *Arabidopsis* transcription factor, DREB2A, involved in drought-responsive gene expression. *Plant Cell* 18: 1292-1309.
- Salekdeh GH, Reynolds M, Bennett J, Boyer J (2009) Conceptual framework for drought phenotyping during molecular breeding. *Trends in Plant Science* 14, 488-496.
- Salvucci ME, Crafts-Bradner SJ (2004) Inhibition of photosynthesis by heat stress: the activation state of Rubisco as a limiting factor in photosynthesis. *Physiologia Plantarum* 120: 179-186.
- Shah SH, Tobito S, Shano M (2002) Cation cotolerance phenomenon in cell cultures of *Oryza sativa* adapted to LiCl and NaCl. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 71: 95-101.
- Shaw B, Thomas TH, Cooke DT (2002) Responses of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) to drought and nutrient deficiency stress. *Plant Growth Regulation* 37: 77-83.



- Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2007) Gene networks involved in drought stress response and tolerance. *Journal of Experimental Botany* 58: 221-227.
- Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (1999) Molecular responses to drought stress. In: Yamaguchi-Shinozaki ed. *Molecular responses to cold, drought, heat and salt stress in higher plants*. Austin, TX: R.G.Landes Company: 11-28.
- Shure M, Wessler S, Fedoroff N (1983) Molecular identification and isolation of the Waxy locus in maize. *The Cell* 35: 225-233.
- Силаева АМ (1978) Структура хлоропластов и факторы среды, Наукова Думка, Киев.
- Silva MA, Jifon JL, Silva JAG, Sharma V (2007) Use of physiological parameters as fast tools to screen for drought tolerance in sugar cane. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 19, 3: 193-201.
- Song SQ, Lei YB, Tian XR (2005) Proline metabolism and cross tolerance to salinity and heat stress in germinating wheat seed. *Russian Journal of Plant Physiology* 52: 897-904.
- Spasić P (1989) Planiranje prinosa i kvaliteta šećerne repe pri određenim ekološkim uslovima proizvodnje. *Zbornik radova 16. Poljoprivredni fakultet, Institut za ratarstvo i povrtarstvo Novi Sad*.
- Stanačev S (1979) *Šećerna repa*. Nolit, Beograd.
- Sun Y, Du X, Zhang W, Sun L, Li R (2011) Seed Germination and physiological characteristics of *Amaranthus mangostanus* L. under drought stress. *Advanced Materials Research* 183-185: 1071-1074.
- Taylor CB (1996) Proline and water deficit: Ups, downs, ins and outs. *Plant Cell* 8: 1221-1224.
- Tezara W, Mitchell VJ, Driscoll SD, Lawlor DW (1999) Water stress inhibits plant photosynthesis by decreasing coupling factor and ATP. *Nature* 401: 914-917.
- Thomas T, Clarke N (1995) Are sugar beet problems being watered down. *British Sugar Beet Review* 3: 8-11.
- Tran LSP, Nakashima K, Sakuma Y, Osakabe Y, Qin F, Simpson SD, Maruyama K, Fujita Y, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2007) Co-expression of the stress-inducible zinc finger homeodomain ZFHD1 and NAC

transcription factors enhances expression of the ERD1 gene in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 49: 46-63.

- Tran LSP, Nakashima K, Sakuma Y, Simpson SD, Fujita Y, Maruyama K, Fujita M, Seki M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2004) Isolation and functional analysis of *Arabidopsis* stress-inducible NAC transcription factors that bind to a drought- responsive cis-element in the early responsive to dehydration stress 1 promoter. *Plant Cell* 16: 2481-2498.
- Tuberosa R, Salvi S (2006) Genomics-based approaches to improve drought tolerance of crops. *Trends in Plant Science* 11: 405-412.
- Valliyodan B, Nguyen H (2006) Understanding regulatory networks and engineering for enhanced drought tolerance in plants. *Current Opinion in Plant Biology*. 9: 189-195.
- Visser HR (1951) Anatomisch-physiologische rasverschillen bij suikebieten. *Studiekring voor Plantenveredeling*, 425-433.
- Wellburn AR (1994) The special determination of Chlorophylls a and b, as well as total carotenoides, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *Journal of Plant Physiology* 144: 307-313.
- Wettstein D von (1975) Chlorophyll-letale und der submikroskopische Formwechsel der Plastiden. *Experimental Cell Research* 12: 427-506.
- Whitmore AP, Whalley WR (2009) Physical effects of soil drying on roots and crop growth. *Journal of Experimental Botany* 60: 2845-2857.
- Wickham H (2009) *ggplot2: elegant graphics for data analysis*. Springer New York.
- Wilkinson S, Davies WJ (2002) ABA-based chemical signalling: the coordination of responses to stress in plants. *Plant Cell and Environment* 25: 195-210.
- Wyn Jones RG, Storey R (1981) Betaines. *In Physiology and Biochemistry of Drought Resistance in Plants*. Eds. L G Paleg and Aspinall, Academic Press, Sydney, 171-204.
- Xue GP, McIntyre CL, Chapman S, Bower NI, Way H, Reverter A, Clarke B, Shorter R (2006) Differential gene expression of wheat progeny with contrasting levels of transpiration efficiency. *Plant Molecular Biology* 61: 863-881.

- Yamada M, Morishita H, Urano K, Shiozaki N, Kazuko YS, Shinozaki K Yoshida Y (2005) Effects of proline accumulation in petunias under drought stress. *Journal of Experimental Botany* 56: 1975-1981.
- Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (2005) Organization of cisacting regulatory elements in osmotic- and cold-stress-responsive promoters. *Trends in Plant Science* 10: 88-94.
- Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (2006) Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stress. *Annual Review of Plant Biology* 57: 781-803.
- Yang J, Zhang J (2006) Grain filling of cereals under soil drying. *New Phytologist* 169: 223-236.
- Zhu C, Gore M, Buckler ES, Yu J (2008) Status and prospects of association mapping in plant. *Plant Genome* 1: 5-20.
- Zhu SY, Yu XC, Wang XJ, Zhao R, Li Y, Fan RC, Shang Y, Du SY, Wang XF, Wu FQ, Xu YH, Zhang XY, Zhang DP (2007) Two calcium-dependent protein kinases, CPK4 and CPK11, regulate abscisic acid signal transduction in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 19: 3019-3036.

## BIOGRAFIJA

Marina Putnik-Delić rođena je 19.04.1978. godine u Novom Sadu gde je završila osnovnu školu i gimnaziju „Jovan Jovanović Zmaj“. Poljoprivredni fakultet u Novom Sadu upisala 1997. godine. Za vreme osnovnih studija (2000) dobila je nagradu „Student generacije“ na smeru Zaštita bilja. Diplomirala je u aprilu 2002. godine na temi „Osetljivost nekih genotipova duvana prema virusu bronzavosti paradajza (*Tomato spotted wilt tospovirus*)“ sa ocenom deset, sa prosečnom ocenom u toku studija 9,22. Magistarske studije je završila takođe na Poljoprivrednom fakultetu u Novom Sadu, smer Fitopatologija, sa prosečnom ocenom 9,67. Magistarsku tezu pod nazivom „Povezanost otpornosti prema *Puccinia triticina* u različitim fazama razvoja genotipova pšenice“ odbranila je 27.09.2006. godine.

Od 2002-2008. godine angažovana je na održavanju vežbi iz predmeta Fiziologija biljaka, Agrohemija i Ishrana biljaka (deo Ishrana biljaka) na Poljoprivrednom fakultetu u Novom Sadu. Od 2003-2006 godine bila je stipendista Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije za magistarske studije u okviru projekata „Unapređenje proizvodnje i prerade strnih žita“ (2003-2005), i „Unapređenje genetičkih, proizvodnih i prerađivačkih potencijala pšenice, ječma i alternativnih strnih žita korišćenjem klasične i moderne biotehnologije“ (2005-2006), u Naučnom institutu za ratarstvo i povrtarstvo-Novu Sad.

U januaru 2008. godine zasniva radni odnos na Poljoprivrednom fakultetu u Novom Sadu u zvanju asistenta i angažovana je na održavanju vežbi na osnovnim akademskim i master studijama na predmetima iz uže naučne oblasti Fiziologija i ishrana biljaka.

Od 2008-2011 godine bila je učesnik na projektu MNTR „Poboljšanje germplazme šećerne repe u cilju povećanja prinosa i smanjenja gubitaka nastalih uticajem biotskih i abiotskih faktora“, Instituta za ratarstvo i povrtarstvo-Novu Sad. Bila je učesnik na projektima Gradske uprave za zaštitu životne sredine, Novi Sad (2009, 2010, 2011. i 2012) na temama vezanim za proučavanje koncentracija teških metala u uzorcima povrća proizvedenog u okolini Novog Sada. Od 2011. godine do danas učesnik je na dva projekta Ministarstva prosvete i nauke Republike Srbije „Unapređenje tehnologije gajenja krmnih biljaka na oranicama i travnjacima“ i „Razvoj novih tehnologija za savremenu i održivu proizvodnju povrća“ kao i na jednom projektu

APV „Uticaj različitih tehnologija proizvodnje i čuvanja na parametre kvaliteta povrća“. Takođe, tokom 2011. i 2012. učestvovala je na projektu bilateralne saradnje sa Republikom Hrvatskom pod nazivom „Istraživanje mehanizama otpornosti biljaka na abiotski stres“.

Bila je mentor rada na 33. smotri naučnih radova studenata poljoprivrede i veterinarske medicine sa međunarodnim učešćem, održane 2009. godine na Poljoprivrednom fakultetu, Univerziteta u Novom Sadu.

Do sada je objavila 36 naučnih radova kao autor ili koautor u domaćim i stranim časopisima, od toga 5 radova u časopisima sa impakt faktorom, 19 saopštenja na međunarodnim i 10 na domaćim skupovima.

Član je Društva za fiziologiju biljaka Srbije, Odeljenja za prirodne nauke Matice srpske, kao i Federacije evropskih društava za biljnu biologiju (FESPB).

Govori, čita i piše engleski jezik i služi se francuskim jezikom.