

**UNIVERZITET U BEOGRADU  
BIOLOŠKI FAKULTET**

**Marija J. Đurić**

**Uticaj dehidracije i rehidracije na fiziološki  
odgovor i ekspresiju gena za akvaporine i  
metabolizam apscisinske kiseline kod  
*Impatiens walleriana***

**- doktorska disertacija -**

**Beograd, 2022.**

**UNIVERSITY OF BELGRADE  
FACULTY OF BIOLOGY**

**Marija J. Đurić**

**Effect of dehydration and rehydration on  
physiological response and the expression of  
aquaporin genes and abscisic acid metabolism in  
*Impatiens walleriana***

**- doctoral dissertation -**

**Belgrade, 2022.**

**Mentori:**

**dr Snežana Milošević, naučni savetnik**

Univerzitet u Beogradu

Institut za biološka istraživanja "Siniša Stanković"

Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju

**dr Milorad Vujičić, docent**

Univerzitet u Beogradu

Biološki fakultet

**Članovi komisije:**

**dr Milana Trifunović-Momčilov, viši naučni saradnik**

Univerzitet u Beogradu

Institut za biološka istraživanja "Siniša Stanković"

Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju

**dr Ljiljana Prokić, vanredni profesor**

Univerzitet u Beogradu

Poljoprivredni fakultet

**dr Aneta Sabovljević, vanredni profesor**

Univerzitet u Beogradu

Biološki fakultet

**Datum odbrane:**

*Eksperimentalni deo doktorske disertacije urađen je u laboratorijama Odeljenja za fiziologiju biljaka Instituta za biološka istraživanja "Siniša Stanković" Univerziteta u Beogradu, Instituta od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju i laboratorijama Katedre za agrohemiju i fiziologiju biljaka Poljoprivrednog fakulteta, Univerziteta u Beogradu.*

*Neizmernu zahvalnost dugujem mentoru dr Snežani Milošević za stručnu pomoć, savete i smernice tokom svih faza izrade ove doktorske disertacije. Posebno hvala za ukazano poverenje, razumevanje, toleranciju, neiscrpni optimizam i pozitivnu energiju koje su mi bile od neprocenjivog značaja tokom svih ovih godina zajedničke saradnje.*

*Veliku zahvalnost upućujem mentoru dr Miloradu Vujičiću za pomoć u eksperimentalnom radu, tumačenje rezultata i uobličavanje teksta doktorske disertacije.*

*dr Angelini Subotić hvala što mi je pružila priliku da budem deo njenog tima i za celokupno angažovanje tokom izrade ove doktorske disertacije.*

*Najiskrenije se zahvaljujem dr Ljiljani Prokić za trud, posvećenost i strpljenje tokom izvođenja eksperimenata na Poljoprivrednom fakultetu, kao i za tumačenje rezultata i korisne savete.*

*dr Milani Trifunović-Momčilov hvala za podršku, optimizam, pomoć tokom eksperimentalnog rada i smernice tokom čitanja teze.*

*dr Aneti Sabovljević se zahvaljujem za smernice i korisne savete prilikom uobličavanja teksta doktorske disertacije.*

*dr Aleksandru Cingelu veliko hvala za pomoć u realizaciji molekularno-bioloških analiza i uvek dobro raspoloženje za saradnju.*

*dr Milanu Dragičeviću hvala za pomoć tokom dizajniranja prajmera za odabrane gene korišćene u molekularno-biološkim analizama.*

*Veliko hvala dr Ani Simonović za korisne savete tokom izvođenja analiza kvantitativne ekspresije gena.*

*Slaviši Đorđeviću veliko hvala za more pozitivne energije i pomoć tokom izvođenja eksperimenata na Poljoprivrednom fakultetu.*

*Hvala svim kolegama i kolegamicama Odeljenja za fiziologiju biljaka za kolegijalnost i pozitivnu radnu atmosferu.*

*Mojim dragim prijateljicama i kolegamicama Jeleni Stanojković i Sanji Šajkunić hvala za iskreno prijateljstvo, toplinu i veru u mene.*

*Mojim najdražim, Slađi i Gagi, najveće hvala za sve ove godine druženja i podrške.*

*Zahvaljujem se svim mojim prijateljima koji su bili uz mene i pružali mi podršku i pomoć kad god je bilo potrebno.*

*Hvala mom Nemanji. Učinio si da ovaj put do završetka doktorata bude još lepši.*

*Mom malom Bogdanu hvala što je svojim rođenjem ulepšao naše živote.*

*Hvala mom bratu i roditeljima. Njima posvećujem ovu tezu.*



*Čvrsti temelji našeg pogleda na svet, pa stoga i njegova dubina ili plitkost formiraju se u detinjstvu. Taj pogled se zatim razrađuje i usavršava, ali se ne menja suštinski.*

*Artur Šopenhauer*

# Uticaj dehidracije i rehidracije na fiziološki odgovor i ekspresiju gena za akvaporine i metabolizam apscisinske kiseline kod *Impatiens walleriana*

## Sažetak

Suša se ubraja u abiotičke stresogene faktore i kao takva predstavlja jedan od najzastupljenijih i najvećih problema današnjice. Suša ispoljava negativan uticaj na rastenje i razviće brojnih biljnih vrsta, pa tako direktno ili indirektno utiče na njihovu brojnost i rasprostranjenost, ostavljajući negativne posledice na biodiverzitet celokupne flore i faune. Istraživanja u okviru ove doktorske disertacije vršena su sa ciljem ispitivanja uticaja dehidracije uzrokovane sušom i rehidracije na rastenje, fiziološke, biohemijske i molekularne parametre kod vrste *Impatiens walleriana*, kao i uticaja elicitacije metil jasmonatom (MeJA) u cilju ublažavanja ili otklanjanja negativnih efekata dehidracije. *I. walleriana* (Balsaminaceae) je jedna od tri vrste roda *Impatiens* (pored *I. hawkeri* i *I. balsamina*) koje se komercijalno proizvode u Srbiji dugi niz godina. S obzirom na ornamentalne karakteristike biljaka i dug period cvetanja, *I. walleriana* je jedna od najpopularnijih hortikulturnih vrsta širom sveta. Biljke imaju visoke zahteve za prisustvom vode u podlozi, čiji nedostatak uzrokuje brz pad turgora u ćelijama i dehidraciju tkiva, što je glavni problem u komercijalnoj proizvodnji i tržišnom plasmanu biljaka.

Prvi deo eksperimenta obuhvatao je sledeće tretmane: kontrolne grupe biljaka gajene pri optimalnoj vlažnosti supstrata od 35-37% tokom eksperimentalnog perioda; grupe biljaka izložene stresu isušivanjem supstrata do 15 i 5%; oporavljene grupe biljaka tj. rehidratirane biljke, zalivane četiri dana do postizanja optimalne vlažnosti supstrata. Dehidracija je redukovala masu svežih izdanaka, ukupnu površinu listova kao i masu suvih izdanaka. Zabeležena je povećana ekspresija ABA (apscisinska kiselina) biosintetskih gena *9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase 4 (IwNCED4)* i *abscisic aldehyde oxidase 2 (IwAAO2)* i kataboličkog gena *ABA 8'-hydroxylase 3 (IwABA8ox3)*, što je praćeno povećanom koncentracijom ABA u listovima *I. walleriana* pri dehidraciji. Redukovanje vodnog potencijala izdanaka pri dehidraciji nije bilo praćeno povećanom akumulacijom aminokiseline prolina. Detektovano je povećanje koncentracije ukupnih hlorofila, karotenoida, ukupnih polifenola, flavonola, kao i malondialdehida (MDA), vodonik peroksida ( $H_2O_2$ ) i DPPH aktivnosti u biljkama tokom dehidracije. Povećana aktivnost antioksidativnih enzima superoksid-dismutaze (SOD), peroksidaze (POX) i katalaze (CAT) pri dehidraciji je takođe zabeležena. Rehidracija biljaka je bila značajna u ublažavanju negativnih uticaja dehidracije na parametre rastenja, vodni potencijal izdanaka, koncentraciju endogenog prolina i ekspresiju gena.

Takođe, analizirane su molekularne strukture akvaporina (AQP) i ekspresija gena za AQP u listovima *I. walleriana* pri dehidraciji i rehidraciji. Akvaporini predstavljaju veliku grupu transmembranskih proteina odgovornih za transport vode, što je ključno za opstanak biljaka u stresnim uslovima. Uprkos značajnoj ulozi AQP, do danas nisu poznate informacije o ovoj proteinskoj grupi kod *I. walleriana*. U ovoj doktorskoj disertaciji pažnja je bila usmerena na molekularnu karakterizaciju AQP kod *I. walleriana* kao i na ekspresiju gena odgovornih za sintezu ovih proteina prilikom dehidracije i rehidracije. Identifikovana su četiri AQP u transkriptomu *I. walleriana*: *IwPIP1;4*, *IwPIP2;2*, *IwPIP2;7* i *IwTIP4;1*. Svi AQP su imali NPA motive (Asparagin-Prolin-Alanin), transmembranske regione (TMh), odgovarajuće karakteristike kanala, stereohemijske osobine i tetramernu strukturu holoproteina. Dehidracija i rehidracija uticale su na ekspresiju gena za akvaporine u listovima *I. walleriana*, koja je bila povišena ili snižena u zavisnosti od intenziteta stresa. Ekspresija *IwPIP2;7* gena bila je najviše promenjena od svih analiziranih AQP *I. walleriana*. Pri vlažnosti supstrata od 15 i 5% i rehidraciji nakon isušivanja supstrata do 15 i 5%, ekspresija *IwPIP2;7* gena se značajno smanjila, odnosno povećala. Geni za akvaporine *IwPIP1;4* i *IwTIP4;1* imali su nižu ekspresiju u poređenju sa *IwPIP2;7* genom, sa umerenim promenama ekspresije kao odgovor prema dehidraciji i rehidraciji, dok je ekspresija

*IwPIP2;2* gena bila značajno povišena samo u oporavljenim biljkama. Uvidom u molekularnu strukturu AQP *I. walleriana* prošireno je znanje o biljnim akvaporinima dok je analiza ekspresije gena pri dehidraciji i rehidraciji doprinela proširenju saznanja o mehanizmima tolerancije prema dehidraciji i ponovnoj aklimatizaciji biljaka.

U drugom delu eksperimenta, praćen je uticaj elicitacije MeJA na ublažavanje ili otklanjanje posledica stresa uzrokovanog dehidracijom na rasteње i razviće *I. walleriana*. Uticaj elicitacije MeJA u koncentracijama od 5 i 50  $\mu\text{M}$  ispoljen je kako kod kontrolnih, tako i kod biljaka izlaganih dehidraciji (pri vlažnosti supstrata od 15 i 5%) i rehidraciji. Zabeležen je pozitivan uticaj MeJA na rasteње (masu svežih i suvih izdanaka kao i ukupnu površinu listova) kod kontrolnih i biljaka izlaganih različitim intenzitetima dehidracije. Metil jasmonat je uticao na povećanje ekspresije gena uključenih u *de novo* sintezu ABA tokom dehidracije, kao i na promene u ekspresiji gena odgovornog za katabolizam ABA. Takođe, uočen je redukujući uticaj elicitacije MeJA na provodljivost stoma, kod kontrolnih i biljaka izlaganih dehidraciji. Elicitacija MeJA je uticala na povećanje odnosa hlorofila a/b pri nižem i višem intenzitetu dehidracije, kao i na povećanje ukupne koncentracije hlorofila i karotenoida pri intenzivnoj dehidraciji. Kod grupa biljaka tretiranih MeJA, zabeležen je pad u koncentraciji MDA i  $\text{H}_2\text{O}_2$ , kao i manji sadržaj ukupnih polifenola i flavonola i promenjene aktivnosti antioksidativnih enzima SOD, POX i CAT pri dehidraciji. Elicitacija MeJA je u različitoj meri modifikovala ekspresiju gena za akvaporine *IwPIP1;4*, *IwPIP2;2*, *IwPIP2;7* i *IwTIP4;1* pri dehidraciji i rehidraciji, ukazujući na značaj kanala za vodu koji učestvuju u prilagođavanju procesa za transport vode shodno fiziološkom stanju organizma.

**Ključne reči:** *Impatiens walleriana*, dehidracija, rehidracija, apscisinska kiselina, ekspresija gena, akvaporini, metil jasmonat

**Naučna oblast:** Biologija

**Uža naučna oblast:** Fiziologija biljaka

**UDK broj:** 581.1:577(043.3)

# Effect of dehydration and rehydration on physiological response and the expression of aquaporin genes and abscisic acid metabolism in *Impatiens walleriana*

## Abstract

Drought is one of the abiotic stress factors and one of the most common and biggest problems today. Drought has a negative impact on the growth and development of numerous plant species, and thus directly or indirectly affects their abundance and distribution, leaving negative consequences on the biodiversity of the entire flora and fauna. This study was carried out to examine the dehydration caused by drought, and rehydration effect on development, physiological, biochemical and molecular parameters in *Impatiens walleriana*, as well as the effects of the methyl jasmonate (MeJA) elicitation in order to overcome the stress caused by dehydration. *I. walleriana* (Balsaminaceae) is one of the three *Impatiens* species (beside *I. hawkeri* and *I. balsamina*) which are commercially produced in Serbia for many years. Due to its decorative traits and long flowering period, *I. walleriana* belongs to the most popular horticultural species all over the world. Plants have high requirements for the presence of water in the substrate, which deficiency leads to a rapid drop in cell turgor and tissue dehydration which is the main problem in commercial production and market placement of these plants.

In the first part of the experiment design there were three treatments: control plant groups grown under optimal watering with 35–37% of soil moisture content, stressed plant groups non-irrigated to reach 15 and 5% of soil moisture content and recovered plant groups rehydrated for four days to reach optimal soil moisture content. Dehydration reduced fresh weight, total leaf area, as well as dry weight of *I. walleriana* shoots. Dehydration up-regulated expression of abscisic acid (ABA) biosynthesis genes *9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase 4 (IwNCED4)* and *abscisic aldehyde oxidase 2 (IwAAO2)* and catabolic gene *ABA 8'-hydroxylase 3 (IwABA8ox3)* which was followed by increased ABA content in the leaves. Decrement in water potential of shoots during the dehydration was not accompanied with increased amino acid proline content. Increment in total chlorophyll, carotenoid, polyphenols and flavonols content, as well as malondialdehyde (MDA), hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) and DPPH (1,1'-diphenyl-2-picrylhydrazyl) activity, was observed in plants during dehydration. Increased antioxidant enzyme activities (superoxide-dismutase – SOD, peroxidase – POX and catalase – CAT) throughout dehydration were also determined. Rehydration was significant for overcoming dehydration effect on growth parameters, shoot water potential, endogenous proline content and genes expression.

Also, analysis of molecular structure and gene expression of aquaporins (AQP) in *I. walleriana* leaves were estimated. Aquaporins comprise a large group of transmembrane proteins responsible for water transport, which is crucial for plant survival under stress conditions. Despite the vital role of AQPs, nothing is known about this protein family in *I. walleriana*. In the present doctoral dissertation, attention is given to the molecular characterization of AQPs in *I. walleriana* and their expression during drought stress and recovery. We identified four *I. walleriana* AQPs: *IwPIP1;4*, *IwPIP2;2*, *IwPIP2;7* and *IwTIP4;1*. All of them had conserved NPA motifs (Asparagine-Proline-Alanine), transmembrane helices (TMh), pore characteristics, stereochemical properties and tetrameric structure of holoprotein. Dehydration and rehydration treatment affected the AQPs expression in *I. walleriana* leaves, which was up- or downregulated depending on stress intensity. Expression of *IwPIP2;7* was the most affected of all analyzed *I. walleriana* AQPs. At 15 and 5% soil moisture and recovery from 15 and 5% soil moisture, *IwPIP2;7* expression significantly decreased and increased, respectively. Aquaporins *IwPIP1;4* and *IwTIP4;1* had lower expression in comparison to *IwPIP2;7*, with moderate expression changes in response to dehydration and rehydration, while *IwPIP2;2* expression was significantly increased only in recovered plants. Insight into the molecular structure of *I. walleriana* AQPs expanded knowledge about plant AQPs, while its

expression during dehydration and rehydration contributed to *I. walleriana* dehydration tolerance mechanisms and re-acclimation.

In the second part of the experiment, the effect of MeJA elicitation on overcome dehydration effects on the growth and development of *I. walleriana* was evaluated. The effect of MeJA elicitation in concentrations of 5 and 50  $\mu\text{M}$  was manifested in both control and plants exposed to dehydration (at 15 and 5% soil moisture content) and rehydration. A positive effect of MeJA was observed on the growth parameters (fresh weight of shoots, total leaf area and dry weight of shoots) in control and plants exposed to different dehydration intensities. Methyl jasmonate induced increment in the expression of genes involved in ABA *de novo* synthesis during dehydration, as well as the change in the expression of gene involved in ABA catabolism. Also, reducing effect of MeJA elicitation on the stomatal conductivity was noted in control and dehydrated plants. Elicitation increased chlorophyll a/b ratio during lower and higher dehydration intensity, as well as the total chlorophyll and carotenoid content during intensive dehydration. In plant groups treated with MeJA, a decrease in the concentration of MDA and  $\text{H}_2\text{O}_2$ , as well as the lower content of total polyphenols and flavonols and changed activity of antioxidant enzymes SOD, POX and CAT were observed during dehydration. Elicitation with MeJA differently affected the expression of the AQPs genes *IwPIP;4*, *IwPIP2;2*, *IwPIP2;7* and *IwTIP4;1* during dehydration and rehydration, indicating the importance of the water channels involved in adapting water transport processes according to physiological state of the organism.

**Key words:** *Impatiens walleriana*, dehydration, rehydration, abscisic acid, gene expression, aquaporins, methyl jasmonate

**Scientific field:** Biology

**Scientific subfield:** Plant physiology

**UDC number:** 581.1:577(043.3)

## SADRŽAJ

### SKRAĆENICE

|  |    |
|--|----|
| <b>1. UVOD</b> .....   | 1  |
| 1.1. Biologija ispitivane vrste .....  | 1  |
| 1.2. Uticaj suše na rastenje i razviće biljaka.....  | 4  |
| 1.2.1. Morfološke promene kod biljaka tokom suše.....  | 5  |
| 1.2.2. Fiziološke i biohemijske promene kod biljaka tokom suše .....                               | 6  |
| 1.2.2.1. Oksidativni stres.....  | 7  |
| 1.2.3. Promene na molekularnom nivou kod biljaka tokom suše .....                                  | 9  |
| 1.3. Mehanizmi otpornosti biljaka prema suši.....  | 11 |
| 1.3.1. “Efemeroidna strategija”.....   | 11 |
| 1.3.2. Mehanizmi izbegavanja suše .....  | 11 |
| 1.3.2.1. Metabolizam apscisinske kiseline pri dehidraciji tkiva uzrokovanog sušom .....            | 12 |
| 1.3.2.2. Uloga apscisinske kiseline u regulaciji transpiracije tokom suše .....                    | 15 |
| 1.3.3. Mehanizmi tolerancije biljaka prema suši .....  | 17 |
| 1.3.3.1. Neenzimske komponente antioksidativne zaštite od stresa izazvanog sušom .....             | 17 |
| 1.3.3.2. Enzimske komponente antioksidativne zaštite od stresa izazvanog sušom .....               | 18 |
| 1.3.3.3. Akvaporini – transmembranski kanali za vodu.....  | 21 |
| 1.3.3.4. Uloga akvaporina u toleranciji biljaka prema suši .....                                   | 24 |
| 1.4. Elicitacija biljaka u cilju povećanja otpornosti prema stresu – klasifikacija elicitora ..... | 26 |
| 1.4.1. Biosinteza jasmonata u višim biljkama .....   | 26 |
| 1.4.2. Interakcija jasmonata i apscisinske kiseline tokom suše .....                               | 28 |
| 1.4.2.1. Uticaj metil jasmonata kao elicitora na fiziološki odgovor biljaka tokom suše .....       | 30 |
| <b>2. CILJ ISTRAŽIVANJA</b> .....  | 31 |
| <b>3. MATERIJAL I METODE</b> .....   | 32 |
| 3.1. Dizajn eksperimenta .....   | 32 |
| 3.2. Biljni materijal i uslovi gajenja <i>I. walleriana</i> .....                                  | 32 |
| 3.2.1. Indukcija suše .....  | 33 |
| 3.2.2. Primena elicitora metil jasmonata pri dehidraciji i rehidraciji <i>I. walleriana</i> .....  | 34 |

|  |    |
|--|----|
| 3.2.3. Merenja vršena tokom eksperimentalnog rada .....  | 36 |
| 3.3. Analize fizioloških parametara .....  | 36 |
| 3.3.1. Određivanje endogenog sadržaja apscisinske kiseline .....                                     | 36 |
| 3.3.1.1. Priprema uzoraka i standardnih rastvora apscisinske kiseline .....                          | 36 |
| 3.3.1.2. ELISA test za određivanje koncentracije apscisinske kiseline u biljnom tkivu.....           | 37 |
| 3.3.1.3. Test ukrštene reakcije.....   | 38 |
| 3.3.2. Spektrofotometrijska analiza fotosintetičkih pigmenata.....                                   | 38 |
| 3.3.3. Određivanje stepena lipidne peroksidacije .....   | 38 |
| 3.3.4. Određivanje koncentracije vodonik peroksida.....  | 39 |
| 3.3.5. Spektrofotometrijska kvantifikacija prolina .....   | 39 |
| 3.3.6. Spektrofotometrijska kvantifikacija ukupnih polifenola prema Folin–Ciocalteu metodi           | 40 |
| 3.3.7. Spektrofotometrijska kvantifikacija antioksidativnog kapaciteta biljaka prema DPPH testu..... | 40 |
| 3.4. Biohemijske analize aktivnosti antioksidativnih enzima .....                                    | 41 |
| 3.4.1. Izolacija ukupnih solubilnih proteina .....   | 41 |
| 3.4.2. Određivanje koncentracije izolovanih proteina Bradfordovom metodom.....                       | 41 |
| 3.4.3. Spektrofotometrijska kvantifikacija aktivnosti solubilnih superoksid-dismutaza .....          | 41 |
| 3.4.3.1. Razdvajanje SOD izoformi nativnom elektroforezom ( <i>Native Page</i> ) .....               | 42 |
| 3.4.4. Spektrofotometrijska kvantifikacija aktivnosti solubilnih peroksidaza.....                    | 43 |
| 3.4.4.1. Razdvajanje POX izoformi nativnom elektroforezom.....                                       | 43 |
| 3.4.5. Spektrofotometrijska kvantifikacija solubilnih katalaza.....                                  | 43 |
| 3.5. Molekularno biološke metode .....   | 44 |
| 3.5.1. Izolacija RNK molekula iz biljnog tkiva .....   | 44 |
| 3.5.2. Provera kvaliteta i kvantiteta izolovane RNK .....  | 45 |
| 3.5.3. Reverzna transkripcija RNK molekula u komplementarnu DNK .....                                | 45 |
| 3.5.4. Reakcija lančanog umnožavanja DNK – PCR .....   | 46 |
| 3.5.5. Kvantitativni PCR (qPCR) za određivanje nivoa ekspresije odabranih gena.....                  | 47 |
| 3.5.6. Priprema standarda za analizu efikasnosti qPCR reakcija.....                                  | 49 |
| 3.6. Bioinformatičke analize akvaporinskih struktura i karakteristika.....                           | 50 |
| 3.7. Statistička obrada podataka .....   | 51 |

|  |     |
|--|-----|
| <b>4. REZULTATI</b> .....  | 52  |
| 4.1. Promene u sadržaju vlažnosti supstrata nakon indukovanja suše .....   | 52  |
| 4.2. Uticaj dehidracije i rehidracije na rastenje i razviće <i>I. walleriana</i> .....                                   | 52  |
| 4.2.1. Uticaj dehidracije i rehidracije na morfološke parametre .....  | 52  |
| 4.2.2. Uticaj dehidracije i rehidracije na koncentraciju ABA .....   | 54  |
| 4.2.2.1. Uticaj dehidracije i rehidracije na ekspresiju ABA metaboličkih gena .....                                      | 55  |
| 4.2.3. Uticaj dehidracije i rehidracije na vodni potencijal izdanaka i koncentraciju prolina .....                       | 59  |
| 4.2.4. Uticaj dehidracije i rehidracije na koncentraciju fotosintetičkih pigmenata.....                                  | 60  |
| 4.2.5. Uticaj dehidracije i rehidracije na koncentraciju ukupnih polifenola, flavonola i antioksidativni kapacitet ..... | 62  |
| 4.2.6. Uticaj dehidracije i rehidracije na koncentraciju vodonik peroksida i malondialdehida .....                       | 63  |
| 4.2.7. Uticaj dehidracije i rehidracije na aktivnost antioksidativnih enzima .....                                       | 63  |
| 4.3. Karakteristike AQP proteina iz transkriptoma <i>I. walleriana</i> .....   | 66  |
| 4.3.1. Strukturni modeli AQP proteina .....  | 68  |
| 4.3.2. Stereohemijske osobine AQP proteina .....   | 72  |
| 4.3.3. Ekspresija gena za AQP.....   | 79  |
| 4.4. Uticaj folijarne primene MeJA na rastenje i razviće <i>I. walleriana</i> .....                                      | 80  |
| 4.4.1. Uticaj folijarne primene MeJA na morfološke parametre <i>I. walleriana</i> .....                                  | 80  |
| 4.4.2. Uticaj folijarne primene MeJA na provodljivost stoma i ekspresiju ABA metaboličkih gena.....                      | 84  |
| 4.4.3. Uticaj folijarne primene MeJA na vodni potencijal izdanaka i koncentraciju prolina .....                          | 89  |
| 4.4.4. Uticaj folijarne primene MeJA na koncentraciju fotosintetičkih pigmenata.....                                     | 93  |
| 4.4.5. Uticaj folijarne primene MeJA na koncentraciju ukupnih polifenola, flavonola i antioksidativni kapacitet .....    | 96  |
| 4.4.6. Uticaj folijarne primene MeJA na koncentraciju vodonik peroksida i malondialdehida .....                          | 100 |
| 4.4.7. Uticaj folijarne primene MeJA na aktivnost antioksidativnih enzima.....   | 103 |
| 4.4.8. Uticaj folijarne primene MeJA na ekspresiju gena za akvaporine .....  | 107 |
| <b>5. DISKUSIJA</b> .....  | 112 |
| 5.1. Uticaj dehidracije i rehidracije na morfološke karakteristike <i>I. walleriana</i> .....                            | 112 |



|   |            |
|---|------------|
| 5.2. Promene u endogenoj koncentraciji ABA i ekspresiji ABA metaboličkih gena pri dehidraciji i rehidraciji.....  | 113        |
| 5.3. Vodni potencijal izdanaka <i>I. walleriana</i> i koncentracija prolina pri dehidraciji i rehidraciji .....   | 114        |
| 5.4. Koncentracije fotosintetičkih pigmenata u listovima <i>I. walleriana</i> pri dehidraciji i rehidraciji.....  | 115        |
| 5.5. Koncentracija ukupnih polifenola, flavonola i antioksidativni kapacitet u listovima <i>I. walleriana</i> pri dehidraciji i rehidraciji .....                         | 115        |
| 5.6. Uticaj dehidracije i rehidracije na koncentraciju vodonik peroksida i stepen lipidne peroksidacije u listovima <i>I. walleriana</i> .....                            | 116        |
| 5.7. Uticaj dehidracije i rehidracije na aktivnost antioksidativnih enzima u listovima <i>I. walleriana</i> .....   | 117        |
| 5.8. Karakteristike AQP proteina identifikovanih u transkriptomu <i>I. walleriana</i> .....   | 118        |
| 5.8.1. Ekspresija gena za AQP pri dehidraciji i rehidraciji u listovima <i>I. walleriana</i> .....  | 119        |
| 5.9. Uticaj folijarne primene MeJA na rastenje i razviće <i>I. walleriana</i> pri dehidraciji i rehidraciji.....  | 121        |
| 5.9.1. Uticaj folijarne primene MeJA na morfološke parametre <i>I. walleriana</i> pri dehidraciji i rehidraciji .....   | 121        |
| 5.9.2. Uticaj folijarne primene MeJA na provodljivost stoma i ekspresiju ABA metaboličkih gena u listovima <i>I. walleriana</i> pri dehidraciji i rehidraciji .....       | 122        |
| 5.9.3. Uticaj folijarne primene MeJA na vodni potencijal izdanaka i koncentraciju prolina u listovima <i>I. walleriana</i> pri dehidraciji i rehidraciji .....            | 124        |
| 5.9.4. Uticaj folijarne primene MeJA na koncentraciju fotosintetičkih pigmenata u listovima <i>I. walleriana</i> pri dehidraciji i rehidraciji .....                      | 124        |
| 5.9.5. Uticaj folijarne primene MeJA na koncentraciju ukupnih polifenola, flavonola i DPPH aktivnost u listovima <i>I. walleriana</i> pri dehidraciji i rehidraciji ..... | 125        |
| 5.9.6. Uticaj folijarne primene MeJA na koncentraciju vodonik peroksida i malondialdehida u listovima <i>I. walleriana</i> pri dehidraciji i rehidraciji .....            | 126        |
| 5.9.7. Uticaj folijarne primene MeJA na aktivnost antioksidativnih enzima u listovima <i>I. walleriana</i> pri dehidraciji i rehidraciji .....                            | 126        |
| 5.9.8. Uticaj folijarne primene MeJA na ekspresiju gena za AQP u listovima <i>I. walleriana</i> pri dehidraciji i rehidraciji .....                                       | 128        |
| <b>6. ZAKLJUČCI .....</b>   | <b>130</b> |
| <b>7. LITERATURA .....</b>  | <b>133</b> |

|                                |            |
|--------------------------------|------------|
| <b>BIOGRAFIJA AUTORA .....</b> | <b>163</b> |
| <b>PRILOZI.....</b>            | <b>164</b> |

## SKRAĆENICE

**AAO3** – ABA aldehidna oksidaza

**ABA** – abscisinska kiselina

**ABA-GE** – ABA glukozni estri

**ABRE** – ABA vezujući elementi (eng. *Abscisic acid Responsive Elements*)

**ANOVA** – analiza varijanse

**AOC** – alen oksid ciklaza

**AOS** – alen oksid sintaza

**APX** – askorbat peroksidaza

**AtBG1/BG2** –  $\beta$ -glukozidaze

**AQP** – akvaporini (eng. *Aquaporins*)

**BSA** – protein albumin iz goveđeg seruma (eng. *Bovine Serum Albumin*)

**bZIP** – transkripcioni faktori (eng. *Basic Leucine Zipper Domain*)

**CAM** – kalmodulin

**CAT** – katalaza

**CPK** – kalcijum zavisne kinaze

**CTAB** – cetiltrimetilamonijum

**CYPT707As** – citohrom P450 monooksigenaza

**DAG** – diacilglicerol

**DEPC** – dietil-pirokarbonat

**DHA** – dehidroaskorbat

**DHAR** – dehidroaskorbat reduktaza

**DMAPP** – 3,3-dimetilalil pirofosfat

**dnOPDA** – dinor-12-okso-fitodienoična kiselina

**DPA** – dihidrofazeinska kiselina

**DPAG** – DPA glukozid

**DPPH** – 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil

**DTT** – ditioneitol

**EDTA** – etilendiamintetrasirćetna kiselina

**ELISA** – imunohemijski test (eng. *Enzyme-linked Immunosorbent Assay*)

**ER** – endoplazmatični retikulum

**FBP** – 3 fruktozo-1,6-bisfosfataza

**FC** – Folin–Ciocalteu

**FW** – masa svežeg uzorka (eng. *Fresh Weight*)

**GA** – galna kiselina

**GHR1** – plazma membranska kinaza

**GMO** – genetički modificirani organizmi (eng. *Genetically Modified Organism*)

**GR** – glutation reduktaza

**GRX** – glutaredoksin

**GSH** – glutation

**GSSG** – glutation disulfid

**GT** – glukozil transferaza

**HSP** – proteini toplotnog šoka (eng. *Heat Shock Proteins*)

**IP3** – inozitol 3 fosfat

**IPP** – izopentenil-pirofosfat

***IwABA80X3*** – gen ABA hidroksilaza za katabolizam ABA *I. walleriana*

***IwAAO2*** – gen ABA aldehidna oksidaza za biosintezu ABA *I. walleriana*

***IwNCED4*** – gen 9-cis-epoksikarotenoid dioksigenaza 4 za biosintezu ABA *I. walleriana*

**JA** – jasmonat

**JA-Ile** – jasmonoil-L-izoleucin

**JAR1** – jasmonat sintetaza 1

**JAZs** – represor JAZ (eng. *Jasmonate ZIM domain proteins*)

**JMT** – jasmonat metiltransferaza

**LCR** – regioni niske kompleksnosti (eng. *Low Complexity Region*)

**LEA** – proteini kasne embriogeneze (eng. *Late Embryogenesis Abundant*)

**LOX** – lipoksigenaza

**MAPK** – mitogen aktivirajuće protein kinaze

**MDA** – malondialdehid

**MDHA** – monodehidroaskorbat

**MDHAR** – monodehidroaskorbat reduktaza

**MeJA** – metil jasmonat

**MEP** – metileritritol fosfatni put u biosintezi terpenoida

**MIP** – velika superfamilija transmembranskih proteina (eng. *Major Intrinsic Proteins*)

**MVA** – mevalonski put u biosintezi terpenoida

**MYB** – transkripcijski faktor u signalnom putu ABA i JA (eng. *Myeloblastosis Related Proteins*)

**MYC** – transkripcijski faktor u signalnom putu ABA i JA (eng. *Myelocytomatosis Related Proteins*)

**NAC** – transkripcijski faktori u signalnom putu ABA čiji naziv potiče od početnih naziva za tri transkripcijska faktora: NAM (eng. *No apical meristem*), ATAF1–2 (eng. *Arabidopsis thaliana activating factor*), i CUC2 (eng. *Cup-shaped cotyledon*)

**NADPH oksidaza** – nikotinamid adenin dinukleotid fosfat oksidaza

**NAPD-ME** – malatna dehidrogenaza

**Native PAGE** – nenedenaturišuća elektroforeza (eng. *Native Polyacrylamide Gel Electrophoresis*)

**NBT** – nitro-blu-tetrazolium

**NCED** – 9-*cis*-epoksikarotenoid dioksigenaza

**NSY** – neoksantin sintaza

**NTR** – flavoprotein tioredoksin reduktaza

**NINJA** – korepresor NINJA (eng. *Novel Interactor of JAZ*)

**NIP** – akvaporini slični nodulinu (eng. *Noduline like Intrinsic Proteins*)

**NO** – azot monoksid

**OPC4** – 4-(3-okso-2-(penta-2-enil)ciklopentil) butanoična kiselina

**OPC6** – 6-(3-okso-2-(penta-2-enil)ciklopentil) heksanoična kiselina

**OPC8** – 8-(3-okso-2-(penta-2-enil)ciklopentil) oktanoična kiselina

**OPDA** – 12-okso-fitodienoicna kiselina

**OPR** – OPDA reduktaza

**OST1/SnRK2.6** – fosfataza (eng. *Open Stomata1 SnRK2.6*)

**PA** – fazeinska kiselina

**PAGE** – poliakrilaamidna gel elektroforeza (eng. *PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*)

**PAR** – PA reduktaza

**PCEF** – pseudociklični transport elektrona (eng. *Pseudocyclic Electron Flow*)

**PCR** – lančana reakcija polimeraze (eng. *Polymerase Chain Reaction*)

**PEG** – polietilen glikol

**PEPC** – fosfoenol piruvat karboksilaza

**PIP** – akvaporini prisutni na plazmamembrani (eng. *Plasma membrane Intrinsic Proteins*)

**PIP2** – fosfoinozitol bifosfat

**PRD** – eng. *Partial Root Drying*

**PLC** – fosfolipaza C

**POX** – peroksidaza

**PP2C** – protein fosfataza 2C

**PPDK** – ortofosfat dikinaza

**PRX** – peroksiredoksin peroksidaze

**P5CS** –  $\Delta^1$ -pirolin-5-karboksilat sintaza

**P5CR** –  $\Delta^1$ -pirolin-5-karboksilat reduktaze

**PVP** – polivinilpirolidon

**PVPP** – polivinilpolipirolidon

**PMSF** – fenilmetilsulfonil fluorid

**PS I** – fotosistem I

**PS II** – fotosistem II

**RBOH** – eng. *Respiratory burst oxidase homologue*

**RDI** – eng. *Regulated Deficit Irrigation*

**RETC** – eng. *Respiratory electron transport chain*

**ROS** – reaktivne forme kiseonika (eng. *Reactive Oxygen Species*)

**Rubisco** – ribuloza-1,5-bisfosfat karboksilaza/oksigenaza

**RWC** – Relativan sadržaj vode (eng. *Relative Water Content*)

**SAR** – odnos strukture i funkcije (eng. *Structure-Activity Relationship*)

**SHAM** – salicilhidroksaminska kiselina

**SnRK2** – Sn-protein kinaza

**SOD** – superoksid-dismutaza

**SIP** – mali akvaporini (eng. *Small Intrinsic Proteins*)

**TBA** – tiobarbiturna kiselina

**TBE pufer** – tris-borat-EDTA pufer

**TCA** – trihlorsirćetna kiselina

**TIP** – akvaporini prisutni na tonoplastu (eng. *Tonoplast Intrinsic Proteins*)

**TRIS** – trometamin

**TRX** – tioredoksin

**tnOPDA** – tetra-OPDA

**UGT71C5** – UGT glukozil transferaza

**WUE** – efikasnost korišćenja vode (eng. *Water Use Efficiency*)

**XIP** – nedovoljno okarakterisani akvaporini (eng. *X Intrinsic Proteins*)

**ZEP** – enzim zeaksantin epoksidaza

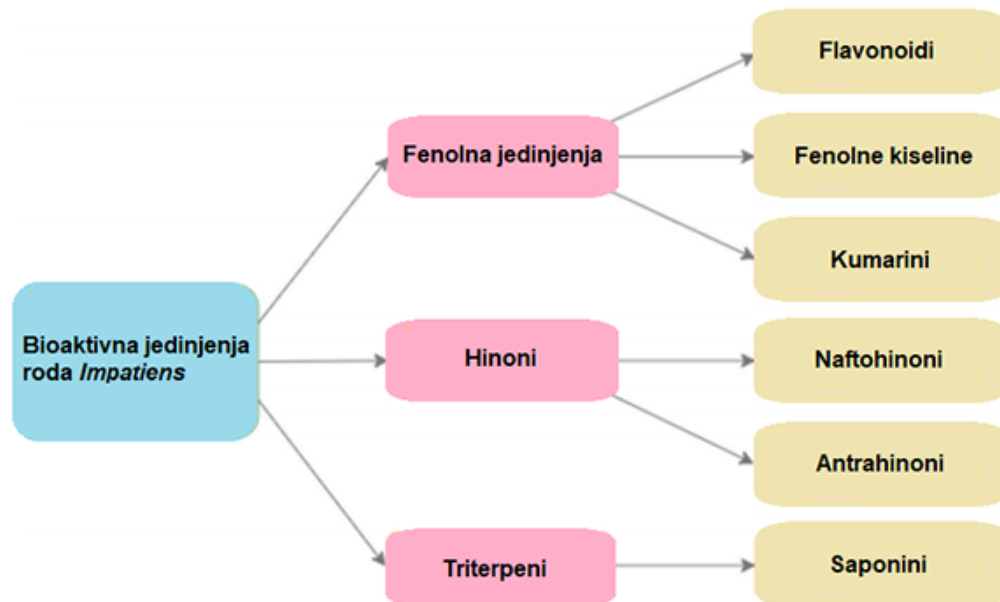
**4,5-ddh-JA** – 4,5-didehidrojasmonat

# 1. UVOD

## 1.1. Biologija ispitivane vrste

Rod *Impatiens* (porodica Balsaminaceae) obuhvata više od 1000 vrsta i jedan je od najvećih rodova među cvetnicama (Janssens i sar., 2009). Nove vrste se opisuju iz godine u godinu, a u poslednjih pet godina najveći broj vrsta opisan je na području Indije, Mjanmara i Kine (Hareesh i sar., 2015; Ramasubbu i sar., 2015, 2017; Prabhukumar i sar., 2015, 2016; Gogoi i sar., 2017; Yang i sar., 2017; Xia i sar., 2019). Ime roda *Impatiens* potiče od engleske reči “impatient”, što u prevodu znači nestrpljiv. Pridev nestrpljiv se odnosi na eksplozivno otvaranje zrelih plodova koji izbacuju seme na sve strane (Grey-Wilson, 1980; Caris i sar., 2006).

Vrste roda *Impatiens* su zeljaste, jednogodišnje ili višegodišnje, sa poleglim ili uspravnim izdancima, a drvenasti predstavnici ovog roda su retki (Fischer, 2004). Vrste su najzastupljenije u tropskim delovima Afrike, Madagaskara, regionu Himalaja, Indije i Šri Lanke. Predstavljaju tipične članove tropskih i suptropskih šuma na nadmorskim visinama od 500 do 800 m, a nekada i do 5000 m (Janssens i sar., 2009). Takođe, vrste se mogu naći i u umerenim regionima Azije, Evrope i Severne Amerike (Grey-Wilson, 1980), a introdukovane su u Južnu Ameriku i Australiju. Iako postoje neki izuzeci, većina vrsta roda *Impatiens* ne podnosi dugotrajne uslove suše ili produženo izlaganje direktnom sunčevom zračenju. Zbog toga, ove vrste su u svom rasprostranjenju uglavnom ograničene na vlažna staništa, kao što su tropske kišne šume, mesta pored reka, potoka ili močvara (Janssens i sar., 2009). Zbog lepog izgleda i dugog perioda cvetanja mnoge vrste roda *Impatiens* se gaje širom sveta kao dekorativne biljke (Szewczyk, 2018). Pored toga, mnoge vrste roda *Impatiens* se koriste u azijskoj tradicionalnoj medicini za lečenje reumatizma, preloma i zapaljenja tkiva oko noktiju, kao i farmaceutskoj, prehrambenoj i kozmetičkoj industriji (Pires i sar., 2021a). Veliki broj bioaktivnih jedinjenja detektovan je u vrstama roda *Impatiens* (Slika 1), od kojih su fenolna jedinjenja najzastupljenija (Szewczyk, 2018; Pires i sar., 2021a).



**Slika 1.** Bioaktivna jedinjenja roda *Impatiens*. Prema Pires i sar., 2021a.



Zbog dugogodišnje kultivacije vrsta roda *Impatiens* u dvorištima i baštama, mnoge od njih su postale i invazivne vrste poput *I. capensis*, *I. parviflora* i *I. glandulifera* (Bartomeus i sar., 2010; Skálová i sar., 2013; Čuda i sar., 2015; Rewicz i sar., 2020). Kompeticija sa autohtonim biljkama često rezultuje smanjenju brojnosti i areala rasprostranjenja autohtonih biljaka. Na primer, autori Tickner i sar. (2001) su opisali uspešno potiskivanje koprive od strane *I. glandulifera* u Velikoj Britaniji. Sa druge strane, mnoge vrste ovog roda su postale ugrožene na svojim prirodnim staništima i trenutno se 32 vrste roda *Impatiens* nalaze na crvenoj listi (IUCN, 2018).

### ***Impatiens walleriana***

Klasifikacija (ITIS report, <https://www.itis.gov/>):

**Domen:** Eukariota

**Carstvo:** Plantae

**Podcarstvo:** Viridiplantae (zelene biljke)

**Infracarstvo:** Streptophyta (kopnene biljke)

**Nadrazdeo:** Embryophyta

**Razdeo:** Tracheophyta (vaskularne biljke)

**Podrazdeo:** Spermatophytina

**Klasa:** Angiospermae (Magnoliophyta)

**Nadred:** Asteranae

**Red:** Ericales

**Familija:** Balsaminaceae

**Rod:** *Impatiens*

**Vrsta:** *Impatiens walleriana*

*I. walleriana* (Lepi Jova), varijetet Xtreme Scarlet (**Slika 2**), je jednogodišnja zeljasta biljka, kao i većina vrsta roda *Impatiens*. Visina biljke se kreće između 30-70 cm (Milošević, 2010). Biljke su veoma razgranate sa velikim sadržajem vode u debelim i mesnatim granama, što ih čini nežnim i krhkim. Oblik listova je jednostavan sa nazubljenim krajevima i spiralnim rasporedom, ali se često pri vrhovima izdanaka nalaze listovi okrenuti jedni prema drugima tj. naspramno raspoređeni. Cvetovi su zigomorfni, sa tri čašična i pet kruničnih listića (Grey Wilson, 1980). Krunica se sastoji od jedne uspravne latice, a preostale četiri su grupisane u dva bočna para (Milošević, 2010). Kako krunični tako i čašični listići ispoljavaju varijabilnost u pogledu veličine, oblika i boje kao adaptaciju na različite oprašivače (Fischer, 2004). Plodovi su bobice ili eksplozivne kapsule (čauze). *I. walleriana* je jedna od najpopularnijih vrsta roda *Impatiens*, sa mesnatim, sukulentnim listovima i raznovrsnim bojama cvetova koji se formiraju od ranog proleća do kasne jeseni (Antonić i sar., 2016). Boja cveta može da bude crvena, bela, narandžasta, ljubičasta i roze. *I. walleriana* je takođe jedna od tri biljne vrste (*I. hawkeri* i *I. balsamina*) roda *Impatiens*, koje se komercijalno proizvode u Srbiji dugi niz godina, a zbog svojih dekorativnih osobina i dugog perioda cvetanja ubraja se u najpopularnije hortikulture vrste širom sveta još od 19. veka (Pires i sar., 2021a). Prema podacima iz 2020. godine, proizvodnja *I. walleriana* zajedno sa *I. hawkeri* donosi zaradu od 250 miliona dolara godišnje u SAD (Pires i sar., 2021a). Iako Srbija raspolaže velikim potencijalom u proizvodnji hortikulture vrsta i izvozu rezanog cveća, u proseku na godišnjem nivou izveze se količina rezanog cveća u vrednosti od četiri miliona evra, a uveze u vrednosti od 11 miliona evra.



**Slika 2.** *I. walleriana*, varijetet Xtreme Scarlet sa crvenim cvetovima. Slika predstavlja izvorni doprinos autora, Đurić Marije.

Značaj vrste *I. walleriana* ne vezuje se isključivo za hortikulturu. Veliki broj publikacija ukazuje na potencijalnu primenu *I. walleriana* u različite svrhe. Naime, pokazano je da *I. walleriana* može da akumulira velike koncentracije kadmijuma u nadzemnom delu te se stoga svrstava u hiperakumulatorske vrste (Wei i sar., 2012; Lai i sar., 2017). Kao hiperakumulator, *I. walleriana* može da se koristi u svrhe fitoremedijacije, odnosno za redukovanje, uklanjanje, degradaciju ili imobilizaciju ovog teškog metala iz životne sredine, sa ciljem obnavljanja prirodnog stanja određenih površina. Autori Haider i Ullah (2019) u svom istraživanju ukazuju na antioksidativnu i antibakterijsku aktivnost ekstrakata listova *I. walleriana*. Pored antioksidativne i antibakterijske aktivnosti, autori Hannachi i sar. (2020) ukazuju i na potencijalno antikancerogeno delovanje ekstrakata listova *I. walleriana*. Najnovija istraživanja upućuju i na biološku aktivnost fenolnih jedinjenja u cvetovima *I. walleriana* kao i na njihovu potencijalnu primenu u prehrambenoj industriji (Pires i sar., 2021b).

*I. walleriana* ispoljava visoke zahteve za prisustvom vode u podlozi, čiji nedostatak vodi ka brzom padu turgora u ćelijama i dehidraciji tkiva. Neadekvatno snadbevanje vodom u procesu proizvodnje biljaka i tokom transporta do prodajnih objekata može usporiti rast i uticati na dekorativne osobine *I. walleriana*. Dosadašnja istraživanja ukazuju na negativno dejstvo vodnog deficita indukovano polietilen glikolom (PEG<sub>8000</sub>) na rastenje i razviće *I. walleriana in vitro*, kao i pozitivan uticaj egzogene primene salicilne kiseline u cilju neutralisanja uticaja vodnog deficita u *in vitro* i *ex vitro* uslovima (Antonić i sar., 2016, 2020; Safari i sar., 2021). Folijarnim tretmanom rastvorom salicilne kiseline tokom redukovano navodnjavanja, *I. walleriana* intenzivira formiranje

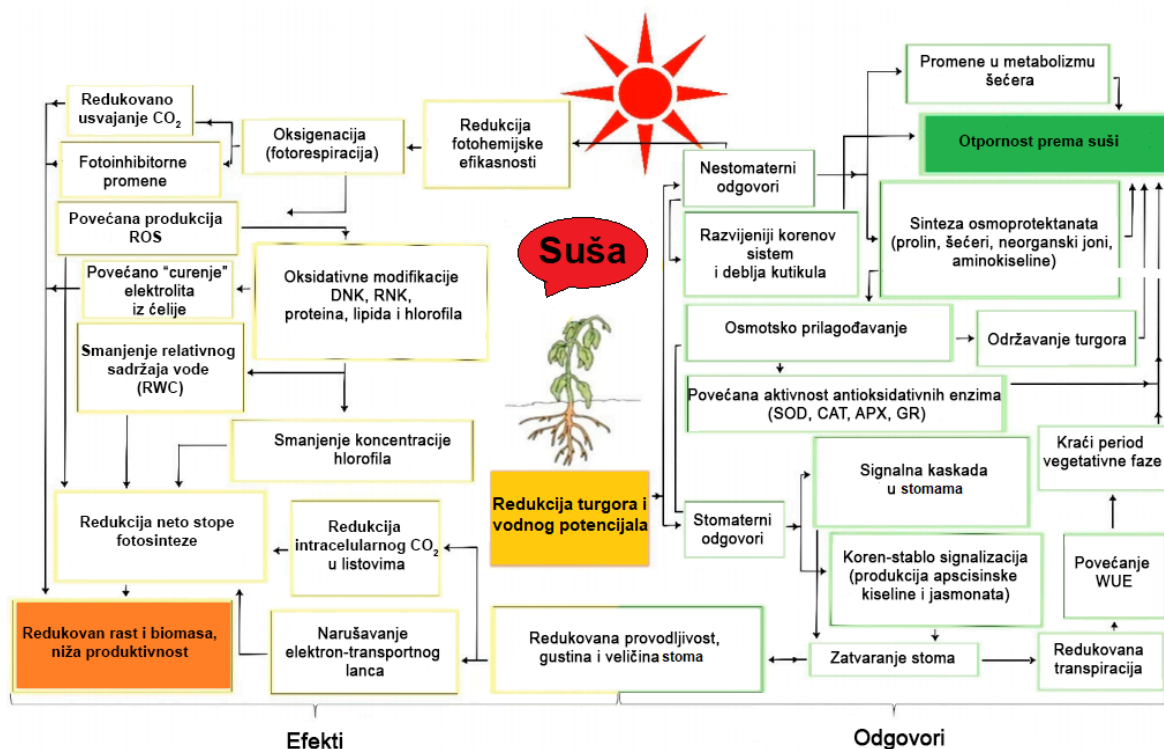
pupoljaka i cvetanje (Antonić i sar., 2020). Takođe, isti autori su pokazali da suša dovodi do ekspresije gena *IwDhn2.1* i *IwDhn2.2* koji su odgovorni za sintezu proteina dehidrina. Zbog hidrofилnih osobina ovi proteini se vezuju periferno za ćelijsku membranu, štiteći je od oštećenja koja mogu da nastanu kao posledica delovanja suše.

Kada je reč o biotičkom stresu, pokazane su promene aktivnosti antioksidativnih enzima u izdancima *I. walleriana* i *I. hawkeri* usled disbalansa između nastanka i uklanjanja reaktivnih vrsta kiseonika, uzrokovanog napadom virusa bronzavosti paradajza i eliminacijom virusa kulturom meristema (Milošević i sar., 2012). U cilju povećanja otpornosti *I. walleriana* na ovaj i druge RNK viruse uspostavljen je protokol za transformaciju pomoću *A. tumefaciens* C58C1*pac1* (Milošević i sar., 2013).

## 1.2. Uticaj suše na rastenje i razviće biljaka

Suša je abiotički stresogeni faktor koji negativno utiče na rastenje i razviće biljaka ispoljavajući efekte u svim razvojnim fazama biljnog organizma (Anjum i sar., 2011a; Anjum i sar., 2017a). Termin suša se odnosi na nedostatak vode u podlozi uzrokovan nedovoljnom količinom atmosferskih padavina ili intenzivnim procesom transpiracije kod biljaka (Murtaza i sar., 2016). U prirodnim uslovima, nedostatak vode u podlozi i intenzivna transpiracija su najčešće povezani sa dejstvom visokih temperatura. U slučajevima kada je voda dostupna u podlozi, ali kod biljaka je njeno usvajanje onemogućeno, govori se o fiziološkoj suši. Fiziološka suša uglavnom nastaje kao posledica dejstva niskih temperatura, koje inhibiraju aktivnost korenovog sistema što onemogućava usvajanje vode prisutne u podlozi. Takođe, povećana koncentracija soli u podlozi ili poplave mogu negativno da utiču na usvajanje vode korenovim sistemom. Na globalnom nivou, suša predstavlja veliki problem i ograničavajući faktor u proizvodnji brojnih useva i komercijalno značajnih biljnih vrsta. Iz ugla različitih modela o klimatskim promenama, naučnici sugerišu na nepovoljan uticaj povećanja prosečnih godišnjih temperatura na celokupan biodiverzitet. Predviđa se povećanje prosečnih godišnjih temperatura za 2,5 – 5,4 °C do 2100. godine, koje će biti praćeno smanjenjem padavina za oko 15% (Ciscar, 2012; Lipiec i sar., 2013). Sve više izražene sušne sezone svrstavaju se u ekstremne meteorološke događaje (Anjum i sar., 2017).

Suša indukuje dehidraciju tkiva, inhibiciju ćelijske deobe, izduživanja i diferencijacije ćelija, usporavanje osnovnih fizioloških i metaboličkih procesa, što vodi do vidljivih morfoloških promena na biljkama (Anjum i sar., 2011a; Anjum i sar., 2017a). Suša utiče na smanjenje hidrauličke provodljivosti korena, izaziva zatvaranje stoma što limitira razmenu gasova, odnosno utiče na procese fotosinteze i transpiracije, usvajanja i transporta nutrijenata iz zemljišta (Anjum i sar., 2011a, 2017a). Osetljivost biljne vrste prema suši zavisi od genotipa, ontogenetske faze razvića, dodatnih stresogenih faktora, frekvencije, intenziteta i trajanja suše (Anjum i sar., 2011a; Murtaza i sar., 2016; Kapoor i sar., 2020). Različitim mehanizmima otpornosti, biljne vrste reaguju na stres suše. Mehanizmi otpornosti prema suši uključuju mehanizme potpunog izbegavanja suše ili "efemeroidnu strategiju", mehanizme izbegavanja suše i mehanizme koji omogućavaju toleranciju prema suši (Basu i sar., 2016; Laxa i sar., 2019). Koristeći različite mehanizme u okviru mehanizama otpornosti, na fiziološkom, biohemijskom i molekularnom nivou biljke reaguju na negativne efekte suše. U zavisnosti od genotipa, može se govoriti o tolerantnim i netolerantnim biljnim vrstama (You i sar., 2019; Li i sar., 2019). Međutim, prolongirana i intenzivna suša može dovesti do uginuća i najtolerantnijih biljnih vrsta (Zargar i sar., 2017b) i s obzirom na to, preduzimaju se različite mere u proizvodnji komercijalno značajnih biljnih vrsta čiju produktivnost suša može da ograničava (Fang i Xiong, 2015). Sumarno, na **Slici 3** prikazani su uticaji suše na rastenje i razviće biljaka, kao i odgovori biljaka na morfološkom, fiziološkom, biohemijskom i molekularnom nivou. Kroz složenu mrežu interakcija na svim nivoima organizacije, biljke reaguju na sušu u cilju povećanja otpornosti prema ovom stresogenom faktoru.



**Slika 3.** Uticaj suše na rastenje i razviće biljaka na različitim nivoima organizacije. ROS – reaktivne forme kiseonika (eng. *Reactive Oxygen Species*), SOD – superoksid-dismutaza, CAT – katalaza, APX – askorbat peroksidaza, GR – glutation reduktaza, RWC<sup>1</sup> – eng. *Relative Water Content* (relativan sadržaj vode), WUE<sup>2</sup> – eng. *Water Use Efficiency* (efikasnost korišćenja vode). Preuzeto i modifikovano prema Mahmood i sar., 2020.

### 1.2.1. Morfološke promene kod biljaka tokom suše

Prva reakcija biljaka na dejstvo suše je biofizički odgovor koji se zasniva na promenama na ćelijskom nivou (Fathi i Tari, 2016). Rastenje biljaka narušeno je pre svega inhibicijom ćelijske deobe, izduživanja i diferencijacije usled gubitka turgidnosti ćelija pri smanjenom vodnom potencijalu (Shao i sar., 2008; Anjum i sar., 2011a; Murtaza i sar., 2016). Rast ćelija se smatra jednim od najosetljivijih fizioloških procesa u stresnim uslovima (Taiz i Zaiger, 2006). Smanjenje vodnog potencijala u ćelijama pri dehidraciji smanjuje vrednost turgora, koji u normalnim fiziološkim uslovima vrši pritisak na ćelijski zid i povećava njegovu plastičnost, omogućavajući rastenje ćelije. Inhibicijom procesa rasta i razvoja pojedinačnih ćelija, redukuje se rast i razvoj organa, a samim tim i organizma u celini (Murtaza i sar., 2016). Broj i veličina listova po biljci se redukuju što direktno utiče na smanjen intenzitet fotosinteze i asimilaciju hranljivih materija (Anjum i sar., 2017a). Samim tim, redukuje se rast, kao i masa svežih i suvih biljaka. U zavisnosti od intenziteta i trajanja sušnog perioda, mnoge biljke uvijaju listove (eng. *leaf rolling*) ili menjaju orijentaciju listova u slučaju kada je i intenzitet svetlosti povećan (Kadioglu i Terzi, 2007). Na taj način smanjuje se lisna površina preko koje se vrši odavanje vode u atmosferu transpiracijom. Sa

<sup>1</sup> RWC – relativan sadržaj vode u tkivima odnosi se na apsolutnu količinu vode neophodne biljci za dostizanje optimalnog vodnog statusa u tkivima (González i González-Vilar, 2001).

<sup>2</sup> WUE – predstavlja odnos iskorišćene vode i produktivnosti biljaka u odnosu na asimilaciju CO<sub>2</sub> i gubitak vode transpiracijom.

druge strane, to može doprineti povećanju efikasnosti usvajanja vode korenovim sistemom. Pri nedostatku vode u podlozi odnos rasteња između nadzemnog dela i korenovog sistema kod pirinča je u korist korenova, u cilju poboljšanja apsorpcije vode i nutrijenata (Xu i sar., 2015). Brži rast korenovog sistema povećava mogućnost da biljka dođe do vode u dubljim slojevima zemljišta i na taj način ublaži negativno dejstvo suše na rasteње i razviće (Zargar i sar., 2017b; Yang i sar., 2021). Svakako, rast korenovog sistema pri suši zavisi i od genotipa biljke, ali i intenziteta i trajanja suše (Lipiec i sar., 2013). Biljne vrste koje imaju plitak korenov sistem poput krompira, osetljivije su na dejstvo suše u odnosu na biljne vrste sa dubljim korenovim sistemom poput kukuruza ili deteline (Lipiec i sar., 2013).

### **1.2.2. Fiziološke i biohemijske promene kod biljaka tokom suše**

Inhibiran rast i deoba ćelija usled gubitka turgidnosti, vode ka narušavanju brojnih fizioloških i biohemijskih procesa poput fotosinteze, respiracije, usvajanja nutrijenata i drugih metaboličkih procesa (Shao i sar., 2008). Najveći uticaj suša ispoljava na redukciju procesa fotosinteze (Farooq i sar., 2009). Fotosinteza se smatra najvažnijim procesom na planeti Zemlji, s obzirom da predstavlja jedini način pretvaranja svetlosne energije u hemijsku energiju, koja se dalje koristi u živim sistemima (Zargar i sar., 2017b). Sposobnost biljke da se prilagodi na promenjene uslove životne sredine je direktno ili indirektno povezana sa promenama na nivou fotosintetičkog aparata. Promene na nivou fotosintetičkog aparata uzrokuju i promene brojnih fizioloških i biohemijskih procesa i posledično utiču na rasteње biljaka. Niža aktivnost fotosintetičkog aparata je uobičajena posledica nedostatka vode u biljnim tkivima, kako zbog ograničene provodljivosti stoma, tako i zbog brojnih oštećenja koja se pripisuju “nestomaternim mehanizmima” (Farooq i sar., 2009; Murtaza i sar., 2016). Tokom dehidracije biljke zatvaraju stome posredstvom fitohormona apscisinske kiseline – ABA kako bi ograničile odavanje vode putem transpiracije, a istovremeno ograničavaju influks CO<sub>2</sub>. Nestomaterni mehanizmi obuhvataju narušavanje biosinteze glavnog fotosintetičkog pigmenta – hlorofila, funkcionalne i strukturne promene hloroplasta, fotosintetičkih enzima i narušavanje procesa akumulacije, transporta i distribucije asimilata (Murtaza i sar., 2016). Oba mehanizma su podjednako važna i dominantnost jednog u odnosu na drugi zavisi od biljne vrste, razvojne faze, intenziteta i trajanja stresa, kao i uticaja drugih spoljašnjih faktora. Usled redukovanoj usvajanja CO<sub>2</sub> pri dehidraciji, izraženiji je i proces fotorespiracije, koji vodi ka povećanoj produkciji reaktivnih formi kiseonika.

Nedostatak vode u podlozi redukuje koncentraciju fotosintetičkih pigmenta i aktivnost fotosintetičkih enzima, što za posledicu ima narušavanje celog elektron-transportnog lanca. Poznato je da je koncentracija hlorofila pozitivno korelisana sa intenzitetom fotosinteze (Murtaza i sar., 2016). Smanjenje koncentracije hlorofila pri suši je direktna posledica fotooksidacije i degradacije pigmenta (Anjum i sar. 2011a; Fathi i Tari, 2016). Koncentracija hlorofila pri stresnim uslovima zavisi od intenziteta i trajanja stresnog perioda, kao i od same biljne vrste (Murtaza i sar., 2016). Većina istraživanja o efektima suše na koncentraciju fotosintetičkih pigmenta, ukazuje na redukciju koncentracije hlorofila u listovima biljaka (Kannan i Kul, 2011; Wu i sar., 2013; Abbas i sar., 2014). U zavisnosti od genotipa i osetljivosti prema suši, kod različitih varijeteta pšenice dolazi do redukcije koncentracije hlorofila pri suši ili koncentracija ovog pigmenta ostaje nepromenjena (Zaefyzadeh i sar., 2009). Takođe, postoje i primeri povećanja koncentracije hlorofila u listovima biljaka tokom suše (Pirzad i sar., 2011; Dastborhan i Ghassemi-Golezani, 2015). Sa druge strane, karotenoidi kao pomoćni fotosintetički pigmenti, imaju ulogu u zaštiti fotosintetičkog aparata od oksidativnog stresa, a detaljniji opis njihove uloge u prevazilaženju negativnih uticaja suše opisan je u poglavlju 1.3.3.1. Takođe, karotenoidi su prekursori u biosintezi fitohormona ABA, koji ima veoma bitnu ulogu u mehanizmima otpornosti biljaka prema suši. Kod mnogih biljnih vrsta zabeleženo je povećanje koncentracije karotenoida pri dehidraciji tkiva uzrokovanoj sušom (Irani i sar., 2015; Sarker i Oba, 2018), smanjenje njihove koncentracije (Goodarzian i Ghahfarokhi, 2015;

Khoyerdi i sar., 2016; Okunlola i sar., 2017), a u zavisnosti od genotipa zabeležene su i nepromenjene vrednosti koncentracije karotenoida pri suši (Jia i sar., 2020a).

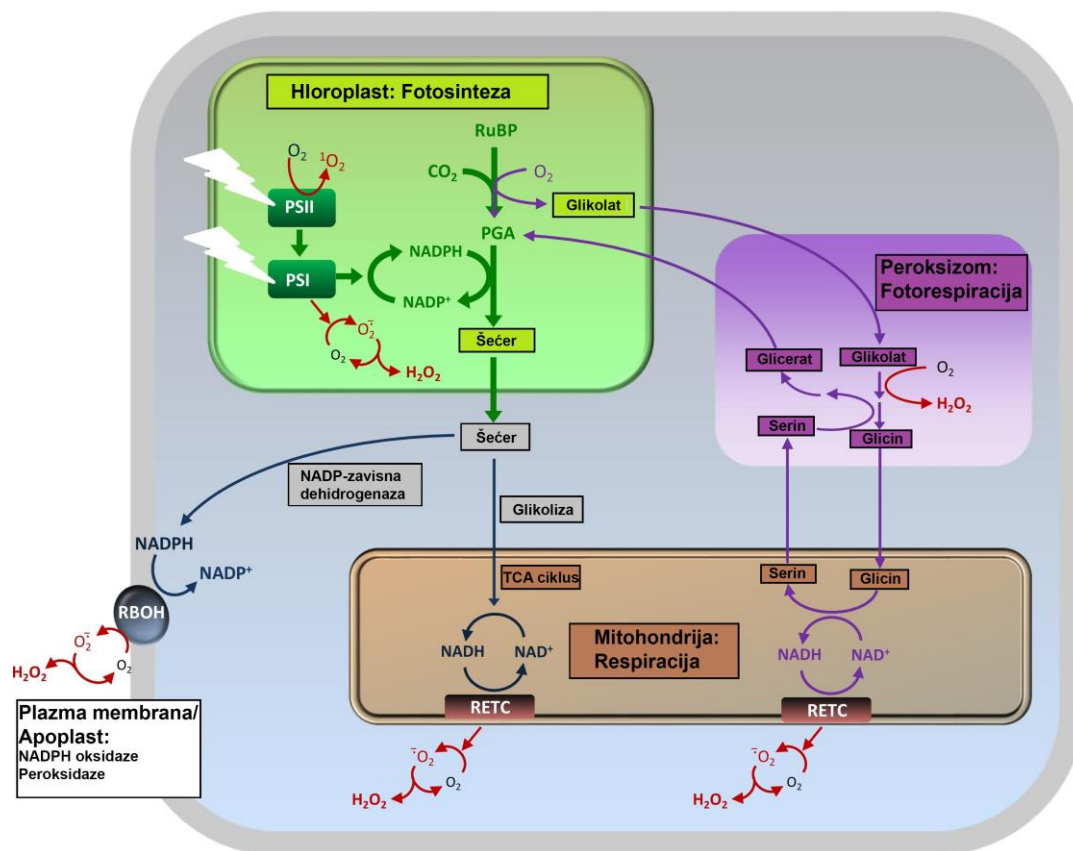
Posledica smanjenog inteziteta fotosinteze je smanjenje celokupne nadzemne biomase biljaka, kao i promene u rastu, biomasi i funkcionisanju korenovog sistema. Suša dovodi do otežanog usvajanja mineralnih soli iz podloge putem korenovog sistema i njihovog transporta kroz biljku, nepovoljno utičući na rastenje vegetativnih organa (Anjum i sar. 2011a). Nedostatak vode u podlozi može da uzrokuje povećanu akumulaciju soli i jona u gornjim slojevima zemljišta dovodeći korenov sistem u stanje osmotskog stresa (Fathi i Tari, 2016).

### 1.2.2.1. Oksidativni stres

Reaktivne forme kiseonika predstavljaju uobičajen produkt aerobnog metabolizma biljaka i drugih organizama. U zavisnosti od prirode i zastupljenosti, ROS mogu biti toksične za biljni organizam, ali isto tako mogu imati ulogu sekundarnih glasnika u inicijaciji signalnih kaskada koje aktiviraju odbrambene mehanizme u biljkama (Gupta i sar., 2015). Dejstvo stresogenih faktora poput suše, visokih/niskih temperatura, povećanog saliniteta, teških metala, UV zračenja i patogenih infekcija, vodi ka povećanoj proizvodnji ROS i narušavanju ćelijske homeostaze. U situacijama kada proizvodnja ROS prevazilazi kapacitet antioksidativnog sistema za uklanjanje istih, govori se o oksidativnom stresu u biljkama (Gupta i sar., 2015). Reaktivne forme kiseonika koje se najčešće pominju su: singlet kiseonik ( $O_2^1$ ), vodonik peroksid ( $H_2O_2$ ), superoksid anjon radikal ( $O_2^{\cdot-}$ ), hidrosil radikal ( $OH\cdot$ ), perhidrosil radikal ( $HO_2\cdot$ ), peroksil radikal ( $RO_2\cdot$ ) i azot monoksid (NO). Među navedenim ROS,  $O_2^1$ ,  $H_2O_2$ ,  $O_2^{\cdot-}$  i  $OH\cdot$  su najzastupljenije sa međusobno ispoljenim razlikama u stabilnosti, reaktivnosti i mogućnosti transporta kroz ćelijske membrane. Posledice oksidativnog stresa su narušavanje strukture proteina i DNK putem oksidativnih modifikacija i lipidne peroksidacije. Oksidativne modifikacije proteina i DNK podrazumevaju ireverzibilne promene u strukturi makromolekula koje nastaju direktnom interakcijom sa ROS. Oksidativne modifikacije metionina, tiolnih grupa cisteina kao i karbonilacija prolina, lizina, arginina, treonina su najčešće pominjani efekti ROS na proteine (Waszczak i sar., 2015; Yalcinkaya i sar., 2019; Dvorak i sar., 2020). Karbonilacija predstavlja tip oksidativne modifikacije putem koje se karbonilne grupe (aldehidi i ketoni) dodaju aminokiselinama, što može povećati verovatnoću za proteolizu takvih aminokiselina (Ciacka i sar., 2020). Oksidativne modifikacije DNK najčešće podrazumevaju modifikacije azotnih baza od strane najreaktivnijeg hidroksi radikala i superoksid anjon radikala (Møller i sar., 2007). Reaktivne forme kiseonika utiču i na aktivatore i inhibitore Rubisco enzima (ribuloza-1,5-bisfosfat karboksilaza/oksigenaza), kao i na aktivnost drugih fotosintetičkih enzima (PEPC – fosfoenol piruvat karboksilaza; FBP – 3 fruktozo-1,6-bisfosfataza; PPDK – ortofosfat dikinaza; NAPD-ME – malatna dehidrogenaza). Rubisco enzim je ključni enzim za asimilaciju  $CO_2$  u Kalvinovom ciklusu gde ima funkciju karboksilaze, dok u procesu fotorespiracije predstavlja oksigenazu i vezuje  $O_2$  (Bauwe i sar., 2010). Lipidna peroksidacija ćelijskih membrana jedna je od najčešće istraživanih posledica delovanja ROS na strukturu i funkciju lipida membrane (Asthir i sar., 2015). Prekursori za stvaranje produkata lipidne peroksidacije su polinezasićene masne kiseline, glavne komponente membranskih lipida. Kroz faze inicijacije, propagacije i terminacije polinezasićene masne kiseline reaguju sa ROS formirajući konjugovane diene, lipidne peroksi radikale i krajnje hidroperokside koji predstavljaju veoma reaktivna jedinjenja, a sama reakcija je autokatalizovana (Asthir i sar., 2015; Soares i sar., 2019). Hidroperoksidi mogu da se transformišu do finalnih produkata lipidne peroksidacije poput kratkih hidrokarbonskih lanaca ketona, aldehida, alkena, malondialdehida (MDA) i jedinjenja sličnih njima, lipidnih epoksida i alkohola (Asthir i sar., 2015; Soares i sar., 2019). Malondialdehid je trikarbonski dialdehid čija se koncentracija često analizira i smatra indikatorom oštećenosti ćelijskih membrana tokom oksidativnog stresa (Asthir i sar., 2015; Soares i sar., 2019). Produkcija ROS potvrđena je u



hloroplastima, peroksizomima, mitohondrijama, ćelijskim membranama i apoplastu (Slika 4) (Noctor i sar., 2018; Dvorak i sar., 2020).



**Slika 4.** Produkcija ROS u ćeliji lista. PSI i PSII – fotosistemi I i II; RuBP – Rubisco enzim, PGA – fosfoglicerinska kiselina, TCA – ciklus trikarbonskih kiselina, RETC – eng. *Respiratory electron transport chain* (respiratorni elektron transportni lanac), RBOH – eng. *Respiratory burst oxidase homologue* (proteini koji učestvuju u produkciji ROS oksidacijom NADPH). Preuzeto i modifikovano prema Noctor i sar., 2018.

U biljkama, hloroplasti predstavljaju mesto najveće produkcije ROS, primarno superoksid anjon radikala i singlet kiseonika u procesu fotosinteze (Gupta i sar., 2015; Noctor i sar., 2018) (Slika 4). Glavni izvor superoksid anjon radikala je fotosistem I (PSI), gde dolazi do direktne redukcije proizvedenog kiseonika iz fotosistema II (PSII) do superoksid anjon radikala. Naime, intenzivna svetlost ili suša mogu dovesti do narušavanja elektron transportnog lanca i smanjene dostupnosti NADP, krajnjeg primaoca elektrona iz PSI. U tom slučaju elektron se prenosi na kiseonik u tzv. Melerovoj reakciji tokom pseudocikličnog transporta elektrona – PCEF (eng. *Pseudocyclic Electron Flow*). Dalje, superoksid anjon radikal se može konvertovati u  $H_2O_2$  reakcijom sa redukovanim feredoksinom, donorom elektrona za PSI. U PSII singlet kiseonik se produkuje u direktnoj reakciji sa ekscitiranim hlorofilom u tripletnom stanju ( $^3Chl^*$ ) (Triantaphylidès i Havaux, 2009; Noctor i sar., 2018). Hlorofil u tripletnom stanju ima duži životni vek (približno  $10^{-3}$  s) u odnosu na hlorofil u singlet stanju ( $^1Chl^*$ ) (približno  $10^{-8}$  s), što omogućava interakciju sa kiseonikom i proizvodnju singlet kiseonika. Smatra se da je singlet kiseonik upravo odgovoran za tzv. „beljenje listova“. S obzirom da singlet kiseonik ima kratak životni vek, jer se brzo neutrališe vodom, brzina difuzije od mesta generisanja je ključna u evaluaciji njegove biološke uloge.

U peroksizomima ROS se primarno produkuju u procesu fotorespiracije. Fotorespiracija se odigrava u sinhronizovanoj interakciji između tri ćelijske organele: hloroplasta, peroksizoma i mitohondrija i od značaja je za produkciju aminokiselina (**Slika 4**) (Noctor i sar., 2018). Rubisco enzim smanjuje afinitet vezivanja za CO<sub>2</sub>, dok se afinitet za O<sub>2</sub> i oksigenacija enzima povećavaju. S obzirom na to, O<sub>2</sub> se umesto CO<sub>2</sub> u većoj meri vezuje za Rubisco enzim i nastaje glikolat koji se iz hloroplasta transportuje u peroksizome pomoću posebnog proteinskog prenosioca. Glikolat se u peroksizomima oksiduje u glioksilat pomoću glikolatne oksidaze. U toj reakciji se troši kiseonik a stvara H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Glioksilat se konvertuje u glicin aktivnošću glioksilat aminotransferaze (Bauwe i sar., 2010). U mitohondrijama dva molekula glicina daju jedan molekul serina aktivnošću glicin dekarboksilaze i serin hidrosimetiltransferaze. Serin se iz mitohondrija transportuje do peroksizoma gde učestvuje u reakciji detoksifikacije glioksilata do glicerata. Finalno hloroplastna glicerat kinaza konvertuje glicerat do fosfoglicerinske kiseline, intermedijera u asimilaciji CO<sub>2</sub> tokom procesa fotosinteze (Bauwe i sar., 2010). Pored fotorespiracije, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se produkuje i u procesu β-oksidacije masnih kiselina u reakciji konverzije acyl-CoA u trans-2-enyl-CoA pomoću enzima acyl-CoA oksidaze, kao i aktivnošću različitih oksidaza (Del Río i López-Huertas, 2016). Takođe, pokazano je da se u peroksizomima produkuju i superoksid anjon radikal i singlet kiseonik (Del Río i López-Huertas, 2016).

U mitohondrijama se produkuje superoksid anjon radikal redukcijom molekulskog kiseonika elektronima koji „cure” iz kompleksa I i III elektron-transportnog lanca (Niu i Liao, 2016). Dalje, superoksid anjon radikal može da se konvertuje do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aktivnošću antioksidativnih enzima. U ćelijskom zidu produkcija ROS se dešava aktivnošću peroksidaza, a u plazma membranama NADPH oksidaza je odgovorna za produkciju ROS. Takođe, u apoplastu aktivnost NADPH oksidaza, oksalat oksidaza i poliamin oksidaza tokom degradacije spermidina dovodi do produkcije ROS (Dvorak i sar., 2020).

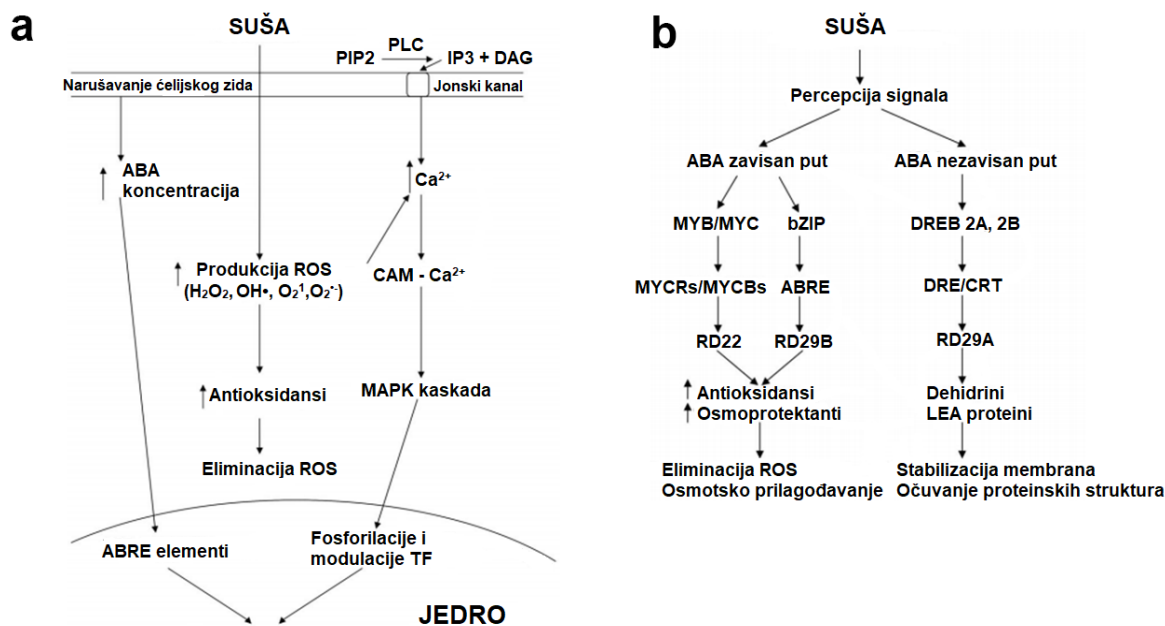
U odnosu na svoju hemijsku strukturu ROS forme se razlikuju po stabilnosti i reaktivnosti. Vodonik peroksid je najstabilniji i transportuje se kroz ćelijske membrane preko kanala za vodu, akvaporina – AQP (eng. *Aquaporins*) (Smirnoff i Arnaud, 2019). Njegovu stabilnost obezbeđuje odsustvo nesparenih elektrona u molekulu i s obzirom na to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ima vreme života veće od 1 ms (Mittler, 2017). Ovakve karakteristike vodonik peroksida obezbeđuju njegov transport na duže distance, povećavajući mogućnost delovanja na većem broju mesta (Gupta i sar., 2015). Singlet kiseonik je takođe veoma reaktivan molekul, sa vremenom života od 1-4 μs (Mittler, 2017). Sa druge strane, superoksid anjon radikal je umereno reaktivan i ne može direktno da oštećuje makromolekule. Njegova toksičnost je povezana sa proizvodnjom najtoksičnijeg radikala – hidroksil radikala. Kako ne postoji nijedna enzimska reakcija koja može da eliminiše hidroksil radikal, njegova proizvodnja neminovno vodi ka procesima koji oštećuju strukturu membrane i makromolekule. Hidroksil radikal nastaje Haber-Weissov-om reakcijom između superoksid anjon radikala i vodonik peroksida u prisustvu metala Cu ili Fe, kao i Fentonovom reakcijom iz vodonik peroksida u prisustvu dvovalentnog gvožđa (Asthir i sar., 2015; Soares i sar., 2019). Hidroksil radikal ima kratak životni vek od 1 ns, i njegovo delovanje je uglavnom vezano za mesto gde se proizvodi (Mittler, 2017). Jedini način da se izbegnu oksidativna oštećenja hidroksil radikalom je kontrola reakcija koje vode ka njegovoj proizvodnji, odnosno eliminacija superoksid anjon radikala i vodonik peroksida.

### 1.2.3. Promene na molekularnom nivou kod biljaka tokom suše

Promene na molekularnom nivou pri dehidraciji odnose se pre svega na promene u ekspresiji određenih gena. Percepcija stimulusa suše od strane receptora pokreće signalnu kaskadu koja vodi ka aktivaciji/deaktivaciji gena povezanih sa odgovorom biljaka na stres suše (Kaur i Asthir, 2017) (**Slika 5a**). U signalnoj kaskadi učestvuje veliki broj sekundarnih glasnika poput Ca<sup>2+</sup>, ROS, ABA, fosfoglicerola, diacilglicerola i različitih transkripcionih faktora koji



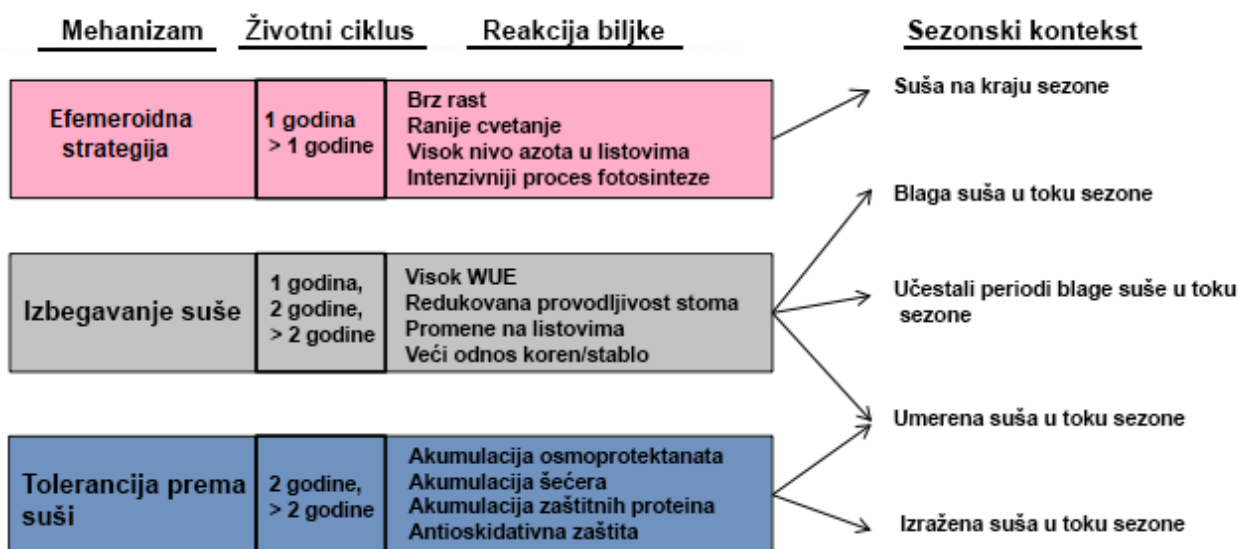
aktiviraju/deaktiviraju određene gene. Geni eksprimirani pri dehidraciji se mogu klasifikovati u nekoliko grupa u zavisnosti od velikog broja posmatranih faktora. Ekspresija gena može biti povezana sa sintezom jonskih transportera, kanala za vodu, enzima uključenih u biosintezu osmoprotektanata i antioksidativnih komponenti, kao i mnogih transkripcionih faktora koji regulišu ekspresiju drugih gena (Shinozaki i Yamaguchi-Shinozaki, 2007; Kaur i Asthir, 2017). Ekspresija velikog broja gena pri vodnom deficitu indukovana je abscisinskom kiselinom u ABA-zavisnom putu signalizacije (**Slika 5b**). Analize ABA inducibilnih gena ukazuju na postojanje odgovarajućih *cis* elemenata u promotorima – ABRE (eng. *Abscisic acid Responsive Elements*) (Kaur i Asthir, 2017). Proteini koji nose ABRE elemente nazivaju se ABRE vezujući faktori (eng. *ABRE binding factors*) sa karakterističnim strukturnim domenima – leucinskim ponovcima. U njih spadaju bZIP transkripcioni faktori, sa 78 opisanih članova svrstanih u 13 grupa kod *Arabidopsis thaliana* (Dröge-Laser i sar., 2018). Ekspresija ABA inducibilnih gena sa *cis* aktivnim elementima za MYB (eng. *Myeloblastosis Related Proteins*), MYC (eng. *Myelocytomatosis Related Proteins*), NAC (naziv potiče od početnih naziva za tri transkripciona faktora: NAM (eng. *No apical meristem*), ATAF1–2 (eng. *Arabidopsis thaliana activating factor*), CUC2 (eng. *Cup-shaped cotyledon, Arabidopsis*) i druge transkripcione faktore takođe je indukovana sušom (Shinozaki i Yamaguchi-Shinozaki, 2007). Takođe, u ABA-nezavisnom putu signalizacije učestvuju različiti transkripcioni faktori koji se vezuju za promotore koji sadrže DRE/CRT ili ERD1 *cis* sekvencu (**Slika 5b**) (Kaur i Asthir, 2017).



**Slika 5. a)** Uticaj suše na promene u ekspresiji gena; ABA – abscisinska kiselina, ABRE – ABA vezujući elementi, APX – askorbat peroksidaza, CAM – kalmodulin, CAT – katalaza, DAG – diacilglicerol, HSP – proteini toplotnog šoka, IP3 – inozitol 3 fosfat, LEA – proteini kasne embriogeneze, MAPK – mitogen aktivirajuće protein kinaze, PIP2 – fosfoinozitol bifosfat, PLC – fosfolipaza C, ROS – reaktivne forme kiseonika, TF – transkripcioni faktori; **b)** ABA-zavisan i ABA-nezavisan put u indukciji ekspresije gena: bZIP, ABRE, DREB, DRE/CRT, MYB/MYC, MYCRs/MYCBs – transkripcioni faktori; RD – geni aktivirani transkripcionim faktorima. Preuzeto i modifikovano prema Kaur i Asthir, 2017.

### 1.3. Mehanizmi otpornosti biljaka prema suši

Kako bi preživjele nepovoljne periode biljke su tokom evolucije razvile različite mehanizme otpornosti na stres suše. U mehanizme otpornosti prema suši spadaju mehanizmi potpunog izbegavanja suše odnosno “efemeroidna strategija”, mehanizmi izbegavanja i mehanizmi tolerancije prema suši (**Slika 6**). Svaki od mehanizama pripada određenoj strategiji koju biljke koriste u cilju prevazilaženja perioda kada je dostupnost vode u podlozi ograničena.



**Slika 6.** Mehanizmi otpornosti i reakcije biljaka prema suši. Preuzeto i modifikovano prema Kooyers, 2015.

#### 1.3.1. “Efemeroidna strategija”

Potpuno izbegavanje suše predstavlja mehanizam putem koga biljke brzim procesom razvića završavaju životni ciklus pre nastupanja sušnog perioda (Shavrukov i sar., 2017). Kraće trajanje vegetativne faze i brže cvetanje omogućavaju ovim biljkama da ispolje svoj genetski potencijal i produkuju seme za sledeće generacije. Potpuno izbegavanje suše je okarakterisano kao mehanizam razvijen tokom evolucije kod efemeroidnih biljaka, odnosno biljaka koje u kratkom vremenskom periodu kada su uslovi povoljni, razvijaju vegetativne i reproduktivne organe, razmnožavaju se i plodonose (Shavrukov i sar., 2017). Efemeroidna strategija je karakteristična za jednogodišnje zeljaste biljke, višegodišnje zeljaste biljke koje formiraju lukovice i žbunaste biljake (Kooyers, 2015) i neke jednogodišnje trave (Barry, 1995). Ova strategija podrazumeva intenzivne metaboličke procese, odnosno ćelijsku deobu, proliferaciju i diferencijaciju. Intenzivirana razmena gasova doprinosi intenzivnijem procesu fotosinteze i produkciji asimilata, što omogućava brži rast biljaka (Kooyers, 2015; Shavrukov i sar., 2017). Ovaj mehanizam se uočava kod biljaka pri kraju sezone kada u staništu nema dovoljne količine padavina pa su biljke primorane da brže završe životni ciklus.

#### 1.3.2. Mehanizmi izbegavanja suše

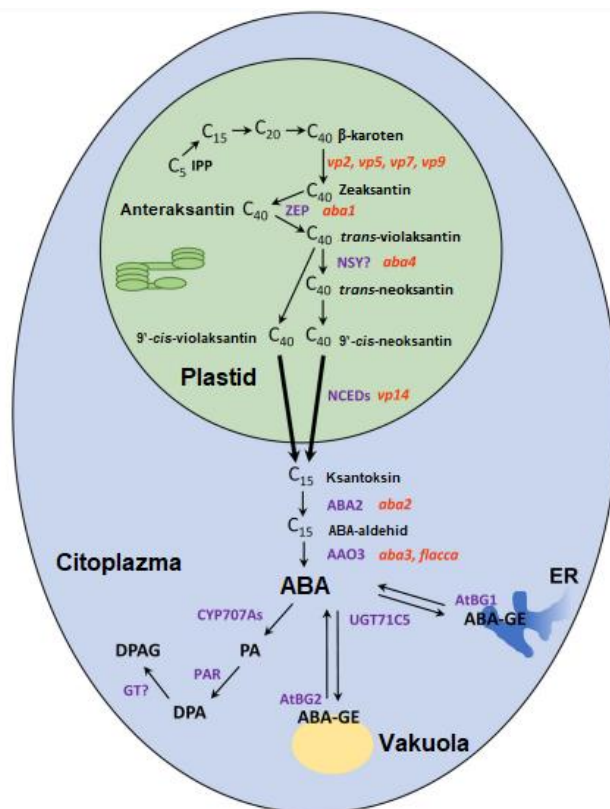
Opšte prihvaćena uloga ABA tokom izlaganja biljaka različitim stresogenim faktorima koji vode ka dehidraciji tkiva, okarakterisala je ovaj hormon kao “hormon stresa”. U mehanizmima

izbegavanja suše, ABA ima ključnu ulogu jer utiče na zatvaranje stoma i sprečava gubitak vode iz listova putem transpiracije.

Dugo vremena se smatralo da koren biljaka predstavlja “senzor” koji obaveštava nadzemne delove biljke o nedostatku vode u podlozi (Fathi i Tari, 2016). Nakon percepcije signala u korenu se intenzivnije sintetiše ABA, koja se transportuje do listova i pokreće signalne puteve koji vode ka zatvaranju stoma (Fathi i Tari, 2016). U međuvremenu, sinteza ABA se intenzivira i u listovima što dovodi do znatno povišene koncentracije ovog hormona pri delovanju suše. Zatvaranjem stoma sprečava se prekomerno odavanje vode iz nadzemnog dela biljke u atmosferu, dok sa druge strane koren raste kako bi dosegao do najdubljih slojeva zemljišta sa potencijalno dostupnom vodom. Međutim, postoje spekulacije o primarnom mestu biosinteze ABA pri dehidraciji i danas većina istraživača daje prednost nadzemnim delovima biljke u odnosu na koren (Takahashi i sar., 2020). Signal za povećanje biosinteze ABA u listovima je hidraulički signal, odnosno gubitak turgora u ćelijama. Naime, kod *A. thaliana* je pokazano da su listovi primarno mesto biosinteze ABA pri nedostatku vode (Ikegami i sar., 2009), dok kod kukuruza ekspresija ABA biosintetskih gena u korenu nije detektovana tokom rane faze vodnog deficita (Ernst i sar., 2010). Takođe, autori Kurmori i sar. (2018) ukazuju na značaj biosinteze ABA u listovima tokom dehidracije tkiva. Autori Goodger i Schachtman (2010), su predložili model po kome je sulfat primarni signal koji nastaje u korenu i transportuje se do listova gde stimuliše biosintezu ABA, koja se kasnije floemom transportuje do korena, a iz korena kreće ksilemom do lista. Kasnije su autori Batool i sar. (2018) pokazali da cistein dobijen iz sulfata može da bude medijator u prenosu signala od korena do listova. Skorašnja istraživanja ukazuju da peptid CLE25 (eng. *CLAVATA3/EMBRYO-SURROUNDING REGION-RELATED25*) koji se proizvodi u korenu, predstavlja signal za biosintezu ABA u listovima (Christmann i Grill, 2018; McLachlan i sar., 2018). Ovakvi rezultati ukazuju da biljke kontrolišu zatvorenost stoma putem različitih signala koji se generišu u različitim delovima biljke tokom dehidracije, a buduća istraživanja bi trebala da razjasne kako biljke prepoznaju signal “suša” specifično u svakom organu.

### 1.3.2.1. Metabolizam apscisinske kiseline pri dehidraciji tkiva uzrokovanj sušom

Apscisinska kiselina ( $C_{15}H_{20}O_4$ ) je seskviterpenoid čija biosinteza počinje od pekursora svih terpenoidnih jedinjenja,  $C_5$  izoprenskih jedinica – izopentenil-pirofosfata (IPP). Izoprenske jedinice nastaju u jednom od dva okarakterisana puta biosinteze kod viših biljaka, mevalonskog puta (MVA) ili metileritritol fosfatnog puta (MEP). Nizom reakcija ABA se sintetiše konverzijom  $C_{40}$  karotenoidnih prekursora do ksantoksina, a zatim preko ABA aldehida oksidacijom do ABA (**Slika 7**) (Nambara i Marion-Poll, 2005, Chen i sar., 2020). Endogena koncentracija ABA u biljnom tkivu je regulisana biosintezom, razgradnjom, translokacijom i konjugacijom sa drugim jedinjenjima. Prilikom dehidracije tkiva, ABA se *de novo* sintetiše, dok se prilikom rehidracije tkiva koncentracija ABA smanjuje. Katabolizam ABA podrazumeva razgradnju putem oksidacije do fazeinske i dihidrofazeinske kiseline. Razgradnja ABA najčešće se vrši hidrosilacijom na poziciji C8 pri čemu nastaje nestabilan produkt (8'-OH-ABA) koji izomerizacijom daje fazeinsku kiselinu. Pored 8' hidrosilacije, ABA može biti hidrosilovana i na pozicijama 7 i 9. Inaktivacija ABA u biljkama može biti posledica formiranja konjugata. ABA formira konjugate sa glukozom pri čemu nastaju ABA glukozni estri (ABA-GE) koji se akumuliraju u vakuoli, apoplastu i endoplazmatičnom retikulumu. Pored glukoznih estara u ćelijama se akumuliraju i ABA-glukozidi, ali u manjoj meri u odnosu na ABA-GE. Biološki aktivan oblik ABA u biljnim ćelijama je izomer *cis* (+) ili S(+) ABA, koji pod dejstvom UV zračenja može da pređe u neaktivan *trans* (-) oblik ili R(-) ABA (Ng i sar., 2014).



**Slika 7.** Metabolizam ABA u višim biljkama. *vp2, vp5, vp7* i *vp9* – mutanti defektni u biosintezi zeaksantina, ZEP – enzim zeaksantin epoksidaza vrši konverziju zeaksantina u violaksantin, *aba1*– mutant sa nemogućnošću konverzije zeaksantina u violaksantin, NSY – neoksantin sintaza kodirana *ABA4* genom vrši konverziju violaksantina do neoksantina koji izomerizacijom prelazi u 9' *cis*-neoksantin, *aba4* – mutant u konverziji violaksantina do neoksantina, NCED – 9-*cis*-epoksikarotenoid dioksigenaza koja vrši cepanje C<sub>40</sub> karotenoidnih produkata i katalizuje formiranje ksantoksina, *vp14* – mutant kukuruza sa inaktiviranim *NCED* genom, ABA2 – enzim iz familije oksido-reduktaza kodiran od strane *ABA2* gena, prevodi ksantoksin u ABA aldehid, *aba2* – mutant defektan u biosintezi ABA aldehida, AAO3 – ABA aldehidna oksidaza kodirana od strane *ABA3* gena obavlja finalnu konverziju ABA aldehida do ABA uz pomoć molibdenskog kofaktora MoCo, *aba3, flacca* – mutanti paradajza sa nemogućnošću konverzije ABA aldehida do ABA, *CYP707As* – enzim citohrom P450 monooksigenaza kodirana od strane *CYP707* gena, vrši hidroksilaciju ABA do fazeinske kiseline (PA), PAR – PA reduktaza katalizuje konverziju fazeinske kiseline do dihidrofazeinske (DPA), GT – glukozil transferaza prevodi DPA u DPA glukozid (DPAG), UGT71C5 – UGT glukozil transferaza katalizuje formiranje konjugata odnosno ABA glukoznih estara (ABA-GE), AtBG1/BG2 – β-glukozidaze katalizuju oslobađanje ABA iz ABA-GE konjugata, ER – endoplazmatični retikulum. Preuzeto i modifikovano prema Chen i sar., 2020.

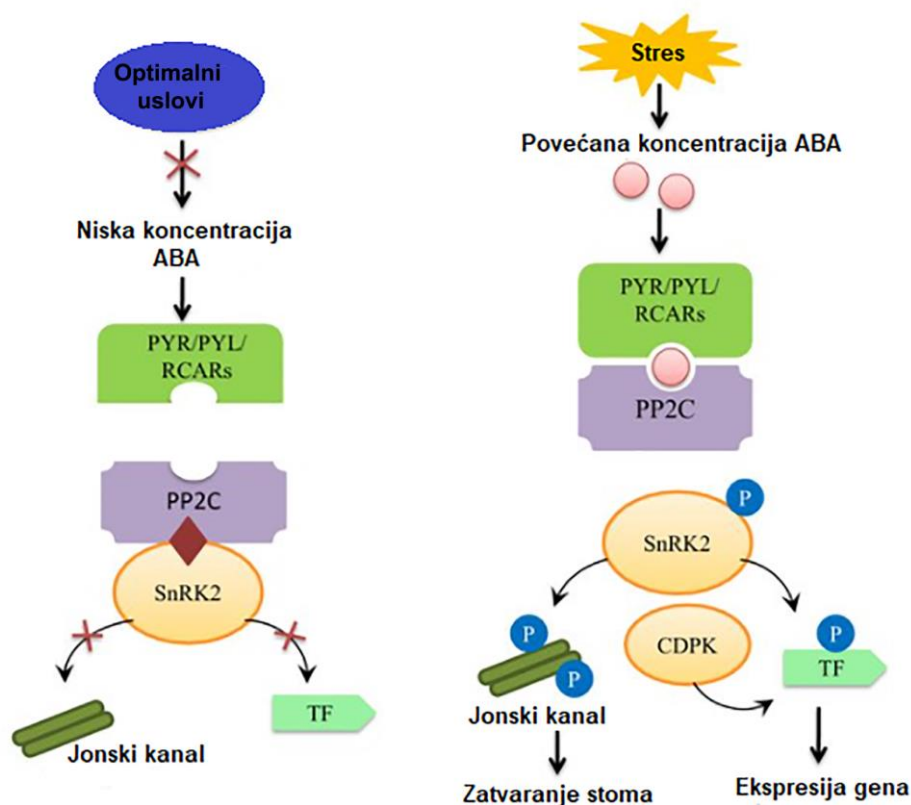
Ključni gen u biosintezi ABA je *NCED* koji kodira enzim sa ulogom u konvertovanju *cis*-neoksantina i *cis*-violaksantina do ksantoksina (Chen i sar., 2020). Pored *NCED* veoma bitnu ulogu ima gen *AAO* koji kodira enzim odgovoran za poslednji korak u sintezi biološki aktivne forme ABA, odnosno prevodi ABA aldehid do kiseline. Prilikom dehidratacije tkiva pokazano je da je povećana ekspresija *NCED* gena kod *Cistus creticus*, praćena povećanjem endogene koncentracije ABA (Munné-Bosch i sar., 2009). Slični rezultati opisani su i kod ječma (Zeng i sar., 2016), i kod tri različita kultivara šargarepe, kod kojih je prilikom dehidratacije tkiva ekspresija *NCED1* i *NCED2* gena bila znatno povećana (Zhang i sar., 2021). Takođe, pokazano je da povećanje ekspresije *NCED3* gena kod soje putem genetičke transformacije poboljšava toleranciju prema suši i

utiče na povećanje ekspresije *AAO3* kao i gena uključenih u ABA signalnu transdukciju (Molinari i sar., 2020). Smanjena ekspresija *CYP707A2* kataboličkog gena pri suši opisana je kod *Petunia × hybrida*, bez zabeleženih promena u ekspresiji biosintetskih gena *NCED1*, *NCED2*, *AAO31* i *AAO32* (Kim i sar., 2012). Autori Wang i sar. (2018) opisali su smanjenje ekspresije ABA kataboličkog gena *CYP707A1/3* i povećanje ekspresije  $\beta$ -glukozidaze *AtBG1* kod *A. thaliana* prilikom izlaganja dehidraciji. Autori Long i sar., (2019) ukazuju da je nivo ABA tokom dehidracije tkiva u tkivu lista *Arachis hypogaea* regulisan biosinteom, katabolizmom i transportom ABA.

Transport ABA kroz ćelije može da se odvija na kraćim i/ili dužim distancama, odnosno na ćelijskom i/ili nivou organa. Naime, postoje podaci o transportu ABA putem floema u listovima, kao i transportu ABA putem apoplasta od korena ka listu, pri čemu je osnovna pokretačka sila transpiracija (Merilo i sar., 2015). Nakon sinteze u korenu i apoplastnog transporta do stoma, ABA difuzijom ulazi u apoplast ćelija zatvaračica gde se vezuje za receptore i indukuje zatvaranje stoma. Ukoliko se ABA transportuje floemom, takođe difuzijom prelazi u apoplast stoma (Merilo i sar., 2015). Apocisinska kiselina je slaba kiselina (pH 4,8) kod koje se u optimalnim uslovima uspostavlja dinamička ravnoteža u koncentraciji između anjonske ( $ABA^-$ ) i protonovane ( $ABA-H$ ) forme. U optimalnim uslovima, apoplastni pH je kiseliji od citosolnog što omogućava difuziju protonovane forme iz apoplasta u ćeliju, gde se prevodi u ABA anjonski oblik. Međutim, u uslovima stresa, apoplastni pH raste i redukuje difuziju ABA u ćelije, ukazujući na neminovno postojanje transportera tj. olakšanog transporta ABA do stoma. Pri alkalnoj vrednosti apoplasta, ABA se transportuje kroz ćelije u aktivnom *cis* (+) obliku pomoću transportera koji pripadaju ABC i NPF (eng. *NRT1/PTR FAMILY*) familijama (Merilo i sar., 2015, Takahashi i sar., 2020). Transporteri iz ABC grupe su odgovorni za ulazak i izlazak ABA kroz ćelijske membrane dok su transporteri iz NPF grupe odgovorni za ulazak ABA u ćelije (Kuromori i sar., 2018). Nedavno je otkrivena i treća grupa ABA transportera – iz MATE familije (eng. *Multidrug and Toxic Compound Extrusion*), koji učestvuju u transportu ABA iz citoplazme u apoplastni ćelijski prostor (Zhang i sar., 2014a; Takahashi i sar., 2020).

Percepcija i transdukcija ABA signala regulisana je od strane tri proteinske klase koje obuhvataju receptore, pozitivne i negativne regulatore (**Slika 8**) (Ullah i sar. 2017). Receptori za ABA pripadaju familiji proteina PYR/PYL/RCAR (eng. *PYRABACTIN RESISTANCE1 – PYR*, *PYR1-LIKE – PYL*, *REGULATORY COMPONENTS OF ABA RECEPTORS – RCAR*) otkrivenih relativno skoro od strane dve grupe istraživača (Ma i sar., 2009; Park i sar., 2009), pri čemu je 14 članova okarakterisano u genomu *A. thaliana* (Klingler i sar., 2010, Rodriguez i sar., 2019).





**Slika 8.** Percepcija i transdukcija signala za ABA. U optimalni uslovima pri niskoj koncentraciji ABA, negativni regulator iz klase protein fosfataza 2C (PP2C) je vezan za Sn – protein kinazu (SnRK2) i blokirano je ABA odgovor (prikazano levo na slici). U stresnim uslovima dolazi do porasta u koncentraciji ABA čije vezivanje za receptor iz klase PYR/PYL/RCAR narušava fizičku interakciju između PP2C i SnRK2. Na taj način se pozitivni regulator SnRK2 aktivira autofosforilacijom (P) i dalje može da fosforiliše transkripcijske faktore (TF) omogućavajući odgovor na stres. Preuzeto i modifikovano prema Ullah i sar., 2017.

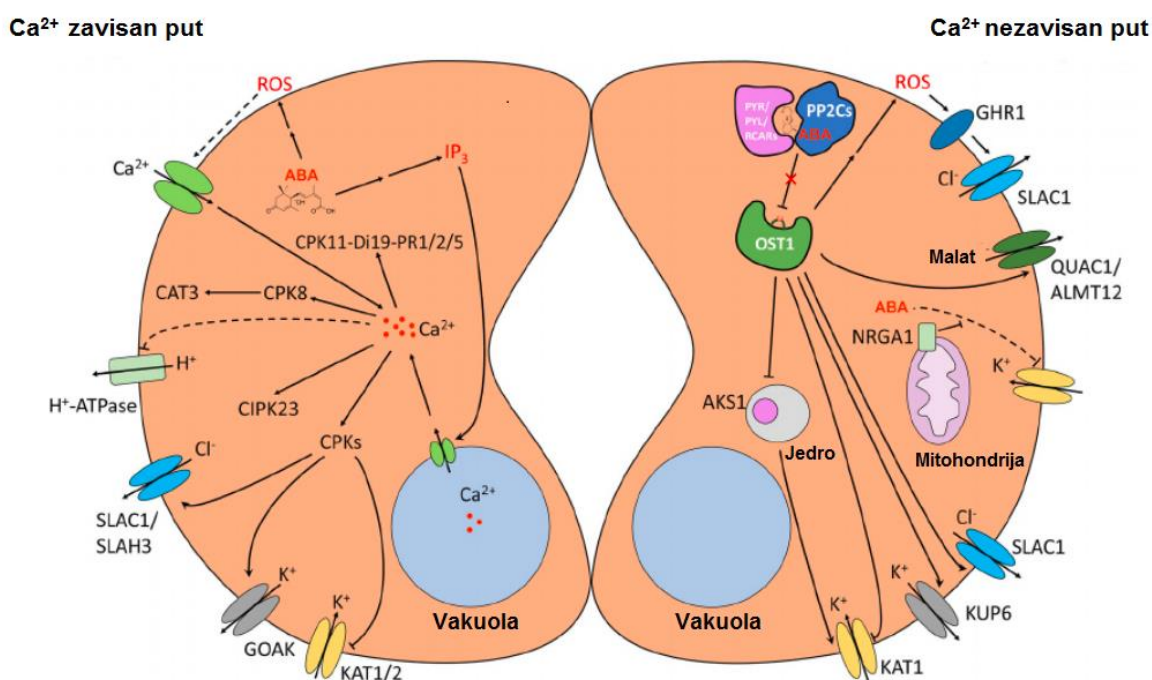
### 1.3.2.2. Uloga apscisinske kiseline u regulaciji transpiracije tokom suše

Povećanje koncentracije ABA pri delovanju suše utiče na zatvaranje stoma regulisanjem jonskog transporta u ćelijama zatvaračicama. Uticaj ABA na zatvaranje stoma pri vodnom deficitu ogleda se u promeni turgora ćelija zatvaračica i preko promene u koncentraciji različitih jona. Na taj način, zatvaranjem stoma sprečava se preterano odavanje vode iz tkiva putem transpiracije, što modifikuje i omogućava odvijanje drugih fizioloških procesa. Kada ABA dospe do ćelija zatvaračica vezuje se za ABA receptore i pokreće kaskadu događaja koji vode ka zatvaranju stoma (Laanemets i sar., 2013; Chen i sar., 2020). U ćelijama zatvaračicama mogu biti zastupljena dva puta za prenos ABA signala:  $Ca^{2+}$  zavisni i  $Ca^{2+}$  nezavisni put (**Slika 9**) (Chen i sar., 2020).

Kod  $Ca^{2+}$  zavisnog puta, ABA utiče na povećanje ROS formi i inozitol 3-fosfata (IP3) u ćelijama zatvaračicama. ROS utiču na aktivaciju  $Ca^{2+}$  ulaznih kanala na plazma membrani dok IP3 aktivira  $Ca^{2+}$  izlazne kanale na tonoplastu. Rezultat ovih promena je porast unutarćelijske koncentracije  $Ca^{2+}$  koji preko  $Ca^{2+}$  zavisnih kinaza CPK (eng. *Calcium Dependent Kinase*) (de)fosforilacijama modifikuju aktivnost drugih jonskih kanala na plazma membrani (Chen i sar., 2020). Povećanje nivoa  $Ca^{2+}$  u citoplazmi ćelija zatvaračica inhibira ulazne kanale za  $K^+$ , aktivira anjonske izlazne kanale i izlazne kanale za  $K^+$  na plazma membrani i inhibira funkcionisanje

protonske ATP-aze. Rezultat ovih procesa je smanjena koncentracija jona u ćelijama zatvaračicama, koja dovodi do odavanja vode i opadanja turgora, a krajnji ishod je zatvaranje stoma.

Kalcijum nezavisni put otkriven je kod nekih biljaka i ne uključuje direktno povećanje koncentracije  $\text{Ca}^{2+}$  jona u ćelijama zatvaračicama. U  $\text{Ca}^{2+}$  nezavisnom putu ključnu ulogu ima OST1/SnRK2.6 (eng. *Open Stomatal SnRK2.6*) serin/treonin protein kinaza, na čiju fosforilaciju utiče ABA vezivanjem za PYR/PYL/RCAR receptor (Chen i sar., 2020). Dalje, kinaza interaguje i fosforiliše transkripcione faktore koji se vezuju za *cis* aktivne elemente ABA gena što dovodi do zatvaranja stoma i smanjenja intenziteta transpiracije. Naime, OST1 kinaza aktivira SLAC1 i KUP/HAK/KT familiju izlaznih kanala za  $\text{Cl}^-$  i  $\text{K}^+$ , a inhibira KAT1  $\text{K}^+$  ulazni kanal. Na taj način smanjuje se koncentracija jona u ćelijama zatvaračicama i gubi se voda pri čemu dolazi do zatvaranja stoma. Takođe, OST1 kinaza aktivira i malatni transporter QUAC1/ALMT1 koji izvozi malat iz ćelija. Prisustvo  $\text{Ca}^{2+}$  nezavisnog puta u zatvaranju stoma primećeno je kod *Vicia faba* (Levchenko i sar., 2005), a u zavisnosti od eksperimentalnih uslova stome *Nicotiana tabacum* ispoljavaju ili  $\text{Ca}^{2+}$  zavisni ili  $\text{Ca}^{2+}$  nezavisni put u zatvaranju pri delovanju ABA (Marten i sar., 2007).



**Slika 9.** Uticaj ABA tokom dehidracije na zatvaranje stoma putem  $\text{Ca}^{2+}$  zavisnog ili  $\text{Ca}^{2+}$  nezavisnog puta. CPK – kalcijum zavisne kinaze, SLAC1/SLAH3 – izlazni kanali za  $\text{Cl}^-$ , GOAK – izlazni kanal za  $\text{K}^+$ , KAT1/2 – ulazni kanal za  $\text{K}^+$ , KUP6 – izlazni kanal za  $\text{K}^+$ , QUAC1/ALMT12 – izlazni kanal za malat, GHR1 – plazma membranska kinaza koja utiče na aktivnost SLAC1 kanala, AKS1 – transkripcioni faktor čija se funkcija blokira fosforilacijom od strane OST1 čime se smanjuje ekspresija *KAT1* gena za ulazni  $\text{K}^+$  KAT1 kanal, NRG1 – mitohondrijalni gen čiji produkt može da inhibira ABA inhibiciju  $\text{K}^+$  ulaznog kanala. Preuzeto i modifikovano prema Chen i sar., 2020.

### 1.3.3. Mehanizmi tolerancije biljaka prema suši

Tolerancija biljka prema suši podrazumeva sposobnost biljke da održi fiziološke procese i funkcije i pri nižem vodnom potencijalu u svojim tkivima. Akumulacija osmoprotektanata, komponenti antioksidativne zaštite, proteina sa zaštitnom ulogom, transportera i različitih produkata sekundarnog metabolizma leži u osnovi tolerancije biljaka prema suši (Waseem i sar., 2011).

#### 1.3.3.1. Neenzimske komponente antioksidativne zaštite od stresa izazvanog sušom

**Prolin** – je esencijalna aminokiselina čija se akumulacija u biljkama povećava pod dejstvom različitih abiotičkih stresogenih faktora. Dejstvo prolina u uslovima dehidracije tkiva može biti dvojako. Kao osmoprotektant, prolin utiče na promenu osmotskog odnosno vodnog potencijala u ćelijama i na taj način pospešuje transport vode sa mesta višeg ka mestu nižeg vodnog potencijala. Kao antioksidant, prolin može da „hvata“ slobodne radikale ili da sprečava proizvodnju ROS (Signorelli i sar., 2014; Soares i sar., 2019). Prolin može da eliminiše isključivo OH• pri čemu se konvertuje u  $\gamma$ -aminobuternu kiselinu (Signorelli i sar., 2014; Signorelli i sar., 2016). S obzirom da za svoju biosintezu prolin zahteva prisustvo NADPH, na taj način obezbeđuje određenu količinu redukovanog NADP<sup>+</sup> koji je neophodan kao krajnji akceptor elektrona u fotosintezi (Sharma i sar., 2006; Signorelli i sar., 2016). Na taj način u stresnim uslovima, prolin omogućava prenos elektrona do NADP<sup>+</sup> i smanjuje verovatnoću proizvodnje ROS tokom fotosinteze. Biosinteza prolina može da se odigrava na dva načina, polazeći od glutamata ili ornitina kao početnih jedinjenja. Biosinteza od glutamata je učestalija i podrazumeva aktivnost dva ključna enzima,  $\Delta^1$ -pirolin-5-karboksilat sintaze (P5CS) i  $\Delta^1$ -pirolin-5-karboksilat reduktaze (P5CR) (Gill i Tuteja, 2010). Pored prolina, važnu ulogu u osmoprotektivnoj zaštiti imaju i šećeri (fruktan i trehaloza), alkoholi (manitol, sorbitol i ononitol), glicin-betain, alanin-betain, prolin-betain, hidroksiprolin, hidroksiprolin-betain (Singh i sar., 2015).

**Karotenoidi** – su članovi najveće klase biljnih sekundarnih metabolita, terpenoida. Terpenoidi nisu samo brojni, već i jako varijabilni u strukturi, na šta ukazuju stotine različitih ugljenikovih skeleta u građi, kao i veliki spektar funkcionalnih grupa. Uprkos jako velikom diverzitetu, svi terpenoidi su imaju zajednički put biosinteze. Terpenoidi nastaju prema izoprenskom biosintetskom pravilu (Ruzicka, 1953), od aktivnih C5 jedinica, tj. od aktivnog izoprena i njegovog izomera 3,3-dimetilalil pirofosfata (DMAPP). Karotenoidi u svom sastavu sadrže osam izoprenskih jedinica i stoga pripadaju tetraterpenima (Havaux, 2014). Prisustvo dvostrukih veza u ugljeničnom skeletu, zatim modifikacije poput hidroksilacije i ciklizacije, obezbeđuju širok spektar karotenoidnih jedinjenja. U procesu fotosinteze karotenoidi imaju ulogu pomoćnih fotosintetičkih pigmenata kojii apsorbuju svetlost talasne dužine 450 do 570 nm, odnosno plavo-zeleni deo spektra. Takođe, karotenoidi su deo pomoćnih antena pigmenata fotosistema II i fotoprotektivnog ksantofilnog ciklusa (Havaux, 2014). Fotoprotektivna uloga karotenoida ogleda se u sposobnosti “gašenja” tripletnog stanja hlorofila i neutralisanju proizvedenog singlet kiseonika pri visokom intenzitetu svetlosti. Kao pomoćni pigmenti, karotenoidi su u bliskoj vezi sa ekscitiranim hlorofilom i imaju ulogu u preuzimaju viška energije koju otpuštaju kao toplotu. Uklanjanje singlet kiseonika nastalog u procesu fotosinteze smatra se najbitnijom antioksidativnom ulogom karotenoida, s obzirom na destruktivno dejstvo ROS na ćelije (Havaux, 2014). Takođe, pokazano je da proizvodi oksidacije karotenoida (aldehidi, ketoni, laktoni) nastali pri deovanju ROS imaju ulogu u adaptivnom odgovoru kod biljaka izloženih abiotičkom stresu (Ramel i sar., 2012; Havaux, 2014).

**Fenolna jedinjenja** – predstavljaju grupu sekundarnih metabolita biljaka koji u svojoj strukturi sadrže aromatične prstenove sa jednom ili više hidroksilnih grupa (Soares i sar., 2019; Shah i sar., 2020). Fenolna jedinjenja obuhvataju širok spektar metabolita, počevši od prostih fenola do visoko polimerizovanih jedinjenja poput fenolnih kiselina i flavonoida. U biljnim tkivima fenolna jedinjenja se obično nalaze u formi glikozida ili estara, a retko kao slobodna jedinjenja. Flavonoidi predstavljaju najzastupljeniju grupu fenolnih jedinjenja u biljkama i obuhvataju veliki broj potklasa



poput flavonola, flavona, flavana, antocijanidina, izoflavona i mnogih drugih (Soares i sar., 2019; Shah i sar., 2020). Za mnoga flavonoidna jedinjenja je pokazano da poseduju širok spektar bioloških aktivnosti kao što su antioksidativna, antibakterijska, antifungalna, antikancerogena i antiinflamatorna svojstva (Dai i Mumper, 2010; Lima i sar., 2016; Karatoprak i sar., 2019). Pored toga, ova jedinjenja su odgovorna za boju cvetova, plodova i semena, a jedna od značajnih uloga fenolnih jedinjenja je i povećanje tolerancije biljaka prema UV-B zračenju (Dias i sar., 2020). Antioksidativna aktivnost flavonoidnih jedinjenja ogleda se u njihovoj sposobnosti da „hvataju“ slobodne radikale, da doniraju elektrone ili protone, ili da vezuju metale koji učestvuju u produkciji ROS. Vezivanjem metala flavonoidna jedinjenja mogu da spreče Fentonovu reakciju, kojom nastaju najreaktivnije forme kiseonika. Takođe, flavonoidi mogu biti supstrat za aktivnost peroksidaza, naročito u vakuolama gde učestvuju u peroksidaze-flavonoid-askorbat ciklusu. Naime, vakuolarne peroksidaze ispoljavaju nizak afinitet prema askorbatu pa stoga oksiduju flavonoide koji se dalje regenerišu oksidacijom askorbata (Gill i Tuteja, 2010). Pretpostavlja se da flavonoidi mogu sinergistički delovati sa kompleksima koji neutrališu singlet kiseonik u hloroplastima, poput karotenoida (Agati i sar., 2007). Dalje, flavonoidi mogu reagovati sa polarnim regionima fosfolipida u membrani i na taj način sprečiti narušavanje stabilnosti i integriteta aktivnošću ROS (Erlejan i sar., 2004). Od strukture flavonoida zavisi i njihova zaštitna aktivnost, a ovaj odnos između strukture i funkcije je označen kao SAR (eng. *Structure-Activity Relationship*) (Sarian i sar., 2017).

### 1.3.3.2. Enzimske komponente antioksidativne zaštite od stresa izazvanog sušom

**Antioksidativni enzimi** – su pored neenzimatskih antioksidanasa (prolin, karotenoidi, fenolna jedinjenja i mnogi drugi), odgovorni za uklanjanje ROS i detoksifikaciju biljnih tkiva u stresnim uslovima. Superoksid-dismutaze, peroksidaze (POX), askorbat peroksidaze, katalaze, dehidroaskorbat reduktaze (DHAR), monodehidroaskorbat reduktaze (MDHAR) i glutation reduktaze (GR) predstavljaju glavne klase enzimatskih antioksidanasa (Dvorak i sar., 2020). Unutarćelijska lokalizacija navedenih enzima prikazana je na **Slici 10**.

Superoksid-dismutaza katalizuje reakciju prevođenja  $O_2^{\cdot -}$  do  $H_2O_2$  u hloroplastima, peroksizomima, citoplazmi i mitohondrijama (Noctor i sar., 2018). Na osnovu prisustva metala kao kofaktora i mesta aktivnosti, u živim organizmima su detektovane četiri SOD izoforme i to: Fe-SOD, Mn-SOD, Cu/Zn-SOD i Ni-SOD (izoforma Ni-SOD nije pronađena u višim biljkama). U genomu *A. thaliana* identifikovana su tri gena za Fe-SOD izoforme (*FSD1*, *FSD2* i *FSD3*), jedan za Mn-SOD izoformu (*MSD1*) i tri gena za Cu/Zn-SOD izoforme (*CSD1*, *CSD2* i *CSD3*) (Pilon i sar., 2011; Dvorak i sar., 2020). Fe-SOD izoforma je karakteristična za hloroplaste, ali može se naći i u peroksizomima i apoplastu (Gill i sar., 2015). Mn-SOD je karakteristična za mitohondrije, ali kod nekih biljnih vrsta njeno prisustvo je potvrđeno i u peroksizomima (Gill i sar., 2015). Cu/Zn-SOD je najzastupljenija izoforma i može se naći u hloroplastima, peroksizomima, citoplazmi i apoplastu (Gill i sar., 2015; Noctor i sar., 2018).

Katalaza razgrađuje  $H_2O_2$  do vode i kiseonika primarno u peroksizomima, ali i u citoplazmi i mitohondrijama (Sharma i Ahmad, 2014). Tri gena koji kodiraju CAT izoforme (*CAT1*, *CAT2* i *CAT3*) identifikovana su u genomu *A. thaliana* i pokazano je da su sve tri izoforme bitne za prevazilažnje negativnih uticaja fotooksidacije (Zhang i sar., 2020). Izoforma CAT2 je imala značajnu ulogu kod *A. thaliana* u odgovorima biljaka na stres teškim metalima (Corpas i Barroso, 2017), visokim temperaturama (Ono i sar., 2021), niskim temperaturama i povećanom salinitetu (Bueso i sar., 2007). Izoforma CAT3 učestvuje u odgovorima *A. thaliana* na sušu (Zou i sar., 2015), dok je CAT1 izoforma uključena u odgovore biljaka prema suši i stresu izazvanog solima (Xing i sar., 2007). Od svih antioksidativnih enzima CAT ima najveću efikasnost jer je pokazano da jedan molekul enzima može da konvertuje oko šest miliona molekula  $H_2O_2$  do vode i kiseonika u minutu. Katalaza može da katalizuje direktno prevođenje  $H_2O_2$  do vode i kiseonika ili da oksiduje supstrat

(metanol, etanol, formaldehid, acetat) ispoljavajući peroksidaznu aktivnost koja je zastupljena pri nižim koncentracijama H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u ćeliji (Sharma i Ahmad, 2014).

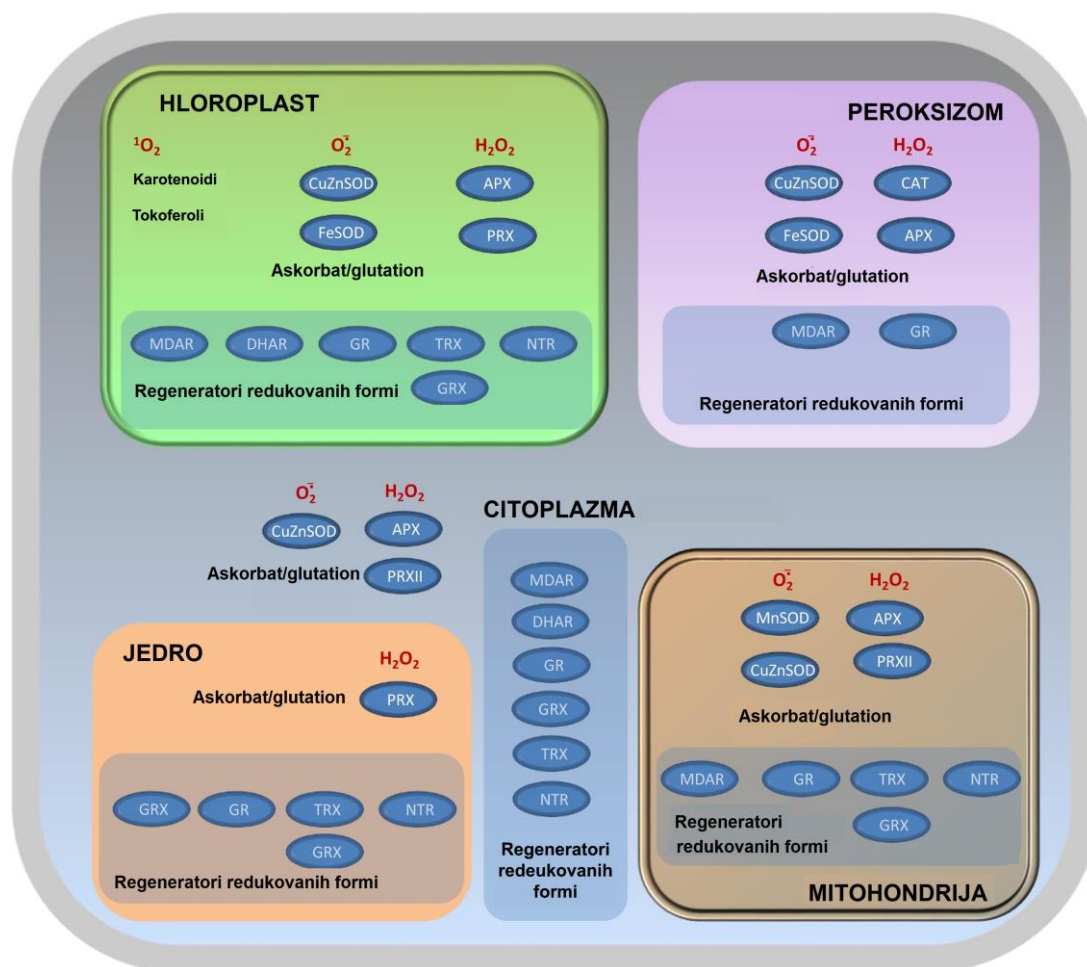
Askorbat peroksidaza, dehidroaskorbat reduktaza, monodehidroaskorbat reduktaza (MDHAR) i glutation reduktaza (GR) održavaju balans H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u ćeliji preko askorbat-glutationskog ciklusa (Noctor i sar., 2018; Kapoor i sar., 2019). Najpre APX prevodi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u H<sub>2</sub>O tako što oksiduje askorbat do monodehidroaskorbata (MDHA), a askorbat može biti regenerisan enzimom MDHAR koji koristi NAD(P)H kao kofaktor. Monodehidroaskorbat može spontano da pređe u dehidroaskorbat (DHA), a regeneracija askorbata od dehidroaskorbata se vrši uz pomoć enzima DHAR, koji oksiduje glutation (GSH) do glutation disulfida (GSSG). U poslednjem koraku, enzim GR regeneriše GSH od GSSG koristeći NAD(P)H kao kofaktor. U genomu *A. thaliana* identifikovano je devet *APX* gena od kojih produkt *APX4* gena ne razgrađuje H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a *APX7* je pseudogen (Granlund i sar., 2009; Dvorak i sar., 2020). Enzimi APX zastupljeni su u hloroplastima, peroksizomima, mitohondrijama i citoplazmi. Ukuno pet *MDHAR* gena kodira šest MDHAR enzima (Obara i sar., 2002), čija je lokalizacija potvrđena u citoplazmi, peroksizomima, mitohondrijama i hloroplastima. Tri strukturna gena kodiraju tri izoforme solubilnih, monomernih enzima DHAR, od kojih je DHAR3 izoforma lokalizovana u hloroplastima, a DHAR1 i DHAR2 u citoplazmi *A. thaliana* (Rahantaniaina i sar., 2017). Utvrđeno je da se homeostaza glutationa u ćeliji održava aktivnošću izoformi glutation reduktaze GR1 u citoplazmi i peroksizomima, i GR2 u hloroplastima i mitohondrijama (Kataya i Reumann, 2010; Marty i sar., 2019).

Pored askorbat peroksidaza bitnu ulogu u održavanju homeostaze H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, prvenstveno u hloroplastima, imaju peroksiredoksin peroksidaze – PRX (Awad i sar., 2015). Peroksiredoksin u strukturi ima dva cisteina odgovorna za detoksifikaciju H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Mehanizam aktivnosti podrazumeva oksidaciju cisteina do sumporne kiseline, redukujući H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> do vode. Dobijena sumporna kiselina se dalje u reakciji sa drugim cisteinom razlaže do vode i proizvoda sa dodatnim disulfidnim mostom. Pored H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, PRX mogu da neutrališu i alkil hidroperokside i peroksinitrit<sup>3</sup> (Dietz i sar., 2006).

Glutaredoksin (GRX) i tioredoksin (TRX) su oksidoreduktaze sa ulogom u regeneraciji odnosno oksidaciji redukovanih formi enzima, reparaciji oksidovanih proteina i detoksifikaciji hidroperoksida (Dos Santos i Rey, 2006; Delorme-Hinoux i sar., 2016). Flavoprotein tioredoksin reduktaza (NTR) sa kofaktorom NADPH katalizuje regeneraciju oksidovanog TRX.

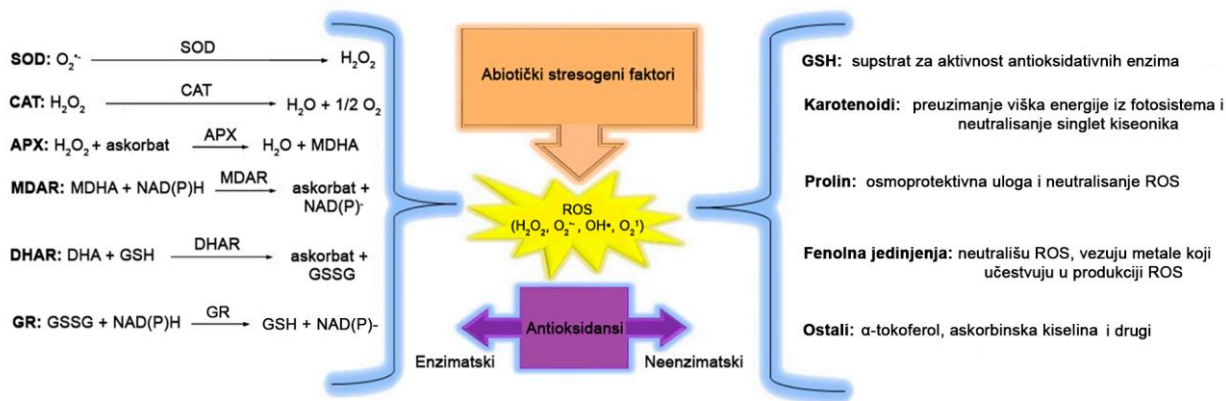
---

<sup>3</sup> Peroksinitrit – reaktivna forma azota koja nastaje u reakciji azot monoksida (NO) sa superoksid anjon radikalom i može da reaguje sa makromolekulima. Interakcijom sa nukleinskim kiselinama može da uzrokuje supstitucije azotnih baza (Staszek i Gniazdowska, 2020). Takođe, podaci ukazuju na potencijalnu ulogu peroksinitrita kao signalnog molekula u odgovorima biljaka na biotički stres (Arasimowicz-Jelonek i Floryszak-Wieczorek, 2011), i ulogu u apoptozi tokom abiotičkog stresa (Malerba i Cerana, 2018).



**Slika 10.** Unutarćelijska lokalizacija enzimatskih antioksidativnih komponenti. APX – askorbat peroksidaza, CAT – katalaza, DHAR – dehidroaskorbat reduktaza, GR – glutation reduktaza, GRX – glutaredoksin, MDAR – monodehidroaskorbat reduktaza, NTR – NADPH tioredoksin reduktaza, PRX – peroksiredoksin, SOD – superoksid-dismutaza, TRX – tioredoksin. Preuzeto i modifikovano prema Noctor i sar., 2018.

Neenzimske i enzimске komponente zaštite kontrolišu nivo ROS formi kroz sinhronizovanu interakciju prikazanu šematski na **Slici 11**. Stoga je balans aktivnosti između antioksidativnih enzima i neenzimskih antioksidanasa ključan za uklanjanje viška ROS u tkivima.

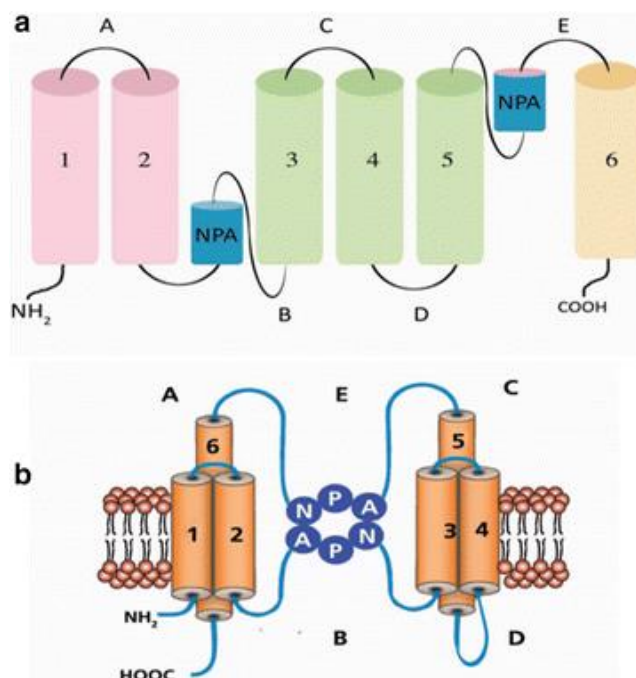


**Slika 11.** Šematski prikaz uklonjanja ROS formi enzimskim i neenzimskim antioksidativnim komponentama. Preuzeto i modifikovano prema Mahmood i sar., 2020.

### 1.3.3.3. Akvaporini – transmembranski kanali za vodu

Transport vode kroz biljke i ostale žive organizme neophodan je za normalno odvijanje svih fizioloških procesa tokom rastenja i razvića. Od otkrića strukture ćelijskih membrana dvadesetih godina prošlog veka, smatralo se da se voda kreće iz ćelije u ćeliju difuzijom. Difuzija vode kroz semipermeabilnu membranu naziva se osmoza. Voda se kreće od mesta sa višim ka mestu sa nižim vodnim potencijalom, odnosno voda se kreće po uspsostvljenom opadajućem gradijentu potencijala. Opadanje gradijenta vodnog potencijla kod biljaka nastaje zbog procesa odavanja vode putem transpiracije. Međutim, kretanje vode osmozom je i suviše sporo da bi se objasnili neki fiziološki procesi koji se inače odvijaju u relativno kratkim vremenskim intervalima, poput regulacije zatvaranja stoma kod biljaka i sekretornih procesa kod sisara. Ovakvi procesi zahtevaju brz, reverzibilan protok vode kroz ćelije, koji se ne može objasniti prostom difuzijom. Transport vode kroz ćelijske membrane preko specijalizovanih kanala prvi put je pretpostavljen polovinom 20. veka (Koefoed-Johnsen i sar., 1953), a potvrđen sedamnaest godina kasnije (Macey i sar., 1970). Kasnih 80-ih godina prošlog veka izolovan je prvi protein iz humanih eritrocita težine 28 kDa (Denker i sar., 1988), čija je ekspresija u oocitama *Xenopus laevis* povećavala permeabilitet vode kroz ćelijske membrane (Agre i sar., 1993). Prisustvo kanala za vodu kod biljaka prvi put je potvrđeno 1993. godine ekspresijom gena *AtTIP1;1* (eng. *Arabidopsis Tonoplast Intrinsic Protein*) u oocitama *Xenopus laevis* (Maurel i sar., 1993). Kanali za vodu su transmembranski proteini – akvaporini, koji pored vode mogu da transportuju i druge molekule kroz membrane biljaka, uključujući i teške metale. S obzirom na širok spektar identifikovanih AQP opisane su i njihove mnogobrojne uloge u rastenu i razviću biljaka. Između ostalog, AQP su uključeni u reakcije biljaka na abiotičke stresogene faktore i prilagođavanje transporta vode i drugih molekula u ćelijama shodno fiziološkom stanju biljke (Srivastava i sar., 2016; Zargar i sar., 2017a; Jia i sar., 2020a).

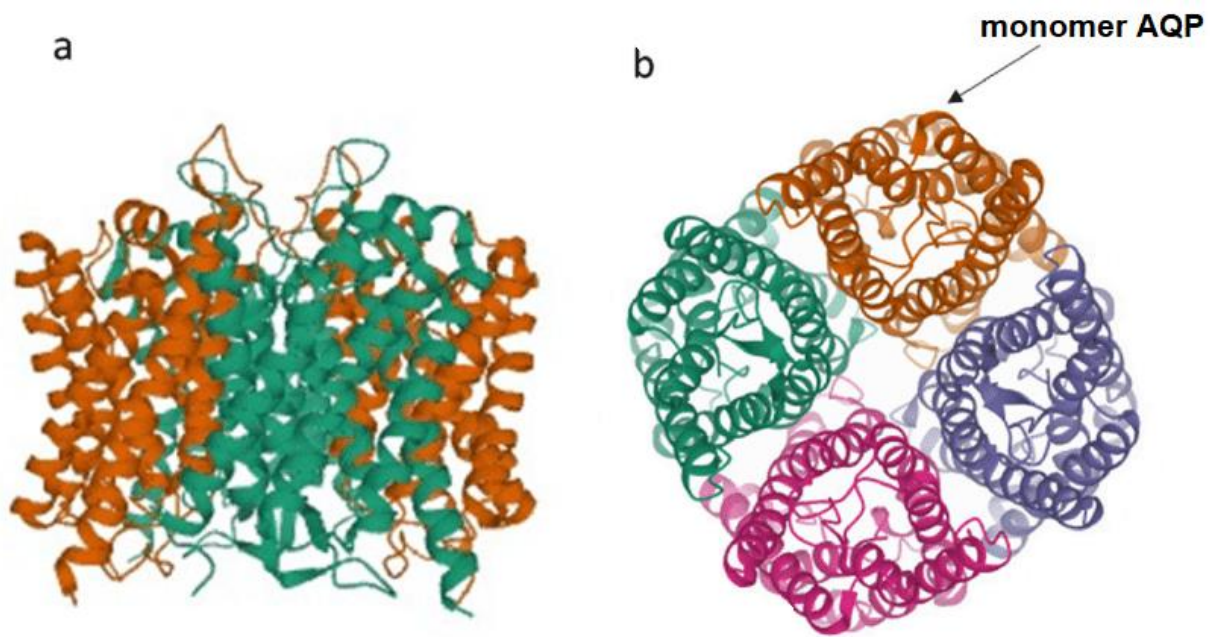
Akvaporini su članovi velike familije membranskih proteina – MIP (eng. *Major Intrinsic Proteins*) i prisutni su u svim živim organizmima izuzev termofilnih arhea i intracelularnih bakterija (Abascal i sar., 2014). Pored vode, AQP transportuju i CO<sub>2</sub>, glicerol, ureu, amonijak, metale i metaloide, O<sub>2</sub> i ROS. Molekulska masa akvaporina varira između 23-31 kDa, a svi sadrže šest transmembranskih domena, sa N i C terminalnim krajevima lokalizovanim u citoplazmi (**Slika 12**) (Kapilan i sar., 2018). Transmembranske domene ujedinjuju pet petlji (A-E), od kojih su B i D lokalizovane u citoplazmi ćelije, a A, C i E su ekstracelularne.



**Slika 12.** a) Struktura AQP sa šest transmembranskih domena (1-6) povezanih sa pet petlji (A-E) i sa N ( $\text{NH}_2$ ) i C ( $\text{COOH}$ ) terminusom u citoplazmi; b) trodimenzionalna struktura akvaporina u ćelijskoj membrani. Preuzeto iz Kapilan i sar., 2018.

Petlje B i E su hidrofobne i sadrže visoko konzervativne ponovke aminokiselina asparagin-prolin-alanin, koji predstavljaju takozvane NPA motive, smeštene naspramno na dve strane membrane (**Slika 12**). NPA ponovci zajedno sa aromatičnim/Arg (Ar/R) ponovcima formiraju poru u membrani za prolazak vode i drugih molekula i predstavljaju najvažnije delove za funkcionisanje AQP. Četiri ujedinjena AQP monomera formiraju holoprotein, čiju strukturu stabilizuju vodonične veze i interakcije između petlji pojedinačnih monomera (Murata i sar., 2000). Na **Slici 13** prikazana je struktura tetramera, na kojoj se uočava i prisustvo pete centralne pore između monomera. Pretpostavlja se da bi centralna pora mogla biti odgovorna za transport gasova i jona (Otto i sar., 2010).





**Slika 13.** Izgled AQP tetramera u ćelijskoj membrani iz različitih profila (a i b). Različitim bojama obojeni su pojedinačni monomeri za prolazak vode i drugih molekula dok je u središtu između monomera peta centralna pora. Struktura odgovora *A. thaliana* AtPIP2;4 akvaporinu (PDB 6QIM). Preuzeto iz Kurowska i sar., 2021.

U biljkama AQP su prisutni u skoro svim organima, uključujući koren, listove, izdanke, cvetove, plodove i semena. Većina AQP se nalazi na plazma membrani i tonoplastu, a pretpostavlja se da su prisutni i na membranama drugih organela. Kod viših biljkaka AQP su klasifikovani u pet podfamilija koje obuhvataju: **PIPs** (eng. *Plasma membrane Intrinsic Proteins*) – plazma membranski AQP, **TIPs** (eng. *Tonoplast Intrinsic Proteins*) – AQP prisutni na tonoplastu, **NIPs** (eng. *Noduline like Intrinsic Proteins*) – nodulinu-26 slični AQP, **SIPs** (eng. *Small basic Intrinsic Proteins*) – mali AQP i **XIPs** (eng. *X Intrinsic Proteins*) – nedovoljno okarakterisani AQP. **PIPs** predstavljaju najveću AQP podfamiliju proteina kod biljaka sa molekulskom masom od oko 30 kDa. Uglavnom su lokalizovani na membranama ćelija koje su u satavu organa poput korena, stabla i listova, kod kojih se odigrava intezivno kretanje vode (usvajanje, transport i odavanje vode). Takođe, knali za vodu su identifikovani na membrani stoma. Od ukupno 35 identifikovanih AQP gena u genomu *A. thaliana*, 13 kodira PIPs (Gupta i Sankararamakrishnan, 2009). PIPs podfamilija obuhvata dve podgrupe PIP1 i PIP2 u okviru kojih se razlikuju proteinske izoforme sa različitom lokalizacijom i funkcijom u ćelijama (Afzal i sar., 2016). PIP1 podgrupa obuhvata pet izoformi, dok PIP2 sadrži osam izoformi kod *A. thaliana*, a razlike između ove dve grupe ogledaju se u dužini C i N terminalnih delova proteina (Maurel, 2007). Razlike u strukturi ujedno obezbeđuju i funkcionalne razlike, pa tako PIP1 proteine karakteriše manja propustljivost za vodu u odnosu na PIP2 (Yanefi i sar., 2015), dok neki od PIP1 proteina za svoje funkcionisanje zahtevaju formiranje heterotetramera sa PIP2 monomerima, kako bi obezbedili neometan protok vode kroz membrane (Schuurmans i sar., 2003; Vajapi i sar., 2018). Svakako, istraživanja su pokazala da su PIP1 jako bitni za transport vode kroz biljku i da narušavanje njihove funkcije vodi ka narušavanju brojnih fizioloških procesa. Članovi PIP2 podgrupe su efikasniji i smatraju se glavnim kanalima za transport vode kroz ćelijske membrane (Kaldenhoff i Fischer, 2006). Proteinske izoforme iz PIP1 i PIP2 podgrupe pored vode

mogu da transportuju glicerol, CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i boron (Hanba i sar., 2004; Maurel i sar., 2015; Yaneff i sar., 2015).

**TIPs** su najzastupljeniji na tonoplastu (Maurel i sar., 2007). Molekulska masa im se kreće od 25 do 28 kDa i podeljeni su na pet podgrupa (TIP1 – TIP5) kod *A. thaliana*, kukuruza i pirinča. Permeabilnost tonoplasta za vodu je mnogo veća zbog veće zastupljenosti AQP, u poređenju sa plazma membranom. Ove razlike su neophodne za brzo osmotsko prilagođavanje i održavanje turgora u ćelijama. Pokazano je da TIPs mogu da transportuju amonijum, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i formamid (Jahn i sar., 2004; Kurowska i sar., 2020a). TIPs proteini se takođe mogu koristiti kao vakuolarni markeri uz primenu specifičnih antitela. Na taj način pokazano je da različite izoforme imaju različite funkcije, koje uključuju između ostalog i odgovore biljaka na abiotičke stresogene faktore.

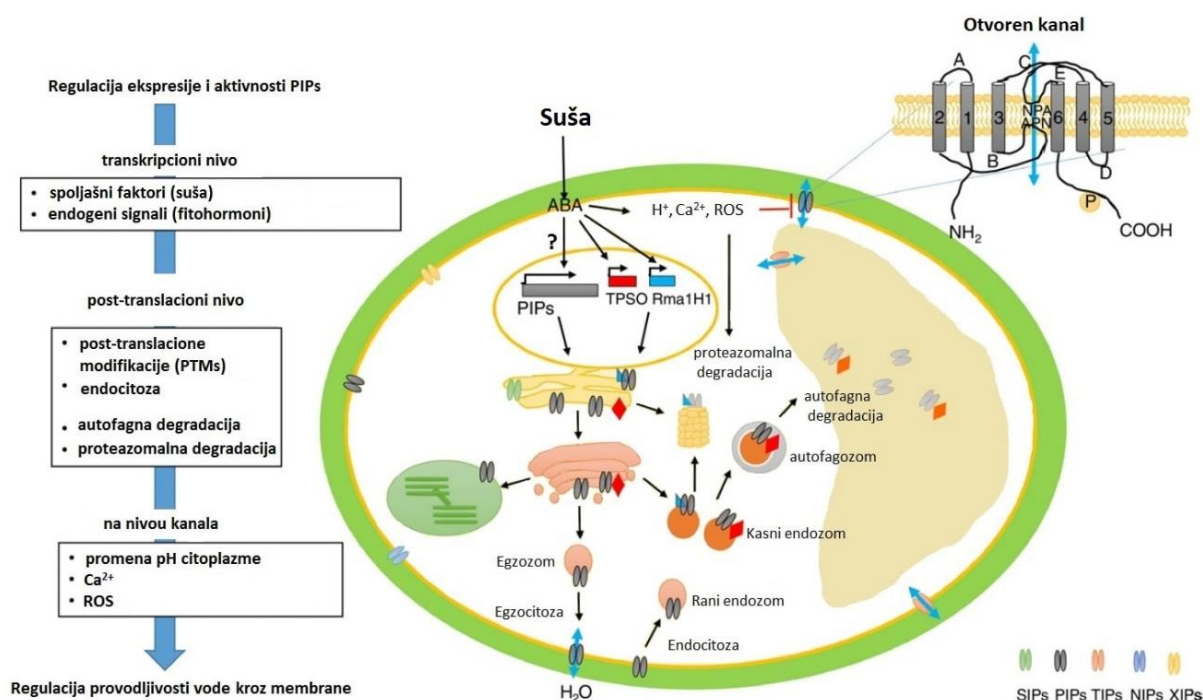
**NIPs** imaju sekvencu sličnu proteinu nodulin-26 koji se eksprimira na membrani nodula, formiranih u simbiotskom odnosu između biljaka porodice Fabaceae i azotofiksirajućih bakterija. NIPs čine oko 10% od ukupnih simbiotskih membranskih proteina i imaju bitnu ulogu u transportu vode između biljke i bakterije (Fortin i sar., 1985). NIPs su zastupljeni i na membranama drugih biljnih vrsta, a pored vode transportuju glicerol, malat, formamid i amonijak (Kaldenhoff i Fischer, 2006). Novija istraživanja potvrdila su i transport metaloida, što može biti od značaja u odgovorima biljaka na abiotičke stresogene faktore (Choi i Roberts, 2007; Briat, 2010). **SIPs** podfamilija još uvek nije strukturno i funkcionalno dobro okarakterisana. Proteini iz ove podfamilije su veoma mali, zbog skraćenog N-terminalnog regiona u poređenju sa ostalim AQP. Na osnovu NPA sekvence SIPs su podeljeni u dve grupe (SIP1 i SIP2), a različite izoforme proteina u ovim grupama rezultat su promena u aminokiselinskom sastavu NPA motiva. Izoforme mogu imati različitu propustljivost za različite supstrate (Kaldenhoff i Fischer, 2006). **XIPs** su prvi put otkriveni kod pamuka (Park i sar., 2010), a njihovo prisustvo potvrđeno je i kod drugih dikotila, mahovina, gljiva i protozoa. XIPs još uvek nisu dovoljno proučeni, ali malobrojna istraživanja pokazuju da imaju ulogu u transportu glicerola, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, metala i da je njihova ekspresija regulisana i abiotičkim stresogenim faktorima (Noronha i sar., 2016).

#### 1.3.3.4. Uloga akvaporina u toleranciji biljaka prema suši

Izlaganje biljaka suši narušava transport vode kroz ćelije što se odražava i na zastupljenost i funkciju akvaporina na membranama. Održavanje određene vrednosti vodnog potencijala u ćelijama pri stresnim uslovima poput suše, poplave, povećanog saliniteta, visokih ili niskih temperatura, patogenih infekcija, od ključnog je značaja za preživljavanje biljaka. Većina abiotičkih stresogenih faktora direktno narušava vodni status i indukuje niz adaptivnih odgovora u cilju održavanja optimalne količine vode u ćelijama. U polju biotehnologije postignuti su brojni rezultati primenom akvaporina u cilju povećanja otpornosti biljaka na stresogene faktore (Zhou i sar., 2012; Xu i sar., 2014). Akvaporini kontrolišu transport vode kroz membrane shodno fiziološkom stanju organizma i potrebama biljke (Bramley i sar., 2007). Ekspresija gena za akvaporine i aktivnost proteina regulisana je na transkripcionom, odnosno post-translacionom nivou. Hormoni ABA, giberelini, jasmonati, brasinosteroidi, kao i različiti spoljašni faktori, u najvećoj meri regulišu aktivnost gena za akvaporine na transkripcionom nivou (Liu i sar., 2013). Post-translaciona regulacija aktivnosti akvaporina uključuje fosforilaciju/defosforilaciju, ubikvitinaciju, formiranje heterotetramera, uticaj pH, temperature i različitih jona (Chaumont i sar., 2005).

Analize ekspresije gena za akvaporine ukazuju na veoma bitnu ulogu ovih proteina pri suši. Većina studija u kojima su analizirane promene u ekspresiji gena za akvaporine, ukazuju da su PIPs i TIPs podfamilije najosetljivije na stres suše. Promena i obrazac ekspresije gena za akvaporine pri suši zavisi od proučavanog genotipa, intenziteta, trajanja i frekvencije stresa. Poznato je da suša može da menja odnos između rasta korenova i stabla u korist korenova, u cilju poboljšanja apsorpcije vode, nutrijenata i održavanja homeostaze, ali i da redukuje rast korenovog sistema.

Shodno tome ekspresija određenih AQP gena u korenovima može da bude nepromenjena, povećana ili redukovana (Henry i sar., 2012; Grondin i sar., 2016; Gambetta i sar., 2017). Dinamičan obrazac ekspresije gena za akvaporine može da se uoči i u listovima s obzirom da je proces odavanja vode u atmosferu pri suši u znatnoj meri promenjen (Šurbanovski i sar., 2013; Zupin i sar., 2017; Avila i sar., 2020; Iwuala i sar., 2020). Pokazano je i da AQP interaguju sa ABA u procesu zatvaranja stoma. Naime, kod *pip2;1* nokout mutanta *A. thaliana* primećen je narušen odgovor u zatvaranju stoma (Grondin i sar., 2015). Zbog mutacije, SnRK2.6 kinaza ne prepoznaje izoformu PIP2;1, tako ne dolazi do fosforilacije i aktiviranja ovih akvaporina. Na **Slici 14** prikazan je model regulacije ekspresije i aktivnosti PIPs u uslovima suše u kome bitnu ulogu ima ABA.



**Slika 14.** Predloženi model regulacije ekspresije i aktivnosti PIPs tokom suše. Ekspresija i aktivnost PIPs tokom suše regulisana je na transkripcionom i post-translacionom nivou u cilju minimiziranja odavanja vode u atmosferu putem transpiracije. Povećana koncentracija ABA tokom suše direktno ili indirektno reguliše zastupljenost i aktivnost PIPs. ABA može da utiče na povećanje ili smanjenje ekspresije gena za PIPs, a indukuje i ekspresiju proteina TPSO (eng. *tryptophan-rich sensory protein/translocator*) i Rma1H1 (eng. *RING membrane anchor E3 ubiquitin ligase*) koji redukuju aktivnost nekoliko PIPs posredujući u autofagnoj i proteazomalnoj degradaciji. ABA utiče i na pH vrednost citoplazme i nivo signalnih molekula, Ca<sup>2+</sup> i ROS, koji mogu direktno da utiču na promenu konformacije kanala AQP. Preuzeto i modifikovano prema Zargar i sar., 2017a.



## 1.4. Elicitacija biljaka u cilju povećanja otpornosti prema stresu – klasifikacija elicitora

Elicitacija predstavlja proces primene određenih jedinjenja u cilju indukovanja signalnih puteva povezanih sa odbranom biljaka od stresogenih faktora. Elicitori su jedinjenja sa niskom molekularnom masom i prema poreklu se mogu podeliti na dve grupe: abiotičke i biotičke elicitore (Baenas i sar. 2014; Naik i Al-Khayri, 2016). Abiotički elicitori obuhvataju fizičke (visoke ili niske temperature, UV zračenje, sušu, salinitet), hemijske elicitore (teški metali,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{CuCl}_2$ , hitozan) i hormonalne elicitore (biljni regulatori rastenja poput salicilne kiseline, jasmonata (JA) i apscisinske kiseline) (Slika 15). Suprotno njima, biotički elicitori su supstance biološkog porekla i obuhvataju polisaharide iz ćelijskog zida biljaka (pektin, hitin, celuloza), različite mikroorganizme i tzv. PGPR bakterije, odnosno rizobakterije koje stimulišu rastenje biljaka (eng. *Plant Growth-Promoting Rhizobacteria*) (Chakraborty i Acharya, 2016; Naik i Al-Khayri, 2016). Obe grupe elicitora imaju mnogobrojne efekte na rastenje i razviće biljaka, indukujući adaptivne odgovore koji ublažavaju efekte stresogenog faktora.



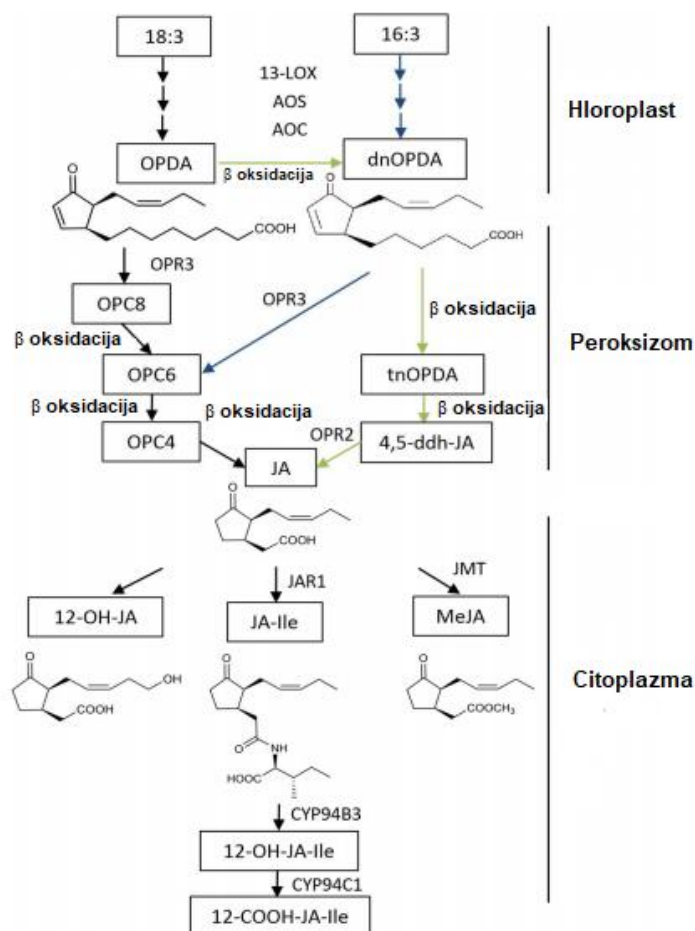
**Slika 15.** Klasifikacija abiotičkih elicitora. Modifikovano prema Naik i Al-Khayri, 2016.

Biljni hormoni (fitohormoni) su supstance organskog porekla koje se proizvode u biljkama u minimalnim količinama i imaju ulogu u usklađivanju odgovora biljaka na stimulanse iz unutrašnje i spoljašnje sredine. Biljni regulatori rastenja kao sintetički fitohormoni se u procesu prajminga najčešće primenjuju folijarno, dodavanjem u hranjivu podlogu u kulturi *in vitro*, a vrlo često se radi i prajming semena njihovim potapanjem u rastvore elicitora. Često se umesto regulatora rastenja za elicitaciju koriste ekstrakti biljaka koji sadrže aktivne supstance poput brasinolida ili zeatina za koje je pokazano da imaju hormonsko dejstvo na rast biljaka, a istovremeno imaju i protektivnu ulogu od abiotičkih stresogenih faktora (Ashraf i sar., 2016). Najčešće upotrebljavani regulatori rastenja u prajmingu biljaka s ciljem povećanja njihove otpornosti na abiotičke stresogene faktore su ABA, salicilna kiselina, JA i brasinosteroidi (Abdelaal, 2015; Alavi-Samani, 2015; Naik i Al-Khayri, 2016; Ghassemi-Golezani i Farhangi-Abri, 2018, Yang i sar., 2018). Elicitacija regulatorima rastenja indukuje fiziološke promene koje bi potencijalno doprinele efikasnijem odgovoru kod biljaka pri narednom izlaganju stresogenom faktoru. Odgovor biljaka na dejstvo stresogenog faktora je zavisna od primenjene koncentracije, načina i učestalosti primene elicitora i ispitivanog genotipa.

### 1.4.1. Biosinteza jasmonata u višim biljkama

Jasmonati (jasmonska kiselina i derivati jasmonske kiseline) predstavljaju grupu jedinjenja izvedenih iz polinezasićenih masnih kiselina sa mnogobrojnim ulogama u rastenju i razviću biljaka (Wasternack i Hause, 2013; Ruan i sar., 2019). Biosinteza JA počinje oksidacijom polinezasićenih masnih kiselina, a završava  $\beta$ -oksidacijom masnih kiselina i krajnjim modifikacijama produkata (Wasternack i Hause, 2013). Kod većine biljnih vrsta glavni prekursor u biosintezi JA je linoleinska kiselina (18:3), dok je kod nekih zastupljena i biosinteza od heksadekatrienoične kiseline (16:3) (Han, 2017). Biosinteza JA se odvija u tri ćelijska odeljka: hloroplastima, peroksizomima i

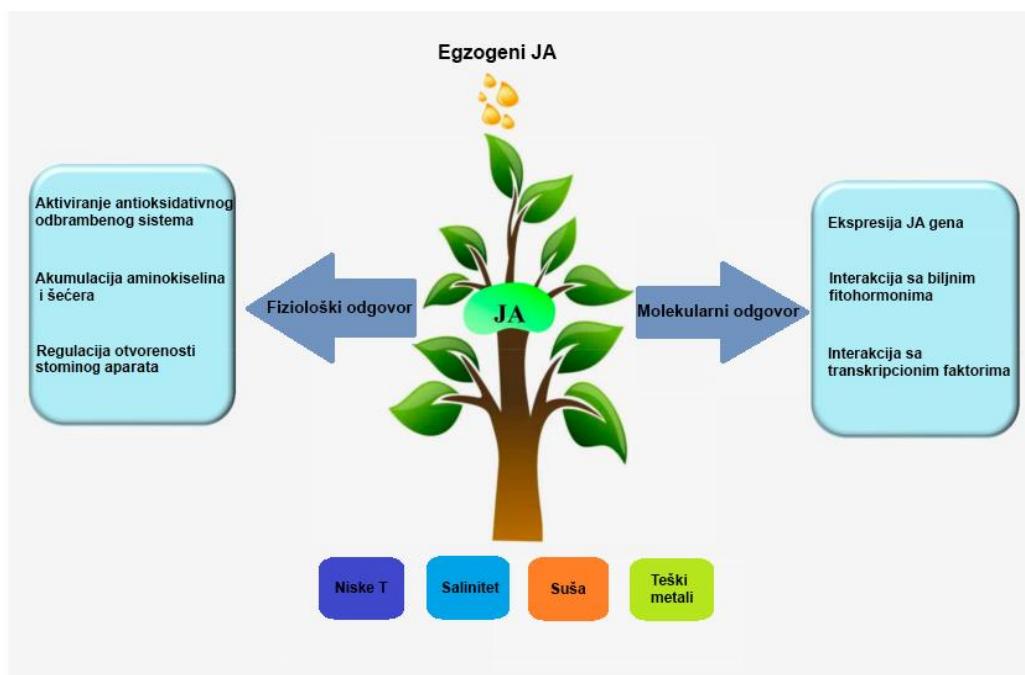
citoplazmi i zahteva aktivnost brojnih enzima (**Slika 16**) (Schaller i Stintzi, 2009; Wasternack i Hause, 2013; Ruan i sar. 2019). U hloroplastima se najpre sintetišu OPDA (12-okso-fitodienoična kiselina) ili dnOPDA (dinor-12-okso-fitodienoična kiselina) u zavisnosti od prekursora, aktivnošću enzima lipoksigenaze (LOX), alen-oksid sintaze (AOS) i alen-oksid ciklaze (AOC). Nizom reakcija  $\beta$ -oksidacija i redukcionih procesa molekula OPDA i dnOPDA, u peroksizomima se produkuje JA kiselina koja se dalje u citoplazmi metaboliše u različite derivate. Derivati JA kiseline obuhvataju 12-hidroksi jasmonsku kiselinu (12-OH-JA), metil jasmonat (Me-JA) i jasmonoil-L-izoleucin (JA-Ile), koji dodatno mogu da metabolišu do različitih krajnjih produkata.



**Slika 16.** Biosinteza JA u višim biljkama. Nazivi enzima u biosintezi: LOX – lipoksigenaza, AOS – alen oksid sintaza, AOC – alen oksid ciklaza, OPR – OPDA reduktaza, JAR1<sup>4</sup> – jasmonat sintetaza 1, JMT – jasmonat metiltransferaza. Nazivi intermedijera u biosintezi: 18:3 – linoleinska kiselina, 16:3 – heksadekatrienoična kiselina, OPDA – 12-okso-fitodienoična kiselina, dnOPDA – dinor-12-okso-fitodienoična kiselina, OPC8 – 8-(3-okso-2-(penta-2-enil)ciklopentil) oktanoična kiselina, OPC6 – 6-(3-okso-2-(penta-2-enil)ciklopentil) heksanoična kiselina, OPC4 – 4-(3-okso-2-(penta-2-enil)ciklopentil) butanoična kiselina, tnOPDA – tetra-OPDA, 4,5-ddh-JA – 4,5-didehidrojasmonat, JA – jasmonska kiselina, JA-Ile – jasmonoil-L-izoleucin i MeJA – metil jasmonat. Preuzeto i modifikovano prema Ruan i sar. 2019.

<sup>4</sup> JAR1 – enzim je dobio naziv po mutantu *jar1-1* sa narušenim odgovorom na egzogenu primenu jasmonata. Kasnije je otkriveno da *JAR1* gen kodira enzim odgovoran za konjugaciju jasmonske kiseline sa amino kiselinama (Staswick i Tiryaki, 2004).

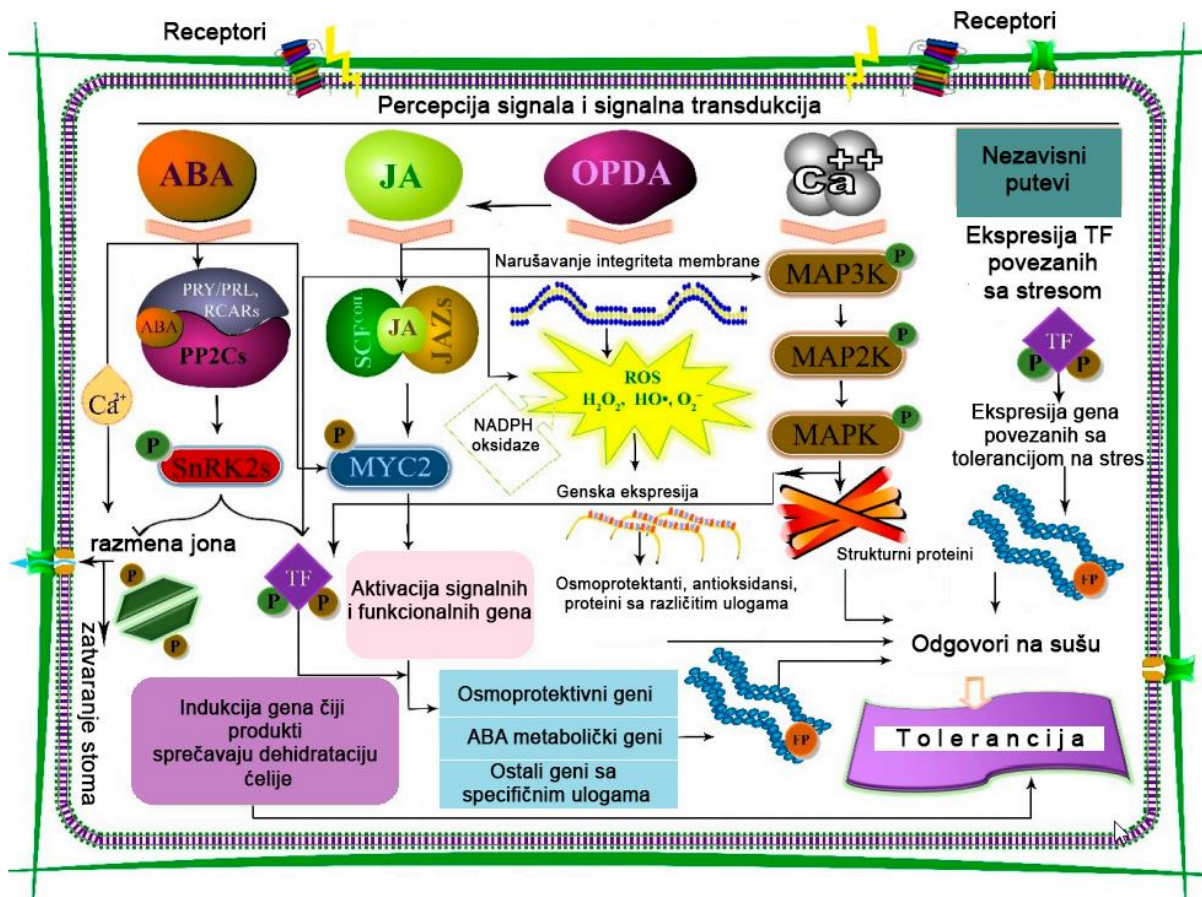
Egzogena primena JA indukuje adaptivni fiziološki odgovor biljaka na abiotičke stresogene faktore i ekspresiju brojnih gena povezanih sa stresom (**Slika 17**).



**Slika 17.** Uloga JA u odgovorima biljaka na abiotičke stresogene faktore. Prema Wang i sar., 2020.

#### 1.4.2. Interakcija jasmonata i apscisinske kiseline tokom suše

Jasmonati utiču na ekspresiju velikog broja gena odgovornih za toleranciju biljaka prema suši od kojih su mnogi pozitivno regulisani i od strane ABA. Transkripcioni faktori MYC su glavni regulatori u signalnoj transdukciji jasmonata, a na **Slici 18** prikazan je mehanizam represije/ekspresije gena indukovanih jasmonskom kiselinom od strane MYC transkripcionih faktora u interakciji signalnih puteva za ABA i JA (Mahmood i sar., 2020). Pri niskim koncentracijama JA transkripcioni faktor MYC2 vezan je za promotor JA indukovanih gena. Transkripcija ovih gena je onemogućena zbog vezivanja represora JAZs (eng. *Jasmonate ZIM domain proteins*) i korepresora NINJA (eng. *Novel Interactor of JAZ*) za MYC2 transkripcioni faktor (Ghorbel i sar., 2021). Ovim putem sprečena je ekspresija JA gena putem deacetilacije histona od strane histonskih deacetilaza HDA aktiviranih TPL enzimom (eng. *TOPLESS*). Pri višim koncentracijama JA, represor JAZ se ubikvitinuje od strane SCF kompleksa i podleže degradaciji od strane 26S proteazoma. Aktivnost represora je suprimirana, a MYC2 se vezuje za promotorska mesta na genima koji indukovani jasmonatom, i može da se aktivira njihova transkripcija. Smatra se da je mehanizam regulacije ekspresije JA indukovanih gena preko MYC transkripcionih faktora ključan u interakciji signalnih puteva za ABA i JA u uslovima suše (**Slika 19**). Signalni putevi oba fitohormona vode ka aktivaciji MYC transkripcionih faktora koji dalje aktiviraju gene čiji produkti imaju bitnu ulogu u toleranciji biljaka na stres.



**Slika 18.** Šematski prikaz interakcije JA i ABA u stomama pamuka posredstvom MYC2 transkripcionog faktora. Receptori smešteni na ćelijskoj membrani primaju stimulus i indukuju signalnu transdukciju. ABA i JA aktiviraju MYC2 transkripcioni faktor koji dalje utiču na ekspresiju mnogih gena povezanih sa tolerancijom biljaka na stres. Povećana produkcija ROS i Ca<sup>2+</sup> su takođe signali za gensku ekspresiju koja vodi ka sintezi funkcionalnih proteina (FP) uključenih u toleranciju na stres. Preuzeto i modifikovano prema Mahmood i sar., 2020.

Autori Harb i sar. (2010) sugerišu da JA u kombinaciji sa visokom koncentracijom ABA stimulišu adaptivni odgovor biljaka u ranoj fazi stresa. Koncentracija JA u ranoj fazi stresa ne mora nužno biti visoka, ali bi njeno dalje povećanje negativno uticalo na rastenje i razviće biljaka. Na primer, JA mutanti *coil* i *jnl* su veoma rezistentni na produženo dejstvo vodnog deficita i biomasa je slična biomasi *wild type* biljaka. Isti autori prepostavljaju da produženo dejstvo vodnog deficita redukuje biosintezu JA sa ciljem smanjenja njihovog inhibitornog efekta. Ovakva pretpostavka potvrđena je od strane autora de Ollas i sar. (2013). Naime, pokazano je da hibrid *Citrus paradisi* × *Poncirus trifoliata* u uslovima vodnog deficita najpre povećava koncentraciju JA koja se nakon 30h vraća na nivo kontrolnih vrednosti. Sa druge strane, akumulacija ABA se postepeno povećavala od početka merenja, sa najvećim ispoljenim vrednostima na kraju eksperimentalnog perioda (de Ollas i sar., 2013). Zanimljivo je i da tretman sa salicilhidroksaminskom kiselinom (SHAM) inhibira akumulaciju JA, ali u isto vreme i redukuje akumulaciju ABA. Ovakav ishod ukazuje da je rana akumulacija JA za vreme vodnog deficita odgovorna za dalju akumulaciju ABA. Slični rezultati prethodno su zabeleženi za pirinač (Kim i sar., 2009). Takođe, i najnovija istraživanja upotrebom inhibitora biosinteze ABA i JA kod pšenice, ukazuju da JA utiču na biosintezu ABA a samim tim i na odgovor prema suši, dok ABA nije ispoljavala uticaj na biosintezu JA (Wang i sar., 2021).

#### 1.4.2.1. Uticaj metil jasmonata kao elicitora na fiziološki odgovor biljaka tokom suše

Veliki broj publikacija ukazuje da elicitacija MeJA može da neutrališe negativne efekte suše na rastenje i razviće biljaka. Folijarna primena MeJA kod različitih biljnih vrsta uticala je na povećanje otpornosti prema suši. Kod soje folijarna primena MeJA indukovala je povećanje aktivnosti antioksidativnih enzima, koncentracije prolina i RWC (Anjum i sar. 2011b). Slični rezultati opisani su i kod *Triticum aestivum* (Anjum i sar. 2016) i jedne citrusne vrste kod koje folijarna primena MeJA utiče na povećanje koncentracije hlorofila i šećera (Xiong i sar. 2020). Povećanje aktivnosti antioksidativnog odbrambenog sistema i endogenog sadržaja ABA kod *Brassica oleracea*; Sadeghipour, 2018). Efekti jasmonata na zatvaranje stoma slični su efektima ABA, sugerišući na preklapanje signalnih puteva ova dva fitohormona u odgovorima biljaka prema suši. Naime primećeno je nakon izlaganja dehidraciji biljaka pretretiranih sa MeJA ili njegovim funkcionalnim analogom koronatinom (Wu i sar., 2012). Primena MeJA kod *Zea mays* povećavala je sadržaj polisaharida, ukupnih šećera, slobodnih aminokiselina, prolina i ukupnih proteina, kao i aktivnost enzima CAT, POX i SOD (Abdelgawad i sar., 2014). Takođe, primećeno je i povećanje koncentracije kalijuma, fosfora i azota u izdancima kukuruza. Zabeležen je uticaj folijarne primene MeJA na smanjenje provodljivosti stoma i redukciju transpiracije kod *T. aestivum* i *Vigna unguiculata* (Ma i sar. 2014b, pokazano je da mutanti *ost1-2 A. thaliana*, neosetljivi na dejstvo ABA, zatvaraju stome u prisustvu MeJA, ali su manje osetljivi na dejstvo ovog fitohormona u poredjenju sa *wild type* biljkama (Suhita i sar., 2004). Sličan odgovor zabeležen je i kod mutanata *jar1-1* neosetljivih na MeJA. Signalni putevi oba fitohormona vode ka povećanju unutarćelijskog nivoa  $Ca^{2+}$ , alkalizaciji citoplazme ćelija zatvaračica i modulaciji aktivnosti  $K^{+}$  membranskih kanala. Isti autori su pokazali da se primarno mesto dejstva u ćelijskoj membrani ABA i JA razlikuje, te da ABA utiče na aktivaciju fosfolipaza, dok MeJA utiče direktno na  $Ca^{2+}$  kanale. Inhibicijom biosinteze ABA hemijskim inhibitorom fluridonom ili kod ABA mutanata *aba2-2 A. thaliana*, uticaj JA na akumulaciju  $Ca^{2+}$  i zatvaranje stoma je suprimiran (Hossain i sar., 2011). Jasmonati takođe utiču na povećanje akumulacije NO u ćelijama zatvaračicama što je pokazano kod *Vicia faba* (Liu i sar., 2005) i *A. thaliana* (Saito i sar., 2009). Takođe, povećanje koncentracije sekundarnih metabolita poput fenolnih jedinjenja pri vodnom deficitu uz folijarnu primenu MeJA zabeleženo je kod *Lactuca sativa* (Kim i sar., 2007), *Fagopyrum esculentum* (Kim i sar., 2011), *Vitis vinifera* (Portu i sar., 2016), *Thevetia peruviana* (Mendoza i sar., 2018) i *Ipomea batatas* (Yoshida i sar., 2020).



## 2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj istraživanja ove doktorske disertacije bio je ispitivanje uticaja dehidracije uzrokovane sušom i rehidracije na:

1. Morfološki i fiziološki odgovor biljaka *I. walleriana* gajenih u uslovima *ex vitro* koji je utvrđen analizom:
  - morfoloških parametara kao što su masa svežih i suvih izdanaka kao i ukupna površina listova,
  - fizioloških parametara među kojima su endogena koncentracija apscisinske kiseline u listovima, vodni potencijal izdanaka i koncentracija fotosintetičkih pigmenata u listovima,
  - ukupnih polifenola, flavonola i antioksidativnog kapaciteta biljaka,
  - endogenih pokazatelja oksidativnog stresa u ćelijama – koncentracija vodonik peroksida i malondialdehida,
  - aktivnosti antioksidativnih enzima – superoksid-dismutaza, peroksidaza i katalaza.
2. Uspostavljanje veze između stepena dehidracije i ekspresije gena za metabolizam apscisinske kiseline i gena za akvaporine putem:
  - karakterizacije molekularne strukture kanala za vodu – akvaporina,
  - molekularno bioloških analiza – kvantifikacija ekspresije gena za anabolizam i katabolizam apscisinske kiseline i gena za akvaporine pri dehidraciji i rehidraciji.
3. Potencijalno prevazilaženje stresa putem povećanja otpornosti prema suši odnosno dehidraciji folijarnom primenom metil jasmonata kod biljaka *I. walleriana* gajenih u uslovima *ex vitro* ispitivanjem:
  - uticaja metil jasmonata na rastenje i razviće biljaka,
  - morfološkog, fiziološkog i biohemijskog odgovora biljaka na primenjene koncentracije metil jasmonata pri dehidraciji i rehidraciji,
  - odgovora biljaka na molekularnom nivou praćenom kroz promene u ekspresiji gena uključenih u metabolizam apscisinske kiseline i gena za akvaporine.

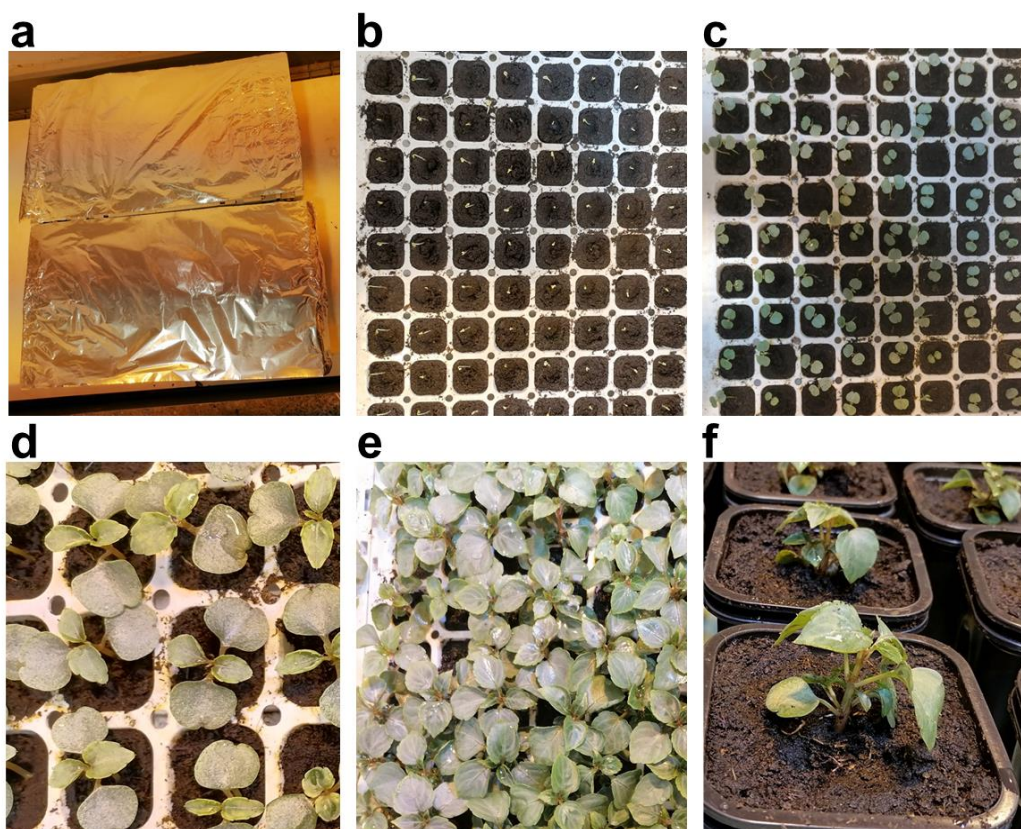
### 3. MATERIJAL I METODE

#### 3.1. Dizajn eksperimenta

Eksperimentalni deo doktorske disertacije koji obuhvata gajenje biljaka, indukovanje različitih intenziteta dehidracije i elicitaciju, sproveden je u fitokomori na Katedri za agrohemiju i fiziologiju biljaka (Univerzitet u Beogradu - Poljoprivredni fakultet). Prvi deo eksperimentalnog rada podrazumevao je indukovanje dehidracije kod biljaka primenom stresa suše i posledično definisanje osnovnih uticaja dehidracije i rehidracije na fiziološke, biohemijske i molekularne parametre rastenja i razvića *I. walleriana*. U drugom delu eksperimentalnog rada, folijarnom primenom elicitora MeJA praćen je stepen ublažavanja negativnih uticaja dehidracije na rastenje i razviće *I. walleriana*.

#### 3.2. Biljni materijal i uslovi gajenja *I. walleriana*

Kao početni materijal za eksperimentalni rad korišćena su semena *I. walleriana* varijeteta Xtreme Scarlet (Syngenta). Semena su isključavana u saću na Klasman Potgrond H supstratu maja 2018. godine za potrebe prvog dela eksperimenta i maja 2021. godine za potrebe drugog dela eksperimenta. Fizički uslovi pri isključavanju semena su zahtevali 100% relativne vlažnosti vazduha i temperaturni optimum 22-25 °C. Temperatura ispod 22 °C uzrokuje dormanciju semena, dok temperature iznad 25 °C znatno usporavaju klijanje semena. Relativna vlažnost vazduha od 100% postignuta je prekrivanjem saća aluminijumskom folijom nakon zasejavanja i navodnjavanja. Aluminijumska folija je uklonjena sa saća nakon klijanja semena tj. posle tri do pet dana. Nakon 30 dana rastenja u saću, biljke su presađene u saksije dimenzija 10 x 10 x 13 cm koje su sadržale 450 g Klasman Potgrond H supstrata. Fizički uslovi daljeg gajenja biljaka podrazumevali su temperaturu u opsegu od 22-26 °C i relativnu vlažnost vazduha u opsegu od 30-60%, fotoperiod od 16/8 h i osvetljenost od 250  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Na **Slici 19** prikazan je period od momenta zasejavanja *I. walleriana* u saća, preko rastenja i razvoja klijanaca, do presađivanja biljaka u saksije.



**Slika 19.** Rastenje *I. walleriana* u fitokomori u različitim fazama: **a)** zasejana semena u saću, **b)** 7 dana stare biljke, **c)** 14 dana stare biljke, **d)** 21 dan stare biljke, **e)** 30 dana stare biljke i **f)** presađene biljke.

### 3.2.1. Indukcija suše

Nakon 14 dana rastenja biljaka u saksijama pod optimalnim fizičkim uslovima i zalivanja, indukovana je suša. U momentu indukovanja suše, biljke su bile stare 44 dana. Biljke su podeljene u grupe prema tretmanima predstavljenim u **Tabeli 1**. Suša je indukovana tako što biljke nisu zalivane do dostizanja željenog procenta vlažnosti supstrata (15 i 5 zapreminskih %), što je dovelo do dehidracije biljaka. Oba tretmana suše uključivala su, pored prisustva kontrolne grupe, i biljke koje su postepeno rehidratirane – grupe oporavljenih biljaka. Nakon dostizanja 15%, odnosno vlažnosti supstrata od 5% biljke su podvrgnute rehidraciji (rehidracija 1 i rehidracija 2), odnosno zalivane su četiri dana do dostizanja kontrolnih vrednosti vlažnosti supstrata (35-37%). Za dalje fiziološke, biohemijske i molekularne analize uzorkovani su listovi sa biljaka u momentu indukovanja suše (početak eksperimenta), kontrolnih i biljaka izlaganih dehidraciji i rehidraciji. Ukupno je bilo sedam tretiranih grupa sa po osam biljaka po tretmanu. Biljni materijal je zamrzavan u tečnom azotu i odlagan na -80 °C do daljih analiza.



**Tabela 1.** Tretirane grupe *I. walleriana* u prvom delu eksperimenta dehidracije i rehidracije

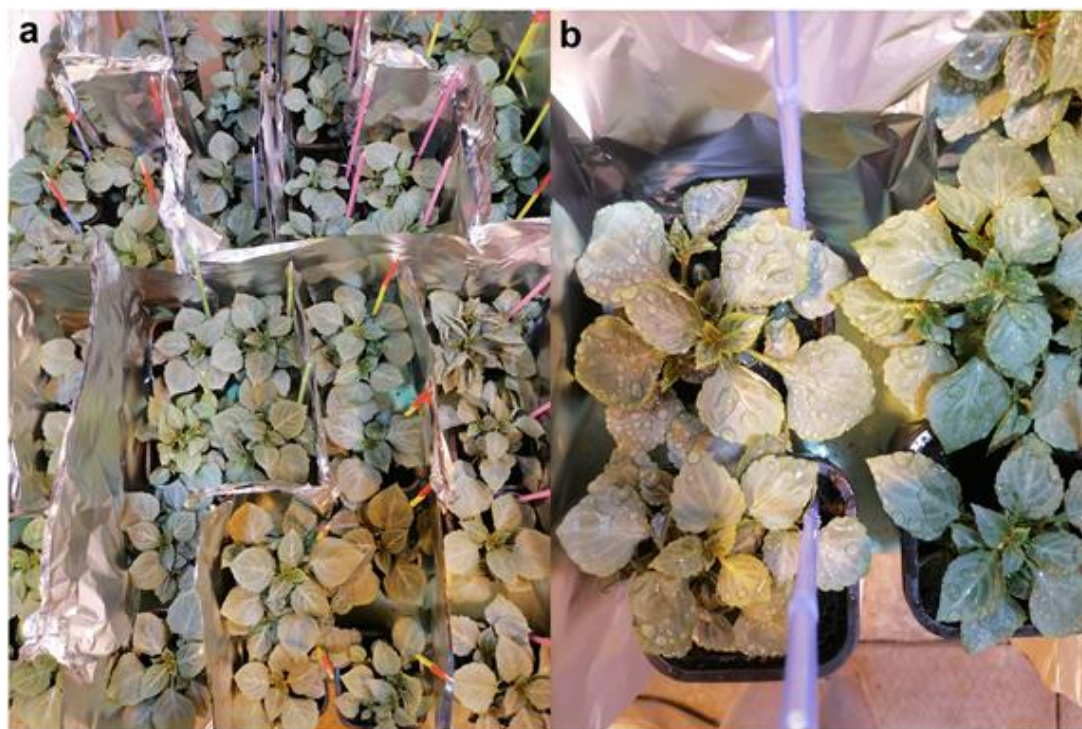
| Redni broj grupe | Tretman              | Vlažnost supstrata (%) | Broj biljaka po tretmanu |
|------------------|----------------------|------------------------|--------------------------|
| 1                | Početak eksperimenta | 35-37                  | 8                        |
| 2                | Kontrola 1           | 35-37                  | 8                        |
| 3                | Dehidracija 1        | 15                     | 8                        |
| 4                | Rehidracija 1        | 35-37                  | 8                        |
| 5                | Kontrola 2           | 35-37                  | 8                        |
| 6                | Dehidracija 2        | 5                      | 8                        |
| 7                | Rehidracija 2        | 35-37                  | 8                        |

### 3.2.2. Primena elicitora metil jasmonata pri dehidraciji i rehidraciji *I. walleriana*

Primena elicitora MeJA (*Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD*) vršena je korišćenjem dve različite koncentracije (5 i 50  $\mu\text{M}$ ) a primenjivana kako kod biljaka izlaganih suši (vlažnosti supstrata od 15 i 5%), odnosno dehidratiranih biljaka, tako i kod kontrolnih i rehidratiranih biljaka (**Tabela 2**). Radni rastvor MeJA (1 M) napravljen je rastvaranjem u 96% etanolu uz dodavanje par kapi Tween-a koji je sa svojom deterdžentnom svojstvom omogućio bolje zadržavanje, a samim tim i apsorpciju rastvora od strane lista. Dalja razblaženja radnog rastvora MeJA pravljena su sa destilovanom vodom. Elicitacija, odnosno folijarna primena rastvorima MeJA različitih koncentracija vršena je dva puta tokom eksperimentalnog rada. Prvo folijarno tretiranje vršeno je sedam dana pre indukcije suše, a drugo folijarno tretiranje na dan indukcije suše. Na dan indukcije suše biljke su bile starosti 44 dana, kao i u prvom delu eksperimenta. Na svaku biljku folijarno je primenjeno po 20 ml rastvora različitih koncentracija MeJA ili destilovane vode, u zavisnosti od tretmana. S obzirom da je etanol korišćen za rastvaranje MeJA, u destilovanu vodu je takođe dodat 96% etanol u koncentraciji koja je odgovarala višoj koncentraciji MeJA. Različite tretirane grupe biljaka razdvajane su aluminijumskom folijom, a potom folijarno tretirane različitim rastvorima elicitora (**Slika 20**).

**Tabela 2.** Tretirane grupe *I. walleriana* u drugom delu eksperimenta prilikom folijarne primene elicitora MeJA tokom dehidracije i rehidracije

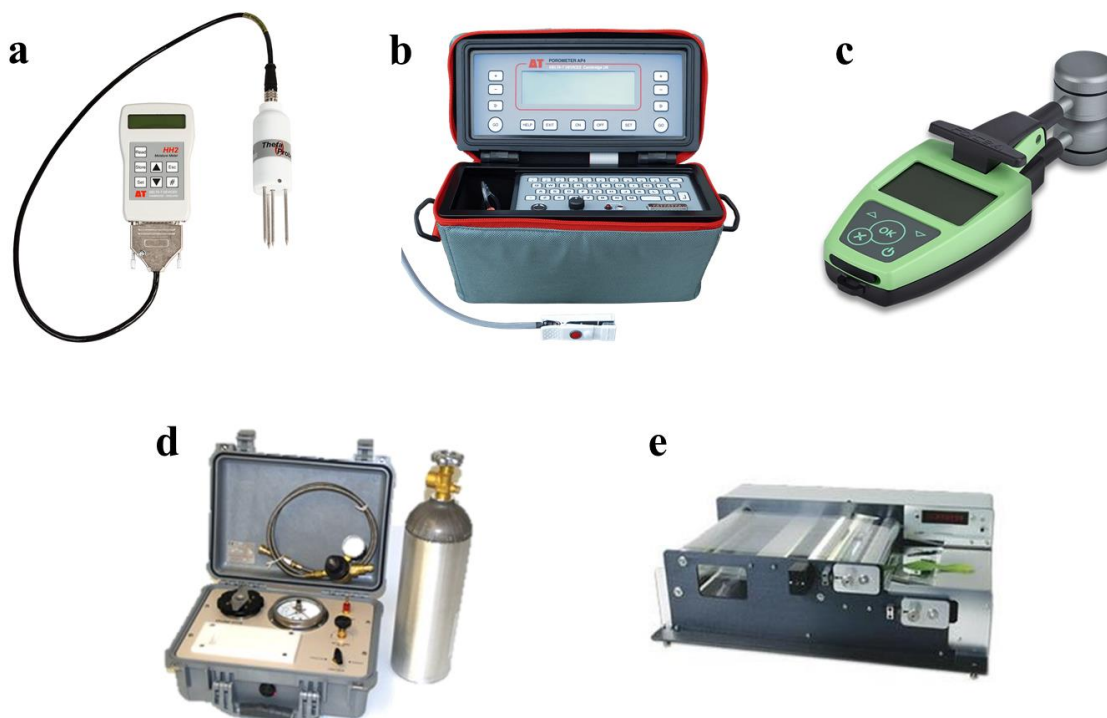
| Red. broj grupe | Tretman                           | Primena elicitora (20 ml po biljci) | Vlažnost supstrata (%) | Broj biljaka po tretmanu |
|-----------------|-----------------------------------|-------------------------------------|------------------------|--------------------------|
| 1               | Kontrola                          | destilovana voda                    | 35-37                  | 6                        |
| 2               | Kontrola + 5 $\mu$ M MeJA         | 5 $\mu$ M MeJA                      | 35-37                  | 6                        |
| 3               | Kontrola + 50 $\mu$ M MeJA        | 50 $\mu$ M MeJA                     | 35-37                  | 6                        |
| 4               | Dehidracija 15%                   | destilovana voda                    | 15                     | 6                        |
| 5               | Dehidracija 15% + 5 $\mu$ M MeJA  | 5 $\mu$ M MeJA                      | 15                     | 6                        |
| 6               | Dehidracija 15% + 50 $\mu$ M MeJA | 50 $\mu$ M MeJA                     | 15                     | 6                        |
| 7               | Rehidracija 15%                   | destilovana voda                    | 35-37                  | 6                        |
| 8               | Rehidracija 15% + 5 $\mu$ M MeJA  | 5 $\mu$ M MeJA                      | 35-37                  | 6                        |
| 9               | Rehidracija 15% + 50 $\mu$ M MeJA | 50 $\mu$ M MeJA                     | 35-37                  | 6                        |
| 10              | Kontrola                          | destilovana voda                    | 35-37                  | 6                        |
| 11              | Kontrola + 5 $\mu$ M MeJA         | 5 $\mu$ M MeJA                      | 35-37                  | 6                        |
| 12              | Kontrola + 50 $\mu$ M MeJA        | 50 $\mu$ M MeJA                     | 35-37                  | 6                        |
| 13              | Dehidracija 5%                    | destilovana voda                    | 5                      | 6                        |
| 14              | Dehidracija 5% + 5 $\mu$ M MeJA   | 5 $\mu$ M MeJA                      | 5                      | 6                        |
| 15              | Dehidracija 5% + 50 $\mu$ M MeJA  | 50 $\mu$ M MeJA                     | 5                      | 6                        |
| 16              | Rehidracija 5%                    | destilovana voda                    | 35-37                  | 6                        |
| 17              | Rehidracija 5% + 5 $\mu$ M MeJA   | 5 $\mu$ M MeJA                      | 35-37                  | 6                        |
| 18              | Rehidracija 5% + 50 $\mu$ M MeJA  | 50 $\mu$ M MeJA                     | 35-37                  | 6                        |



**Slika 20.** (a) Razdvojene tretirane grupe biljaka aluminijumskom folijom pre početka elicitacije; (b) biljke nakon elicitacije.

### 3.2.3. Merenja vršena tokom eksperimentalnog rada

Sadržaj vode u supstratu meren je korišćenjem Theta Probe (*Type ML2x, Delta-T Devices Ltd, Cambridge, UK*) svakog dana u jutarnjim časovima u isto vreme. Provodljivost stoma merena je porometrom (*AP4 Porometer, Delta T Devices, Cambridge, UK*), odmah nakon merenja sadržaja vode u supstratu. Koncentracija flavonola merena je Dualexom (*FORCE-A, Orsay, France*), optičkim senzorom koji obezbeđuje brza, jednostavna i nedestruktivna merenja na listovima (Cerović i sar., 2012). Destruktivni parametri obuhvatali su: merenje vodnog potencijala izdanaka u komori pod pritiskom (*Soil Moisture Equipment Corp., Santa Barbara, CA, USA*), merenje mase svežih izdanaka i ukupne površine svih listova po biljci (*LI-3100 AREA METER, LI.COR. inc., USA*), a naknadno i merenje mase suvih izdanaka *I. walleriana*. Masa suvih izdanaka dobijena je sušenjem biljnog materijala nekoliko dana na sobnoj temperaturi, a potom 48h na 70 °C. Na **Slici 21** prikazani su uređaji korišćeni za merenja pomenutih parametara.



**Slika 21.** Uređaji korišćeni tokom merenja: **a** – *Theta Probe*, **b** – *AP4 Porometer*, **c** – *Dualex*, **d** – *Soil Moisture Equipment*, **e** – *LI-3100 AREA METER*.

## 3.3. Analize fizioloških parametara

### 3.3.1. Određivanje endogenog sadržaja apscisinske kiseline

#### 3.3.1.1. Priprema uzoraka i standardnih rastvora apscisinske kiseline

Zamrznut biljni materijal (100 mg) homogenizovan je u tečnom azotu i prebačen u mikrotube. Pri radu, u mikrotube je dodato po 1 ml destilovane vode i 0,05 g 25% polivinilpirolidona (PVP). Nakon zagrevanja u vodenom kupatilu tokom 1 minuta mikrotube su mešane u šejkeru tokom noći,

u mraku pri temperaturi od +4 °C. Sledećeg dana, nakon centrifugiranja tokom 10 minuta na 12 000 g na temperaturi od +4 °C, odvojen je supernatant i čuvan na -20 °C do upotrebe. Supernatant se koristio koncentrovan ili razblažen za ELISA test.

Za pripremu standarda apscisinske kiseline izmereno je 4 mg ( $\pm$ ) ABA i rastvoreno u 100 ml destilovane vode. Nakon mešanja tokom 12h na 40 °C u mraku u normalnom sudu, zbog gubitaka vode isparavanjem dodato je još vode i mešano par minuta. Prebačeno je 2 ml rastvora u novi normalni sud od 100 ml i dopunjeno sa destilovanom vodom (dobijeni rastvor je koncentracije 80000 pg ( $\pm$ ) ABA/100  $\mu$ l i predstavlja negativnu kontrolu). Ostatak radnog ABA rastvora čuva se na -20 °C ili nižim temperaturama. Napravljeni su ( $\pm$ ) ABA standardni rastvori koncentracija od 8000, 4000, 2000, 1000, 500, 250 i 125 pg ( $\pm$ ) ABA/100  $\mu$ l. Ovako pripremljeni standardi rastvora mogu se čuvati u frižideru do četiri nedelje.

Kao pozitivna kontrola B<sup>+</sup> korišćena je miliQ-voda koja ima najveći intenzitet obojenja, dok je kao negativna kontrola B<sup>-</sup> korišćen ABA rastvor koncentracije 80000 pg ( $\pm$ ) ABA/100  $\mu$ l koji ima najmanji intenzitet obojenja.

### 3.3.1.2. ELISA test za određivanje koncentracije apscisinske kiseline u biljnom tkivu

ELISA (eng. *Enzyme-linked Immunosorbent Assay*) je imunohemijska metoda koja se koristi za određivanje endogenog sadržaja ABA u biljnim tkivama (Asch, 2000). Zasniva se na kompetitivnoj imunološkoj reakciji visoko specifičnog monoklalnog antitela (MAC 252) sa ABA pri kojoj ne dolazi do ukrštene reakcije između antitela sa drugim supstancama u ksilemskom soku (Quarrie i sar., 1988). Posle imunološke reakcije vrši se bojenje rastvora uz dodatak supstrata (p-nitrofenil fosfata), pri čemu se apsorbancija rastvora očitava na 405 nm korišćenjem ELISA čitača (*TECAN, SUNRISE Absorbance Reader, Männedorf, Switzerland*). Ova očitana vrednost obrnuto je proporcionalna koncentraciji ABA u ksilemskom soku koja se izračunava preko kalibracione krive dobijene sa poznatim koncentracijama standardne ( $\pm$ ) ABA.

ELISA test se sastojao iz sledećih koraka:

1. Bunarići mikrotitar ploča obloženi su sa po 200  $\mu$ l ABA-4'-BSA-konjugata sa proteinskim nosačem. Inkubacija je trajala tokom noći na 4 °C.
2. Bunarići mikrotitar ploča ispirani su 3 puta puferom za ispiranje (Tris, MgCl x 6H<sub>2</sub>O, NaCl, BSA i Tween 20 rastvoreni u H<sub>2</sub>O, pH 7,8) i zatim su sušeni upijajućim papirom. Posle trećeg ispiranja usledilo je inkubiranje mikrotitar ploča u trajanju od 20 minuta na 37 °C.
3. Nakon inkubacije u bunariće mikrotitar ploča nanešeni su standardi i uzorci sa primarnim antitelom MAC 252 prema prethodno definisanom rasporedu. Zatim je usledilo konstantno mešanje uzoraka u mikrotitar pločama u trajanju od jednog minuta, a zatim i inkubacija u trajanju od 3 h na +4 °C tokom koje dolazi do imunološke reakcije između antigena i antitela.
4. Nakon inkubacije uzoraka sa primarnim antitelom usledilo je ispiranje puferom za ispiranje (tri puta) i sušenje upijajućim papirom.
5. Nakon ispiranja u svaki uzorak dodato je po 200  $\mu$ l sekundarnog antitela "Anti-rat IgG" rastvorenog u puferu (Tris, MgCl x 6H<sub>2</sub>O i NaCl). Inkubacija tokom koje dolazi do vezivanja sekundarnog antitela za primarno antitelo odvijala se na 37 °C tokom 60 minuta.
6. Nakon inkubacije sa sekundarnim antitelom uzorci su ponovo ispirani puferom za ispiranje (pet puta) i sušeni upijajućim papirom.
7. Nakon ispiranja sekundarnog antitela u svaki uzorak je dodato po 200  $\mu$ l supstrata (20 mg p-nitrofenil fosfata rastvorenog u 20 ml NaHCO<sub>3</sub>). Zatim je usledila inkubacija na 37 °C tokom 15-35 minuta, sve dok vrednosti pozitivne kontrole nisu bile ~ 1.

8. Posle inkubacije supstrata sa sekundarnim antitelom dolazi do bojene reakcije i apsorbance uzoraka su zatim merene na 405 nm pomoću ELISA čitača.

### 3.3.1.3. Test ukrštene reakcije

Za potvrdu validnosti dobijenih vrednosti koncentracije ABA, urađen je test ukrštene reakcije. Test ukrštene reakcije se radio da bi se testiralo da li još neke komponente ekstrakta mogu reagovati sa antitelom osim antigena. Ukoliko je to slučaj, neophodno je prečistiti ekstrakt.

Pri testiranju ukrštene reakcije urađen je uobičajen ELISA test opisan u delu 3.3.1.2. Bunarići mikrotitar ploče najpre su napunjeni standardima (kolone 1-3). Zatim su sa po 50 µl svakog standarda i 50 µl destilovane vode napunjeni bunarići u kolonama 4-6 mikrotitar ploče. Na kraju su napunjeni bunarići sa 50 µl svakog standarda i 50 µl uzorka u kolonama 7-9 mikrotitar ploče. Dalje je nastavljeno uobičajeno sa ELISA testom.

### 3.3.2. Spektrofotometrijska analiza fotosintetičkih pigmenata

Za analizu fotosintetičkih pigmenata korišćeno je po 20 mg zamrznutog biljnog materijala za svaki tretman. U toku rada u mikrotube je dodato 2 ml 96% etanola. Nakon toga, mikrotube sa uzorcima i etanolom su inkubirane u vodenom kupatilu osam minuta na temperaturi od 70 °C. Očitavane su vrednosti apsorbance na tri talasne dužine: 470, 648 i 664 nm korišćenjem spektrofotometra (*Agilent 8453, Santa Clara, California, SAD*). Koncentracije hlorofila i karotenoida određivane su prema sledećim formulama (Lichtenthaler, 1987):

$C(a+b) = 5,24A_{664} + 22,24A_{648}$  – za ukupnu količinu hlorofila,

$Ca = 13,36A_{664} - 5,19A_{648}$  – za hlorofil a,

$Cb = 27,43A_{648} - 8,12A_{664}$  – za hlorofil b,

$C(x+c) = (1000A_{470} - 2,13Ca - 97,64 Cb) / 209$  – za ukupnu količinu karotenoida.

Odnos hlorofila a i b računat je po formuli  $Ca/Cb$ .

### 3.3.3. Određivanje stepena lipidne peroksidacije

Nivo lipidne peroksidacije u listovima je određivan TBARS metodom (Heath i Packer, 1968). Metoda se zasniva na određivanju količine MDA nastalog u reakciji peroksida lipida sa tiobarbituratnom kiselinom (TBA). Uzorci tkiva lista (100 mg) su homogenizovani u avanu uz upotrebu tečnog azota sa dodatkom 1 ml 0,1% trihlorosirćetne kiseline (TCA). Dobijeni homogenat je zatim centrifugiran 10 minuta na 15 000 g na +4 °C (*Sorvall Heareus Biofuge Stratos Centrifuge, Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD*). Supernatant je pomešan sa 0,5 ml 20% TCA koja sadrži 0,5% TBA. Dobijena smeša je zatim zagrevana u vodenom kupatilu 30 minuta na 95 °C, a potom je reakcija brzo zaustavljena hlađenjem uzoraka na ledu. Nakon centrifugiranja 10 minuta na 15000 g, merena je apsorbancia supernatanta u mikrotitar pločama na talasnoj dužini od 532 nm (*ELISA Micro Plate Reader LKB 5060-006, Winooski, Vermont, SAD*).

Koncentracija MDA je određivana prema formuli:

$MDA (\mu M g^{-1} FW) = [(A_{532} - A_{600}) / 155] \times 1000 \times Vol_{ekstrakt} / Vol_{aliquot} \times 1 / FW (mg)$ , gde su:

A – apsorbancia,

155 – mM ekstinkcioni koeficijent za MDA,

Vol<sub>ekstrakt</sub> – zapremina celokupnog ekstrakta,  
Vol<sub>alikhvot</sub> – zapremina ekstrakta nanetog u bunarić na mikrotitar ploči,  
FW – masa svežeg uzorka.

### 3.3.4. Određivanje koncentracije vodonik peroksida

Koncentracija H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> je merena po metodi opisanoj od strane Velikova i sar. (2000). Uzorci listova (100 mg) su homogenizovani u avanu sa 1 ml 0,1% TCA (uzorci na isti način pripremljeni kao i za analizu MDA). Homogenat je centrifugiran 15 minuta na 12 000 g na sobnoj temperaturi (*Sorvall Heareus Biofuge Stratos Centrifuge, Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD*), a zatim je u 0,2 ml supernatanta dodato 0,2 ml 10 mM kalijum fosfatnog pufera (pH 7) i 0,4 ml 1 M KI. Apsorbanca je merena na talasnoj dužini od 390 nm (*ELISA Micro Plate Reader LKB 5060–006, Winooski, Vermont, SAD*).

Koncentracija H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> je određivana prema formuli:

$$\text{H}_2\text{O}_2 (\mu\text{M g}^{-1} \text{FW}) = [(A_{390} / 0,28) ] \times 1000 \times \text{Vol}_{\text{ekstrakt}} / \text{Vol}_{\text{alikhvot}} \times 1/\text{FW} (\text{mg}), \text{ gde su:}$$

A – apsorbanca,

0,28 – mM ekstinkcioni koeficijent za H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,

Vol<sub>ekstrakt</sub> – zapremina celokupnog ekstrakta,

Vol<sub>alikhvot</sub> – zapremina ekstrakta nanetog u bunarić na mikrotitar ploči,

FW – masa svežeg uzorka.

### 3.3.5. Spektrofotometrijska kvantifikacija prolina

Najpre je vršena ekstrakcija slobodnih amino kiselina iz listova. Biljni materijal (250 mg) homogenizovan je u avanu uz dodavanje 0,5 ml metanola (HPLC čistoće). Uzorci su prebačeni u mikrotube i centrifugirani 2 minuta na 14 000 g na sobnoj temperaturi (*Sorvall Heareus Biofuge Stratos Centrifuge, Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD*). Supernatant je odličen u nove mikrotube, a avani su isprani sa 0,5 ml metanola, koji je potom korišćen za resuspendovanje preostalog taloga. Nakon mešanja na vorteksu i centrifugiranja 2 minuta na 10 000 g na sobnoj temperaturi, oba supernatanta za svaki uzorak su objedinjena i dodato im je po 1 ml hloroforma, kako bi se uklonili lipidi, a zatim po 0,75 ml vode, HPLC čistoće. Uzorci su promešani invertovanjem, a potom centrifugirani 10 minuta na 10 000 g na sobnoj temperaturi, kako bi se odvojile faze. Gornja, vodena faza je prebačena u nove mikrotube i uparena je na vakuum koncentratoru (*Eppendorf, Hamburg, Germany*). Uzorci su čuvani u zamrzivaču na -20 °C.

**Koncentracija prolina je određena** pomoću ninhidrinske reakcije u kojoj reakcija prolina sa ninhidrinom (2,2-dihydroxyindane-1,3-dione) rezultuje promenom boje rastvora u žutu (Friedman, 2004). Uzorci su rastvarani u 125 μl dejonizovane vode. Za ninhidrinsku reakciju pomešano je 20 μl uzorka sa 50 μl ninhidrinskog reagensa (35 mg ninhidrina i 10 ml etanola). Mikrotube su inkubirane 4 minuta u vodenom kupatilu (*Univeba JP Selecta*) na 100 °C, do pojave tamno plave boje. Zatim je u mikrotube dodato 930 μl etanola i nakon mešanja izmerena je apsorbanca na 350 i 570 nm (*ELISA Micro Plate Reader LKB 5060–006, Winooski, Vermont, SAD*). Merenje apsorbance rađeno je u mikrotitar pločama, tako što je u svaki bunarić nanošeno po 200 μl reakcione smeše i vrednosti su očitavane na spektrofotometru (*ELISA Micro Plate Reader LKB 5060–006, Winooski, Vermont, SAD*). S obzirom na to da mnoge druge supstance apsorbuju na 350 nm kao i smeša prolina i ninhidrina, paralelno se određivala apsorbanca svih uzoraka bez ninhidrina. Za reakciju bez ninhidrina pomešano je 20 μl uzorka sa 50 μl etanola i dalje je rađeno po istom principu kao i za

reakciju sa ninhidrinom. Koncentracija prolina je izražena u  $\mu\text{M}$  po gramu mase svežih uzoraka, a određena je iz standardnih kriva dobijenih na osnovu napravljenih poznatih rastvora prolina i glicina (0, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000, 5000, 10 000, 15 000 i 20 000  $\mu\text{M}$ ). Koncentracija prolina određivana je prema formuli:

**Koncentracija prolina = ((koncentracija sa ninhidrinom – koncentracija bez ninhidrina)/X) x (Vol<sub>ekstrakt</sub> /Vol<sub>aliquot</sub>) \* 1/FW (mg),** gde su:

X – vrednost izračunata iz standardne krive za prolin,

Vol<sub>ekstrakt</sub> – zapremina celokupnog ekstrakta,

Vol<sub>aliquot</sub> – zapremina ekstrakta nanetog u bunarić na mikrotitar ploči,

FW – masa svežeg uzorka.

### 3.3.6. Spektrofotometrijska kvantifikacija ukupnih polifenola prema Folin–Ciocalteu metodi

Folin–Ciocalteu test (FC test) služi za određivanje koncentracije ukupnih polifenola u biljnom materijalu (Singleton i sar., 1999). Metoda se zasniva na činjenici da polifenoli u biljnom ekstraktu reaguju sa Folin–Ciocalteu reagensom (redoks reagens, smeša fosfolframove kiseline i fosfomolibdenske kiseline), pri čemu formiraju plavo obojeni kompleks koji se spektrofotometrijski može kvantifikovati.

Za dobijanje etanolnog ekstrakta u FC testu korišćeno je 200 mg biljnog materijala koji je spraošen u tečnom azotu uz dodavanje 2 ml 96% etanola. Posle homogenizacije uzorci su prebačeni u mikrotube i inkubirani na sobnoj temperaturi. Posle 60 minuta inkubacije uzorci su centrifugirani 15 minuta na 12 000 g na sobnoj temperaturi (*Sorvall Heareus Biofuge Stratos Centrifuge, Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD*), a supernatant je korišćen u daljim analizama. Za pravljenje radnog rastvora Folin–Ciocalteu reagensa (FC) reciprocitet FC reagensa i destilovane vode bio je 1:2 (v:v). Reakciona smeša sadržala je 300  $\mu\text{l}$  radnog FC reagensa i 1340  $\mu\text{l}$  dejonizovane vode, a potom i 60  $\mu\text{l}$  uzorka. Nakon inkubacije od 5 minuta na sobnoj temperaturi, uz povremeno mešanje, dodato je 300  $\mu\text{l}$  20%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Inkubacija uzoraka trajala je 90 minuta na sobnoj temperaturi u mraku. Apsorbanca uzoraka je merena na 765 nm korišćenjem spektrofotometra (*Agilent 8453, Santa Clara, California, SAD*). Slepa proba je pripremljena kao smeša u kojoj je umesto uzorka korišćen 96% etanol. Galna kiselina (GA) je korišćena kao standard, a količina polifenola izražavana je u mmol GA ekvivalenta/g ekstrakta.

### 3.3.7. Spektrofotometrijska kvantifikacija antioksidativnog kapaciteta biljaka prema DPPH testu

DPPH radikal (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) je stabilan radikal sa maksimumom apsorpcije na 520 nm. Reakcijom sa antioksidansima iz biljnog materijala stabilni DPPH· radikali se transformišu u 1,1-difenil-2-(2,4,6-trinitrofenil)-hidrazin. Priprema uzoraka za DPPH test je identična pripremi uzoraka za FC test, opisanoj u poglavlju 3.3.6.

DPPH rastvor napravljen je rastvaranjem 4,5 mg DPPH u 45 ml metanola, pa je nakon toga izmerena apsorbanca rastvora na 520 nm (*Agilent 8453, Santa Clara, California, SAD*). Apsorbanca rastvora treba da bude <1. Reakciona smeša za DPPH metodu sadržala je 400  $\mu\text{l}$  DPPH reagensa, 100  $\mu\text{l}$  uzorka i 500  $\mu\text{l}$  metanola. Reakciona smeša je inkubirana 60 minuta na sobnoj temperaturi, u mraku. Stepenn redukciije DPPH· radikala je određen merenjem apsorbanca na 520 nm. Kao slepa proba korišćena je smeša 400  $\mu\text{l}$  DPPH reagensa i 600  $\mu\text{l}$  metanola umesto uzorka. Stepenn redukciije DPPH radikala, odnosno antioksidativni kapacitet uzoraka računat je prema formuli:



$$(\%) = [1 - (A_1 - A_0)] \times 100 \text{ gde je:}$$

A<sub>1</sub> – apsorbanca uzorka,

A<sub>0</sub> – apsorbanca blank reakcije.

### 3.4. Biohemijske analize aktivnosti antioksidativnih enzima

#### 3.4.1. Izolacija ukupnih solubilnih proteina

Za izolaciju ukupnih solubilnih proteina korišćen je po 1 g zamrznutog biljnog materijala *I. walleriana* iz svakog tretmana. Homogenizacija uzoraka vršena je pomoću tečnog azota u avanu, uz dodavanje 1 ml ekstrakcionog pufera (50 mM Tris, 1 mM etilendiamintetrasirćetna kiselina (EDTA), 30% glicerol, 1,5% polivinilpolipirrolidon (PVPP), 10 mM ditiotreitol (DTT), 1 mM fenilmetilsulfonil fluorid (PMSF)). Uloga PVPP je vezivanje fenola i sprečavanje oksidacije proteina, DTT sprečava oksidaciju sulfhidrilnih grupa i stvaranje disulfidnih mostova u proteinima, glicerol stabilizuje enzime, helirajući agens EDTA vezuje dvovalentne jone metala neophodne za aktivnost enzima, a PMSF je inhibitor proteaza. Nakon homogenizacije uzorci su prebačeni u mikrotube i centrifugirani 10 minuta na 12 000 g na 4 °C (*Sorvall Heareus Biofuge Stratos Centrifuge, Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD*). Supernatant u kome su se nalazili rastvorljivi proteini je odvojen i čuvan na -20 °C do upotrebe.

#### 3.4.2. Određivanje koncentracije izolovanih proteina Bradfordovom metodom

Koncentracija ukupnih proteina je određena Bradfordovom metodom (Bradford, 1976). Metoda se zasniva na vezivanju boje komazi plavo G-250 (*Coomsie Brilliant Blue G-250*) za aminokiselinske ostatke hidrofobnih aminokiselina i arginina. Bradfordov reagens sadrži komazi plavo G-250, metanol ili etanol, 85% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> i vodu. Reagens je tamno crvene boje, a nakon dodavanja uzorka u zavisnosti od koncentracije proteina u uzorku, menja boju u različite nijanse plave boje. Reakciona smeša za određivanje koncentracije izolovanih proteina sadržala je 1 ml Bradfordovog reagensa i 20 µl uzorka izolovanih proteina. Očitavanje apsorbance vršeno je na spektrofotometru (*Agilent 8453, Santa Clara, California, SAD*) na talasnoj dužini od 595 nm. Kao blank korišćen je Bradfordov reagens bez uzorka. Na osnovu standardne krive napravljene sa šest poznatih koncentracija BSA rastvora (rastvor albumina goveđeg seruma) u koncentracijama od: 0; 0,25; 0,5; 1; 1,5 i 2 mg/ml, izračunata je koncentracija proteina.

#### 3.4.3. Spektrofotometrijska kvantifikacija aktivnosti solubilnih superoksid-dismutaza

Aktivnost ukupnih superoksid-dismutaza je merena po metodi Beyer-a i Fridovich-a (1987). Reakciona smeša zapremine 1 ml sadržala je: 100 mM kalijum fosfatni pufer (pH 7,8), 2 mM EDTA, 260 mM L-metionin, 1,5 mM NBT (nitro-blu-tetrazolijum), 0,04 mM riboflavin i uzorak (**Tabela 3**). Reakcija je otpočinjala izlaganjem reakcione smeše u bunarićima mikrotitar ploča sunčevoj svetlosti u trajanju od 1-2 minuta. Apсорbanca na 540 nm je potom izmerena pomoću aparata ELISA Micro Plate Reader (*LKB 5060-006, Winooski, Vermont, SAD*).



**Tabela 3.** Komponente reakcione smeše za određivanje aktivnosti SOD u biljnim tkivima.

| K-P-pufer<br>(pH=7,8) | 1 mM<br>EDTA | 3 mM<br>metionin | uzorak    | 5 mM<br>NBT | 2 mM<br>riboflavin |
|-----------------------|--------------|------------------|-----------|-------------|--------------------|
| 800                   | 50           | 50               | <b>0</b>  | 50          | 50                 |
| 795                   | 50           | 50               | <b>5</b>  | 50          | 50                 |
| 790                   | 50           | 50               | <b>10</b> | 50          | 50                 |
| 785                   | 50           | 50               | <b>15</b> | 50          | 50                 |
| 780                   | 50           | 50               | <b>20</b> | 50          | 50                 |
| 775                   | 50           | 50               | <b>25</b> | 50          | 50                 |

SOD aktivnost je određivana na osnovu kapaciteta ekstrakta da inhibira fotohemijisku redukciju NBT do formazana koji daje plavu boju. Jedna SOD jedinica je definisana kao količina enzima neophodna da inhibira 50% NBT fotoredukcije u poređenju sa reakcionom smešom bez uzorka (kontrola). SOD aktivnost izražena je u odnosu na koncentraciju ukupnih rastvorenih proteina (U/mg).

### 3.4.3.1. Razdvajanje SOD izoformi nativnom elektroforezom (*Native Page*)

Nativnom elektroforezom – *Native PAGE* (eng. *Native Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) vršeno je razdvajanje izoformi enzima na poliakrilamidnom gelu. Poliakrilamidni gel sadrži *Separating gel* i *Stracking gel* čiji je sastav prikazan u **Tabeli 4**. Elektroforeza je vršena u aparaturi za vertikalnu elektroforezu (*SE 600 Ruby, Amersham Bioscience, USA*), uz priključivanje aparata za hlađenje. Za elektroforezu korišćen je *Running pufer* (25 mM Tris sa 192 mM glicinom, pH 8,3).

**Tabela 4.** Komponente poliakrilamidnog gela za razdvajanje izoformi enzima

| <i>Separating gel</i> (7%)            | Zapremina (30 ml) |
|---------------------------------------|-------------------|
| Akrilamid (30%) x bisakrilamid (0,8%) | 7,050             |
| 1,5 M Tris (pH 8,8)                   | 8,400             |
| TEMED                                 | 0,045             |
| APS (10%)                             | 0,090             |
| H <sub>2</sub> O                      | 14,650            |
| <i>Stracking gel</i> (5%)             | Zapremina (10 ml) |
| Akrilamid (30%) x bisakrilamid (0,8%) | 1,660             |
| 1 M Tris (pH 8)                       | 1,940             |
| TEMED                                 | 0,015             |
| APS (10%)                             | 0,030             |
| H <sub>2</sub> O                      | 6,670             |

Izoforme SOD razdvajane su po metodi Beauchamp i Fridovich (1971), elektroforezom u trajanju od 5h na 200 V. Nakon elektroforeze gelovi su ispirani vodom i inkubirani 30 minuta u esej reagensima za detekciju različitih SOD izoformi:

- 100 mM kalijum fosfatni pufer, pH 7,8 korišćen kao kontrola,
- 100 mM kalijum fosfatni pufer koji je sadržao 1 mM KCN, inhibitor CuZn-SOD izoformi superoksid-dismutaze i
- 100 mM kalijum fosfatni pufer koji je sadržao 3 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, inhibitor CuZn-SOD i Fe-SOD izoformi.

Nakon inkubacije u esej reagensima gelovi su inkubirani 30 minuta u mraku, u reagensu za enzimski test koji je sadržao 250 mM EDTA, 0,098 mM NBT, 0,03 M riboflavin i 2 ml tetrametiletildiamina (TEMED) u kalijum fosfatnom puferu (pH 7,8). Gelovi su zatim ispirani vodom i osvetljavani svetlošću neonske lampe do pojave purpurno-ljubičaste boje. Bojenje gelova za utvrđivanje SOD aktivnosti se zasniva na NBT/riboflavin reakciji kada dolazi do formiranja formazana purpurno-ljubičaste boje. Na mestima aktivnosti SOD gel je ostajao nebojen jer SOD inhibira formiranje formazana.

#### 3.4.4. Spektrofotometrijska kvantifikacija aktivnosti solubilnih peroksidaza

Aktivnost ukupnih peroksidaza je praćena spektrofotometrijski (*Agilent 8453, Santa Clara, California*), merenjem apsorbance na 430 nm tokom 3 minuta, na svakih 20 sekundi. Reakciona smeša sadržala je 2,890 ml 0,05 M kalijum fosfatnog pufera (pH 6,5), 60  $\mu$ l 1 M pirogalola kao supstrata za enzim i 20  $\mu$ l uzorka, uz dodatak 30  $\mu$ l 1 M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> posle prvih 20 sekundi reakcije. U ovoj reakciji peroksidaza katalizuje transfer elektrona sa pirogalola na vodonik peroksid. Pirogalol se oksiduje i daje žućkasto-smeđe jedinjenje, purpurogalin, koje ima maksimum apsorpcije na 430 nm. Aktivnost peroksidaze od 1 U ima ona količina enzima koja nagradi 1  $\mu$ mol produkta za minut. Aktivnost enzima je računata prema formuli:

$Akt = (\Delta A \times V_k) / (2,47 \times V_e)$ , gde su:

$\Delta A$  – promena apsorbance u minuti,

$V_k$  – zapremina reakcione smeše u kivetu (ml),

$V_e$  – zapremina uzorka u kivetu,

2,47 – molarni ekstinkcioni koeficijent pirogalola ( $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ).

Aktivnost POX izražena je u odnosu na koncentraciju ukupnih proteina (U/mg).

##### 3.4.4.1. Razdvajanje POX izoformi nativnom elektroforezom

Za detekciju peroksidaznih izoformi prema metodi Rothe i sar. (2002), gelovi su nakon native elektroforeze (7h, 200 V) ispirani u 100 mM citratnom puferu, pH 4. Zatim su gelovi inkubirani 30 minuta u 100 mM citratnom puferu, pH 4, koji je sadržao 114  $\mu$ l H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i 10 mM pirogalol. Reakcija između H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i pirogalola daje purpurogalin, žuto-braon boje. Nakon ove reakcije gelovi su ispirani vodom i fotografisani.

#### 3.4.5. Spektrofotometrijska kvantifikacija solubilnih katalaza

Spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti katalaze vršeno je praćenjem kinetike potrošnje H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> prema metodi opisanoj od strane autora Aebi (1984). Reakcija se očitava na talasnoj dužini od 240 nm (spektrofotometar *Agilent 8453, Santa Clara, California, SAD*), merenjem promene apsorbance  $\Delta A$  u vremenu  $\Delta t$  u toku linearnog dela krive. Potrebni reagensi za ovu reakciju su:

**Reagens 1:** 50 mM K-Na-fosfatni pufer (pH 7,0)

**Reagens 2:** rastvor H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,75 ml 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i Reagens 1 do 100 ml)

Najpre je izmerena apsorbanca smeše koja je sadržala 2 ml Reagens 1 i 1 ml Reagens 2 na talasnoj dužini od 240 nm. Apсорbanca treba da iznosi 0,85 ( $\pm$  0,02). Ukoliko apсорbanca nije u tom opsegu dodaje se više 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ili fosfatnog pufera u Reagens 2 i ponovi merenje. Dobijeni rastvor H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sa odgovarajućom apсорbancom označen je kao Reagens 3. Blank rastvor sastojao se od 2 ml reagens 1 i 1 ml Reagens 3 (bez uzorka) i meri se  $\Delta A_0$ . Reakciona smeša za merenje aktivnosti katalaza u kiveti zapremine 3 ml sadržala je 1 ml Reagens 3, 1,98 ml Reagens 1 i 20  $\mu$ l proteinskog ekstrakta. Enzimska aktivnost je računata na osnovu formule:

$Akt = ((\Delta A - \Delta A_0) \times V_k) / (0,0436 \times V_e)$ , gde su:

$\Delta A$  – promena apsorbance u minutu,

$\Delta A_0$  – promena apsorbance blank rastvora u minutu,

$V_k$  – zapremina reakcione smeše u kiveti (ml),

$V_e$  – zapremina uzorka u kiveti,

0,0436 – vrednost molarnog ekstinkcionog koeficijenta H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na 240 nm (mM<sup>-1</sup> cm<sup>1</sup>).

Aktivnot CAT izražena je u odnosu na koncentraciju ukupnih proteina (U/mg).

### 3.5. Molekularno biološke metode

#### 3.5.1. Izolacija RNK molekula iz biljnog tkiva

Pre početka izolacije RNK molekula iz biljnog tkiva izvršena je adekvatna priprema laboratorijskog posuđa. Teglice, menzure i avani su potopljeni preko noći u rastvor DEPC vode (eng. *Diethyl pyrocarbonate*) (1 ml/l ddH<sub>2</sub>O) kako bi se inaktivirale RNK-aze, enzimi koji mogu narušiti strukturu RNK molekula. Naredni dan, u teglicama su napravljeni rastvori neophodni za izolaciju RNK, dok je određeni broj teglica napunjen mikrotubama koje će se koristiti za izolaciju RNK molekula. Avani i tučkovi su zamotani u aluminijumsku foliju i zajedno sa teglicama sa rastvorima (izuzev alkoholnih rastvora) i mikrotubama, sterilisani u autoklavu (*Raypa, Barcelona, España*) 25 minuta, na temperaturi od 114 °C. Avani su potom sušeni 10h na 200 °C u sušnici (*Memmert GmbH + Co. KG, Aeussere Rittersbacher Strasse 38 D-91126 Schwabach*).

Ukupna RNK iz listova *I. walleriana* izolovana je prema modifikovanoj metodi Gašić i sar. (2004), a sama izolacija trajala je tri dana.

Ekstrakcija RNK molekula vršena je tako što je 100 mg biljnog materijala samleveno u avanu korišćenjem tečnog azota, uz dodatak 650  $\mu$ l ekstrakcionog pufera (2% cetrimonijum bromid – CTAB, 2% polivinilpirolidon – PVP, 25 mM EDTA, 100 mM TRIS-HCl (pH 8,0), 2M NaCl, 0,5 g/l spermidina) zagrejanog na 60 °C i 10  $\mu$ l proteinaze K. Proteinaza K se koristi tokom ekstrakcije RNK ili DNK sa ulogom u inaktivaciji nukleaza, digestiji proteina i spečavanju kontaminacije nukleinskih kiselina. Ekstrakt je prebačen u sterilne mikrotube na ledu. U svaki uzorak je zatim dodato po 13  $\mu$ l 2%  $\beta$ -merkaptoetanol na nakon čega su mikrotube naredna 2 minuta mešane na vorteksu. Uzorci su zatim inkubirani u vodenom kupatilu na 60 °C 15 minuta, uz povremeno mešanje. Nakon inkubacije u vodenom kupatilu, u svaku mikrotubu dodato je po 650  $\mu$ l smeše hloroform:izoamil alkohol (24:1) i mešano na vorteksu 2 minuta. Nakon centrifugiranja 10 minuta na 10 000 g i +4 °C, bezbojni supernatant u kome je izdvojena RNK prebacivan je u nove mikrotube. Postupak sa dodavanjem hloroform:izoamil alkohola i centrifugiranjem od 10 minuta ponovljen je još jednom. Supernatant u zapremini od 500  $\mu$ l odvajan je u nove mikrotube, pa je u svaku dodato po 166  $\mu$ l hladnog 7,5 M LiCl. Uzorci u mikrotubama su invertovanjem mešani nekoliko puta i ostavljeni su u frižideru (+4 °C) preko noći.

Nakon precipitacije sadržaj mikrotuba je centrifugiran 45 minuta na 12 000 g i +4 °C. Supernatant je odstranjen, a talog je ispiran sa 1 ml hladnog DEPC 70% etanola. Nakon centrifugiranja 10 minuta na 12 000 g i +4 °C, supernatant je odstranjen, a talog potom sušen na vazduhu u laminaru 5 minuta. RNK je rastvorena sa 80 µl sterilne DEPC vode, uz dodavanje 10 µl 3 M Na-acetata (pH 5,5) i 270 µl 70% DEPC etanola. Uzorci su ostavljeni preko noći na -80 °C.

Sadržaj u mikrotubama je ponovo centrifugiran 45 minuta na 12 000 g i +4 °C. Supernatant je odstranjen i u svaki uzorak dodato je po 1 ml 70% DEPC etanola. Nakon 10 minuta centrifugiranja na 12 000 g i +4 °C, supernatant je odstranjen, a talog je potom sušen 10 minuta na vazduhu u laminarnoj komori. Posle sušenja talog je resuspendovan dodavanjem 25 µl DEPC vode i ostavljen u zamrzivač na -80 °C.

### 3.5.2. Provera kvaliteta i kvantiteta izolovane RNK

Kvalitet izolovane RNK verifikovan je elektroforezom u 1,5 % agaroznom gelu u 1x TBE puferu (Tris, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 0,5 M EDTA – pH 8, etidijum bromid – 0,5 mg/l). Elektroforeza RNK se odvijala u aparatu za horizontalnu elektroforezu (*Serva, BlueMarine 100 55, Heidelberg, Germany*) pri konstantnom naponu od 74 V, a vizualizacija RNK traka posmatranjem pod UV svetlom na transiluminatoru (*UltraLum Inc, Gel Explorer, Exton, PA, SAD*). Kvalitet RNK određen je i spektrofotometrijski na Nanodropu (*NanoPhotometer<sup>®</sup> N60, IMPLEN, Munich, Germany*), prema odnosu količnika A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> koji ukazuje na kontaminaciju proteinima (za čistu RNK A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> iznosi 1,9-2,1). Takođe je očitavan i odnos A<sub>260</sub>/A<sub>230</sub> koji ukazuje na kontaminaciju organskim hemikalijama (za čistu RNK A<sub>260</sub>/A<sub>230</sub> iznosi 2-2,2). Zajedno sa kvalitetom, kvantitet izolovane RNK određen je na Nanodropu nanošenjem 1 µl izolata na merno polje.

### 3.5.3. Reverzna transkripcija RNK molekula u komplementarnu DNK

U reakciji reverzne transkripcije (RT) 1 µg ukupne RNK prvo je tretiran DNK-azom (*DNase I, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA*) u cilju eliminacije potencijalnih ostataka DNK. Ovaj tretman je vršen u reakcionoj smeši zapremine 9 µl čiji je sastav prikazan u **Tabeli 5**.

**Tabela 5.** Komponente reakcione smeše za tretman DNK-azom

| Komponenta                  | Zapremina (µl) |
|-----------------------------|----------------|
| 10 x pufer za DNK-azu       | 1,00           |
| DNK-aza (1 U/µl)            | 1,00           |
| RNK-aza inhibitor (40 U/µl) | 0,25           |
| H <sub>2</sub> O            | 6,75           |
| <b>Σ</b>                    | <b>9,00</b>    |

Tretman DNK-azom odvijao se 30 minuta na 37 °C, a potom je DNK-aza stopirana dodavanjem 1 µl EDTA (*Fermentas, Waltham, MA, SAD*) u svaku mikrotubu. Inaktivacija DNK-aze je trajala 10 minuta na 65 °C.

Reverzna transkripcija RNK u komplementarnu DNK odvijala se u zapremini od 21 µl i sadržala je komponente prikazane u **Tabeli 6**. Sve RT reakcije urađene su pomoću GeneAmp<sup>®</sup> Gold RNA PCR Reagent Kita (*Applied Biosystems, Waltham, MA, SAD*) i odvijale su se u PCR mašini (*PEQ LAB, Biotechnologie, GmbH, Berlin, Deutschland*).

**Tabela 6.** Komponente reakcione smeše za RT reakciju

| Komponenta                  | Zapremina (µl) |
|-----------------------------|----------------|
| 5x PCR pufer                | 2,00           |
| MgCl <sub>2</sub> (25 mM)   | 4,00           |
| dNTP (10 mM)                | 2,00           |
| RNK-aza inhibitor (20 U/µl) | 1,00           |
| Reverzna transkriptaza      | 1,00           |
| Nasumični heksameri         | 1,00           |
| RNK iz prethodnog koraka    | 10,00          |
| <b>Σ</b>                    | <b>21,00</b>   |

RT reakcija se odvijala u tri koraka za sve gene:

1. 25 °C, 10 minuta
2. 37 °C, 30 minuta,
3. 95 °C, 5 minuta.

### 3.5.4. Reakcija lančanog umnožavanja DNK – PCR

Dobijena jednolančana DNK (cDNK) zatim je umnožena PCR reakcijom. Svaka pojedinačna PCR reakcije odvijala se u smeši zapremine 12,5 µl (**Tabela 7**).

**Tabela 7.** Komponente reakcione smeše PCR reakcije

| Komponenta  | Zapremina (µl) |
|---|----------------|
| 10x PCR pufer (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | 1,25           |
| MgCl <sub>2</sub> (25 mM)                                     | 1              |
| dNTP (10 mM)  | 0,25           |
| Prajmer F (10 µM)   | 1              |
| Prajmer R (10 µM)   | 1              |
| Taq DNK polimeraza (5 U/µl)                                   | 0,2            |
| H <sub>2</sub> O  | 6,8            |
| cDNK  | 1              |
| <b>Σ</b>  | <b>12,5</b>    |

#### Uslovi PCR reakcije:

1. Početna denaturacija nukleinskih kiselina odvijala se na 95 °C, 10 minuta,
2. 40 ciklusa:
  - a) Denaturacija na 95 °C, 30 s,
  - b) Vezivanje prajmera na temperaturi od 60 °C, 30 s,
  - c) Ekstenzija na 72 °C, 30 s,
3. Finalna ekstenzija na 72 °C, 10 minuta.

Sve PCR reakcije su se odvijale u PCR mašini (*PEQ LAB, Biotechnologie, GmbH, Berlin, Deutschland*).

### 3.5.5. Kvantitativni PCR (qPCR) za određivanje nivoa ekspresije odabranih gena

Dobijena cDNK korišćena je u qPCR reakciji koja se odvijala u smeši zapremine 10  $\mu$ l čije su komponente prikazane u **Tabeli 8**.

**Tabela 8.** Komponente reakcione smeše qPCR reakcije

| Komponenta                     | Zapremina ( $\mu$ l) |
|--------------------------------|----------------------|
| <i>SYBR Green I</i> Master Mix | 5                    |
| Prajmer F (10 $\mu$ M)         | 0,3                  |
| Prajmer R (10 $\mu$ M)         | 0,3                  |
| H <sub>2</sub> O               | 3,4                  |
| cDNK                           | 1                    |
| $\Sigma$                       | <b>10</b>            |

*SYBR Green I* Master Mix (*Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA*) je smeša Taq DNK polimeraze, dNTP-a, fluorescentno zelene *SYBR Green* i ROX boje u odgovarajućem PCR puferu. *SYBR Green* boja se uobičajeno koristi u qPCR reakcijama i osigurava detekciju, a samim tim i kvantifikaciju DNK molekula. Primarno se vezuje za dvolančanu DNK, ali može da se koristi i za vizualizaciju jednolančanih DNK i RNK sa nižom stopom osetljivosti i preciznosti kvantifikacije. *SYBR Green* je plasiran na tržište kao zamena za etidijum bromid, potencijalni mutagen, te je stoga rad sa *SYBR Green* bezbedniji. Međutim, *SYBR Green* boja ima i svoje nedostatke jer može da detektuje i produkte koji su posledica kontaminacije ili dimerizacije prajmera. Iz tog razloga za svaku qPCR reakciju radi se analiza krive topljenja radi provere specifičnosti reakcije. Analize krivih topljenja sastavni su deo programa većine PCR sistema za analizu. ROX boja je pasivna referentna fluorescentna boja koja služi za normalizaciju varijacija između reakcija kao i grešaka u pipetiranju. ROX boja se ne vezuje za DNK i ima konstantnu fluorescenciju tokom reakcije. *SYBR Green I* Master Mix je polugotov proizvod u koji se pre same upotrebe dodaje samo uzorak i odgovarajući prajmeri što ga čini veoma jednostavnim za rad.

Prajmeri korišćeni u analizama dizajnirani su pomoću Primer-Blast programa (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>), a njihove osobine proverene putem NetPrimer programa (<http://www.premierbiosoft.com/netprimer/>). Sekvence gena za koje su dizajnirani specifični prajmeri odabrane su direktno iz sekvenciranog genoma *I. walleriana* (RNA seq) (<http://www.genomix4life.com/>). Identifikacija sekvenci omogućena je korišćenjem Trinotate koji kombinuje pretraživanje na osnovu homologije sa već poznatim sekvencama (BLAST/SwisProt), proteinskih domena (HMMER/PFAM), proteinskih signalnih domena i transmembranskih domena (signalP/tmHMM) i različite baze o anotaciji sekvenci (eggNOG/GO/Kegg). U **Tabeli 9** dat je prikaz korišćenih prajmera za odabrane gene, sa dužinom amplicona i temperaturom topljenja.

**Tabela 9.** Sekvence korišćenih prajmera u qPCR reakciji.

| Gen   | Prajmeri  | Dužina<br>amplikona (bp) | T <sub>m</sub><br>(°C) |
|---|---|--------------------------|------------------------|
| <b>Geni uključeni u biosintezu apscisinske kiseline</b> |   |                          |                        |
| <i>IwNCED4</i>  | F - 5' CCGACGTGCCTATCTTCTCC 3'<br>R - 5' CACCTCATCTCCGCCTCATC 3'      | 211                      | 60                     |
| <i>IwAAO2</i>   | F - 5' GTCTTCGCTCCAACATTTCGC 3'<br>R - 5' CCCCAACAGACTGCCTTCAT 3'     | 151                      | 60                     |
| <b>Gen uključen u katabolizam apscisinske kiseline</b>  |   |                          |                        |
| <i>IwABA8ox3</i>  | F - 5' CTACATCAGCCACAGCCTCC 3'<br>R - 5' CTCAGGACACAACACTGCCACT 3'    | 243                      | 60                     |
| <b>Geni za akvaporine</b>                               |   |                          |                        |
| <i>IwPIP1;4</i>   | F - 5' ACACTCTTCTGAAAGGCGG 3'<br>R - 5' AGACCCAGTGATCGTTCCAG 3'       | 300                      | 60                     |
| <i>IwPIP2;2</i>   | F - 5' AGCCGTTGAAGATCATGGGTTA 3'<br>R - 5' CAATCCCTCCAAATCAATACCCT 3' | 136                      | 60                     |
| <i>IwPIP2;7</i>   | F - 5' TGGGTTGCTCTGTTCTGTCA 3'<br>R - 5' GTGGTTCGTGGTGTAGTCCTTG 3'    | 136                      | 60                     |
| <i>IwTIP4;1</i>   | F - 5' GCGAGTCCACCTCCGATTAG 3'<br>R - 5' CGATGAATCCCGCAAGGTCT 3'      | 100                      | 60                     |

Radi provere ujednačenosti količine ukupne cDNK u svim uzorcima paralelno sa amplifikacijom svih gena, amplifikovan je i referentni gen za aktin (**Tabela 10**).

**Tabela 10.** Sekvence prajmera za referentni gen aktin

| Gen           | Prajmeri   | Dužina<br>amplikona (bp) | T <sub>a</sub> (°C) |
|---------------|--|--------------------------|---------------------|
| <i>IwACT1</i> | F - 5' GTGGTGGTGAAGGAGTAGCC 3'<br>R - 5' TTCAGGTGATGGTGTGAGCC 3' | 147                      | 60                  |

Specifičnost svih korišćenih prajmera potvrđena je na dva načina, gel elektroforezom RT-PCR produkata (čime se određuje veličina produkata) i analizom krive topljenja posle qPCR reakcije.

Uslovi qPCR reakcije:

1. Početna denaturacija odvijala na 95 °C, 10 minuta
2. 40 ciklusa:
  - a) Denaturacija na 95 °C, 30 s
  - b) Vezivanje prajmera 30 s na 60 °C za sve prajmere
  - c) Ekstenzija na 72 °C, 30 s
3. Finalna ekstenzija na 72 °C, 10 minuta
4. Analiza krive topljenja

Sve qPCR reakcije urađene su u mašini QuantStudio 3 Real-Time PCR System (*Applied Biosystems, Waltham, MA, SAD*) prema uputstvu proizvođača. Svi uzorci su nanošeni na ploču u triplikatu. Nivo ekspresije ciljanih gena određivan je korišćenjem  $\Delta\Delta C_t$  metode (Livak i Schmittgen, 2001). Kao endogena kontrola u svim eksperimentima, tj. gen sa konstitutivnom ekspresijom, korišćen je aktin umnožavan specifičnim prajmerima prikazanim u **Tabeli 10**. Uzorak u odnosu na koga je predstavljena promena ekspresije (kalibrator) i kome je dodeljivana vrednost 1,

predstavlja uzorak nultog merenja u prvom delu eksperimenta, odnosno kontrolni uzorak (kontrola tretirana destilovanom vodom) u drugom delu eksperimenta sa elicitacijom MeJA. Analiza krive topljenja omogućena je kontinuiranim merenjem fluorescencije tokom hlađenja reakcije na 60 °C koje je praćeno povećanjem temperature do 95 °C brzinom od 0,1 °C s<sup>-1</sup>.

Na osnovu dobijenih prosečnih Ct vrednosti triplikata uzoraka, kalibratora i endogene kontrole izračunata je razlika u ekspresiji gena pomoću formule:

$$\Delta\Delta Ct = [(Ct \text{ uzorka} - Ct \text{ ek}) - (Ct \text{ kal} - Ct \text{ ekk})], R = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Ct uzorka – prosečna Ct vrednost uzorka dobijena korišćenjem prajmera za gen od interesa,

Ct ek – prosečna Ct vrednost uzorka dobijana korišćenjem prajmera za endogenu kontrolu,

Ct kal – prosečna Ct vrednost za kalibrator dobijena korišćenjem prajmera za gen od interesa,

Ct ekk – prosečna Ct vrednost za kalibrator dobijana korišćenjem prajmera za endogenu kontrolu,

R – odnos ekspresije uzorka u odnosu na kalibrator.

### 3.5.6. Priprema standarda za analizu efikasnosti qPCR reakcija

Za analizu efikasnosti ekspresije gena u qPCR reakcijama za svaki gen napravljena je serija poznatih razblaženja cDNK (10<sup>9</sup> – 10<sup>2</sup>) koja je služila za pravljenje standardnih krivih. Standardi su pravljani tako što je cDNK umnožena u PCR reakciji korišćenjem specifičnih prajmera, izolovana sa 1,5% (w/v) agaroznog gela uz pomoć kita *GeneJet Gel Extraction Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)* prema uputstvu proizvođača. Standardne krive, koje pokazuju zavisnost Ct vrednosti od logaritma broja kopija matrice u standardnim razblaženjima, su korišćene za izračunavanje broja kopija transkripta u uzorcima. Koraci u ekstrakciji cDNK sa gela i njeno razblaživanje bili su sledeći:

- Trake koje su bile uočljive pri UV osvetljenju na gelu skalpelom su isecane i ubacivane u mikrotube u koje je dodat vezujući puffer (*Binding buffer*) u odnosu 1:1 (m:v).
- Agarozni gel sa produktima RT-PCR amplifikacije u mikrotubama inkubiran je u vodenom kupatilu 10 minuta na 56 °C do potpunog rastvaranja, uz povremeno mešanje sadržaja invertovanjem.
- Nakon inkubacije sadržaju u mikrotubama dodat je 100% izopropanol u odnosu 1:2 (v:v). Nakon vorteksovanja, sadržaj je prebačen u kolone za filtriranje dok se sav sadržaj nije prebacio, uz centrifugiranje (1 minut na 12 000 g) između svakog prebacivanja. Dobijeni filtrat je odstranjen nakon čega je dodato je 700 µL pufera za ispiranje (*Washing buffer*).
- Filtrati su odstranjeni centrifugiranjem 1 minut na 11 000 g, a mikrotube sa kolonama su ponovo centrifugirane kako bi se kompletno odstranili ostaci pufera za ispiranje iz kolona.
- Filter kolone su prebačene u nove mikrotube kojima su odsećeni poklopci. U kolone je zatim dodato 50 µL elucionog pufera i usledilo je centrifugiranje 2 minuta na 12 000 g. Dobijeni filtrati, koji su sadržali produkte RT-PCR amplifikacije iz agaroznog gela su čuvani na -20°C.

Kvantitet prečišćenih cDNK fragmenata određivan je na Nanodropu. Nakon spektrofotometrijske kvantifikacije, izračunat je broj DNK kopija u programu



<http://endmemo.com/bio/dnacopynum.php> i napravljena je serija razblaženja za sve amplifikovane gene (od  $10^9$  do  $10^2$  kopija DNK po 1  $\mu$ L). Za qPCR reakciju korišćeno je po 1  $\mu$ L standarda za svaki gen.

### 3.6. Bioinformatičke analize akvaporinskih struktura i karakteristika

Sekvence gena za AQP preuzete su iz sekvenciranog transkriptoma uzorka listova *I. walleriana* (RNAseq). Pretraga sekvenci AQP podrazumevala je pretraživanje preko PFAM (PF00230) i INTERPRO (IPR000425) pristupnih brojeva za AQP, odnosno gene. PFAM i INTERPRO predstavljaju baze podataka proteinskih familija i njihovih karakteristika koje se koriste za karakterizaciju nepoznatih proteinskih sekvenci iz drugih biljnih vrsta. Dalje, izdvojene su sekvence koje su okarakterisane kao potencijalne PIP i TIP sekvence. Program Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) korišćen je za poravnanje sekvenci AQP i konstrukciju filogenetskog stabla (eng. *Neighborhood joining tree*). Procenat sličnosti – pid (eng. *percent of identity*) sekvenci AQP predstavljen je toplotnom mapom (eng. *heat map*) korišćenjem R programskog paketa (Pagès i sar., 2020). Procenat sličnosti računat je kao:

$$100 \times (\text{identične pozicije}) / (\text{poravnate pozicije} + \text{intragenski prekidi}).$$

Softveri TMHMM Server v. 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>) i SMART program (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) korišćeni su za predikciju transmembranskih regiona (TM regioni). Molekulska masa, izoelektrična tačka proteina i indeks stabilnosti izračunati su u programu ProtParam tool (<http://web.expasy.org/protparam/>), dok je WoLF PSORT (<https://wolfsort.hgc.jp/>) korišćen za predikciju unutarćelijske lokalizacije AQP *I. walleriana*. Za analizu morfologije AQP kanala (pore) PHYRE2 program je korišćen za dobijanje 3D modela i PDB formata (eng. *Protein Data Bank*) iz aminokiselinskih sekvenci (Kelley i sar., 2015). PDB format za svaki AQP je dalje korišćen za analize karakteristika kanala, indeksa hidrofobnosti, fizičkih i hemijskih karakteristika u MOLE 2.5 softveru (Sehnal i sar., 2013). Takođe, 3D strukture dobijene u PHYRE2 programu analizirane su pomoću PROCHECK programa (Laskowski i sar., 2006), koji obezbeđuje informacije o stereohemijskim karakteristikama proteina. PROCHECK program je omogućio dobijanje Ramačandran dijagrama o stereohemijskim osobinama proteina čiji se kvalitet posmatra kroz procenat aminokiselina u favorizovanom regionu (A, B, L), dozvoljenom regionu (a, b, l, p), generički dozvoljenom regionu (~a,~b,~l,~p) i nedozvoljenom regionu. Strukture holoproteina dobijene su pomoću SWISS-MODEL softvera (<http://swissmodel.expasy.org/>) (Bertoni i sar., 2017; Bienert i sar., 2017). Proteinske sekvence AQP *I. walleriana* su analizirane, a 3D modeli holoproteina su napravljeni na bazi 30, 30, 20 i 56 filtriranih modela iz drugih biljnih vrsta, redom za IwPIP1;4, IwPIP2;2, IwPIP2;7 i IwTIP4;1.

### 3.7. Statistička obrada podataka

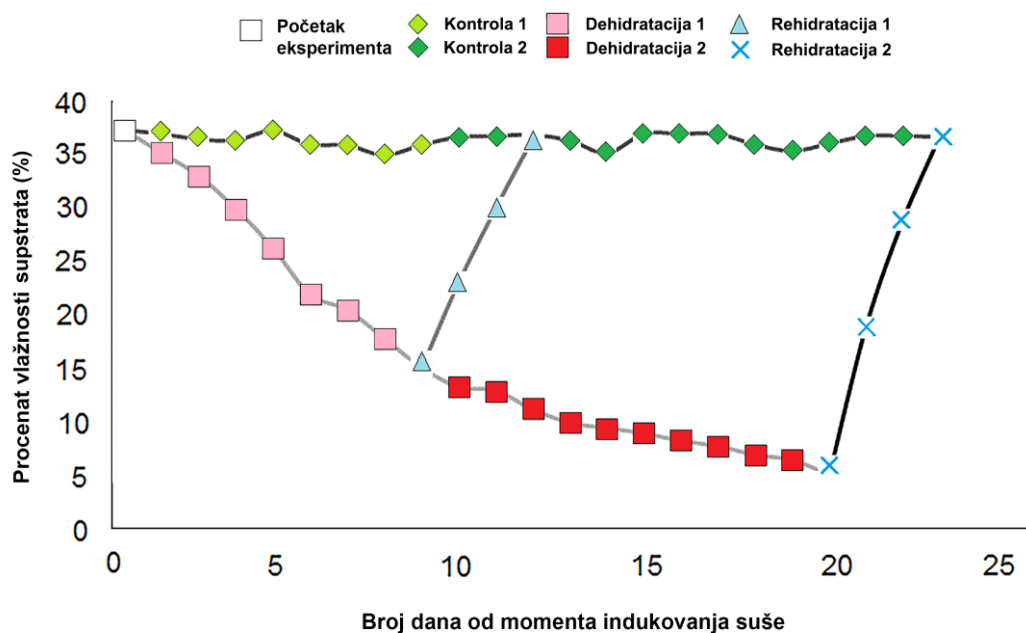
Za statističku obradu podataka korišćen je softver StatGraphics verzija 4.2 (*STSC Inc. Rockville, Maryland, USA*). Za potrebe poređenja ispitivanih tretmana urađena je analiza varijanse (ANOVA), a poređenja između srednjih vrednosti tri biološka ponavljanja (svako sa tri tehnička ponavljanja,  $n=9$ ), vršena su pomoću Fišerovog LSD *post hoc* testa sa nivoom statističke značajnosti od  $p \leq 0,05$ . Za grafičko predstavljanje rezultata korišćen je Origin program, dok je za tabelarno predstavljanje rezultata korišćen MS Word 2010. Analiza proteinskih gelova rađena je u ImageJ programu.

Vrednosti ekspresije gena iz prvog eksperimenta statistički su obrađeni u R 4.02 korišćenjem Welch t-test sa nivoom statističke značajnosti od  $p \leq 0,05$ , dok je statistička značajnost podataka za ekspresiju gena iz drugog eksperimenta određena analizom varijanse (ANOVA), a srednje vrednosti su razdvojene na osnovu Fisherovog LSD *post-hoc* testa ( $p \leq 0,05$ ).

## 4. REZULTATI

### 4.1. Promene u sadržaju vlažnosti supstrata nakon indukovanja suše

Opadanje sadržaja vode u supstratu nakon indukovanja suše prikazano je na **Grafiku 1**. Biljke starosti 44 dana bile su izlagane stresu u trajanju od 20 dana. Od momenta indukovanja suše (početak eksperimenta) kada je procenat vlažnosti supstrata iznosio 37%, bilo je neophodno devet dana za dostizanje vlažnosti supstrata od 15%, odnosno 20 dana za dostizanje vlažnosti supstrata od 5%. Rehidracija biljaka postizanjem optimalne vlažnosti supstrata (35-37%) trajala je 4 dana, a biljke su zalivane svaki dan sa po 80 ml, odnosno 100 ml vode u zavisnosti da li su biljke prethodno gajene pri vlažnosti supstrata od 15% ili 5%. Za rehidraciju, biljkama koje su bile izlagane suši pri vlažnosti supstrata od 15%, bila je potrebna manja količina vode (po 80 ml u toku 4 dana) za dostizanje optimalnog sadržaja vode u supstratu.

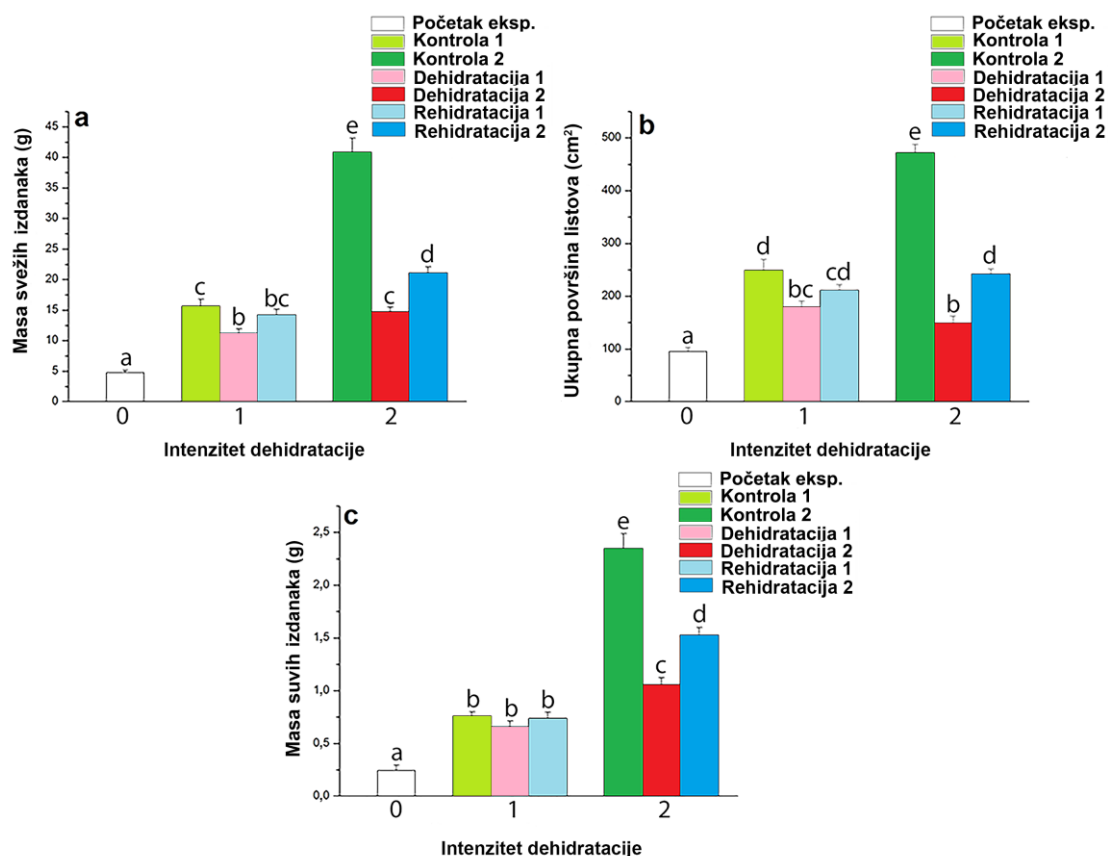


**Grafik 1.** Promene vlažnosti supstrata nakon indukovanja suše (početak eksperimenta) kod kontrolne grupe biljaka, biljaka izlaganih stresu i kod biljaka nakon oporavka. Modifikovano prema Đurić i sar. (2020).

### 4.2. Uticaj dehidracije i rehidracije na rastenje i razviće *I. walleriana*

#### 4.2.1. Uticaj dehidracije i rehidracije na morfološke parametre

Morfološki parametri analizirani u ovom eksperimentu uključuju masu svežih izdanaka, ukupnu površinu listova i masu suvih izdanaka *I. walleriana*. Na **Grafiku 2** predstavljeni su rezultati promene ispitivanih morfoloških parametara izazvanih dehidracijom određenog inteziteta, kao i promene nastale usled procesa rehidracije.



**Grafik 2.** Uticaj dehidracije i rehidracije na masu svežih izdanaka (a), ukupnu površinu listova (b) i masu suvih izdanaka (c). Brojevi na x osi označavaju različite intenzitete dehidracije uzrokovane isušivanjem supstrata do određenih zapreminskih procentualnih vrednosti: 0 – 37, 1 – 15, 2 – 5. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška. Slova ukazuju na statistički značajne razlike na osnovu Fišerovog LSD testa ( $p \leq 0,05$ ) između kontrolne grupe biljaka, biljaka izlaganih dehidraciji i biljaka koje su podvrgnute oporavku. Modifikovano prema Đurić i sar. (2020).

Na osnovu dobijenih rezultata (**Grafik 2**) uočava se da dehidracija značajno redukuje masu svežih izdanaka *I. walleriana*. Najveći efekat u odnosu na kontrolnu grupu biljaka zabeležen je u eksperimentalnim grupama biljaka kod kojih sadržaj vode u supstratu dostiže 5%. Sveža masa nadzemnog dela biljaka smanjena je za 63,91% u odnosu na kontrolnu grupu biljaka. Takođe, pri najmanjoj vlažnosti supstrata ukupna površina listova smanjena je za 215% u poređenju sa kontrolnom grupom biljaka, dok je suva masa redukovana za 54,96%. Rehidracija biljaka nakon isušivanja supstrata do 5% vlažnosti, u periodu od četiri dana, utiče na povećanje mase svežih izdanaka, ukupne površine listova i mase suvih izdanaka za 43,24, 62,87 i 44,21%, redom.

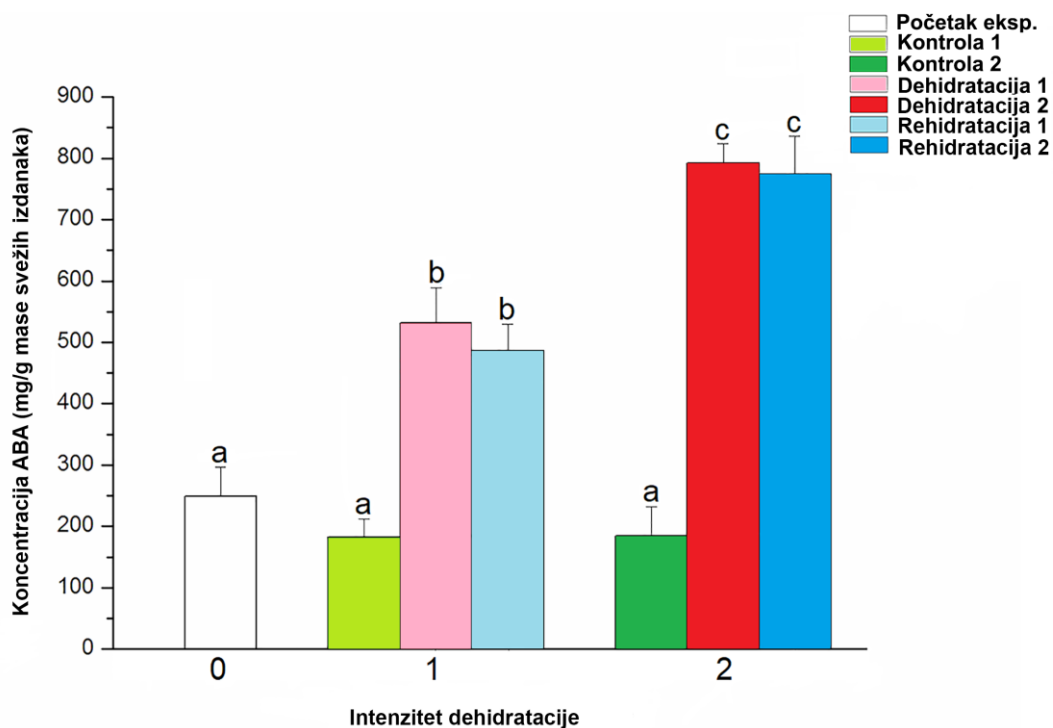
Isušivanje supstrata do 15%, odnosno 5% vlažnosti uticalo je na morfološke promene, merene kroz prethodno pomenute parametre (**Grafik 2**), a same promene su prikazane na **Slici 22**. Kontrolne grupe biljaka (**Slika 22b, e**) za oba intenziteta dehidracije (pri vlažnosti supstrata od 15 i 5%) imale su veću biomasu u poređenju sa biljkama koje su izlagane stresu. U poređenju sa kontrolnom grupom, rastenje biljaka koje su izložene stresu bilo je redukovano (**Slika 22c, f**). Takođe, biljke *I. walleriana* pri vlažnosti supstrata od 5% primetno uvijaju listove (**Slika 22f**). Rehidracija je uticala na neutralisanje uticaja dehidracije na morfološke parametre *I. walleriana* (**Slika 22d, g**). Nakon rehidracije ćelije su vratile turgidnost, listovi nisu bili uvijeni, a primećen je i veliki broj cvetnih pupoljaka.



**Slika 22.** Razlike u izgledu biljaka *I. walleriana* tokom eksperimenta dehidracije i rehidracije *ex vitro*. Biljke starosti 44 dana, na početku indukcovanja suše (a), kontrolne grupe biljaka za oba intenziteta dehidracije uzrokovanih isušivanjem supstrata do 15 i 5% vlažnosti (b i e), biljke izložene stresu isušivanjem supstrata do 15 i 5% vlažnosti (c i f) i oporavljene biljke nakon izlaganja stresu, odnosno isušivanju supstrata do 15 i 5% vlažnosti (d i g). Prema Đurić i sar. (2020).

#### 4.2.2. Uticaj dehidracije i rehidracije na koncentraciju ABA

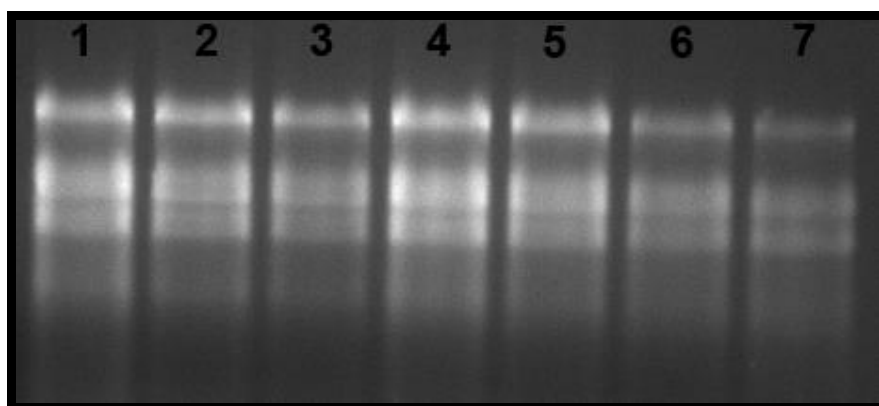
Sa porastom intenziteta dehidracije endogena koncentracija ABA u listovima *I. walleriana* se povećavala (**Grafik 3**). Biljke izlagane dehidraciji imale su znatno veću koncentraciju ABA u listovima u poređenju sa kontrolnom grupom biljaka i to 2,92 i 4,3 puta, pri 15% odnosno vlažnosti supstrata od 5%. Rehidracija nije značajno uticala na smanjenje koncentracije ABA u poređenju sa grupom biljaka koja je bila izložena stresu.



**Grafik 3.** Uticaj dehidracije i rehidracije na endogenu koncentraciju ABA u listovima *I. walleriana*. Brojevi na x osi označavaju različite intenzitete dehidracije uzrokovane isušivanjem supstrata do određenih zapreminskih procentualnih vrednosti: 0 – 37, 1 – 15, 2 – 5. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška. Slova ukazuju na statistički značajne razlike na osnovu Fišerovog LSD testa ( $p \leq 0,05$ ) između kontrolne grupe biljaka, biljaka izlaganih dehidraciji i biljaka koje su podvrgnute oporavku. Modifikovano prema Đurić i sar. (2020).

#### 4.2.2.1. Uticaj dehidracije i rehidracije na ekspresiju ABA metaboličkih gena

U cilju analize nivoa ekspresije određenih gena u listovima *I. walleriana* pri dehidraciji i rehidraciji, najpre je izolovana RNK čija je čistoća i kvalitet potvrđen agaroznom elektorforezom (Slika 23). Izolovana RNK je prečišćena od kontaminacije DNK, a zatim putem reverzne transkripcije prevedena u cDNK. Dobijene cDNK su amplifikovane PCR reakcijom uz upotrebu prajmera specifičnih za ispitivane gene.

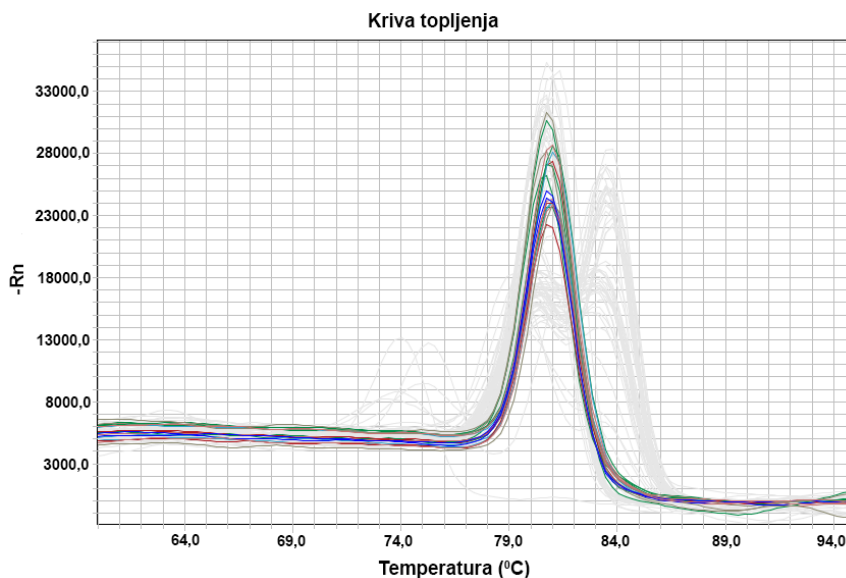


**Slika 23.** Izolovana RNK iz listova *I. walleriana* na 1,5% agaroznom gelu iz različitih tretmana dehidracije i rehidracije. 1 – početak eksperimenta, 2 – kontrolna grupa biljaka, 3 – dehidracija (uzrokovana isušivanjem supstrata do 15% vlažnosti), 4 – rehidracija (oporavak



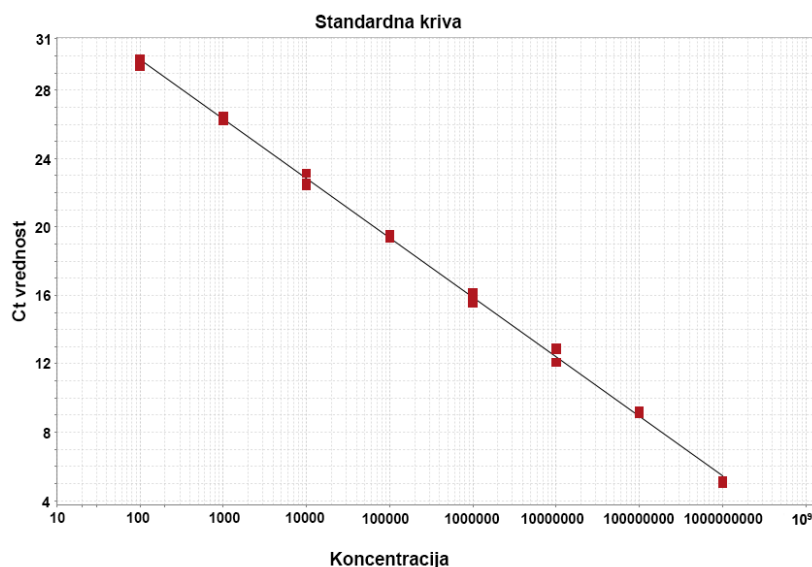
nakon isušivanja supstrata do 15% vlažnosti), 5 – kontrolna grupa biljaka, 6 – dehidracija (uzrokovana isušivanjem supstrata do 5% vlažnosti), 7 – rehidracija (oporavak nakon isušivanja supstrata do 5% vlažnosti).

Ekspresija ABA metaboličkih gena kvantifikovana je qPCR reakcijama, a specifičnost reakcija potvrđena je analizom krive topljenja za svaki gen. Na **Slici 24** dat je primer visoko specifične amplifikacije referentnog gena aktina.



**Slika 24.** Specifična amplifikacija *IwACT1* gena u listovima *I. walleriana* na osnovu analize temperature topljenja produkata nakon qPCR amplifikacije.

Efikasnost qPCR reakcija potvrđena je i analizom standardnih kriva za svaki gen. Napravljena su serijska razblaženja od  $10^9$  do  $10^2$  kopija/ $\mu$ l koja su korišćena kao standardi pomoću kojih su konstruisane standardne krive (**Slika 25**).



**Slika 25.** Primer standardne krive za *IwACT1*, poznate koncentracije amplifikovanih PCR produkata.

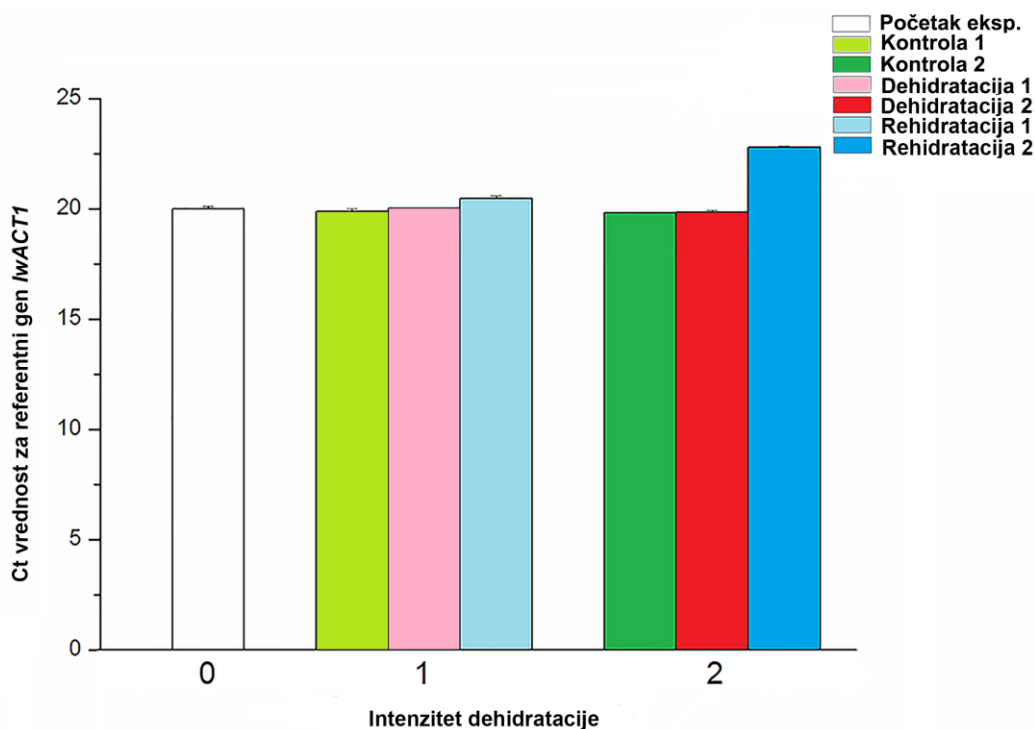


Na osnovu dobijenih nagiba kriva (eng. *Slope*), izračunate su efikasnosti qPCR reakcija za svaki od analiziranih ABA metaboličkih gena, čime je pokazano da su sve bile u opsegu preporučenih vrednosti od 80 do 120% (**Tabela 11**). Efikasnost qPCR reakcija ukazuje na preciznost u izvođenju analize i dobro podešene fizičke uslove reakcije koji omogućavaju specifično vezivanje prajmera za matricu. Ukoliko je efikasnost van okvira preporučenih vrednosti, pristupa se variranju nekih faktora poput Tm ili koncentracije prajmera.

**Tabela 11.** Nagibi kriva za ispitivane ABA metaboličke gene i efikasnosti reakcija izračunate na osnovu njih.

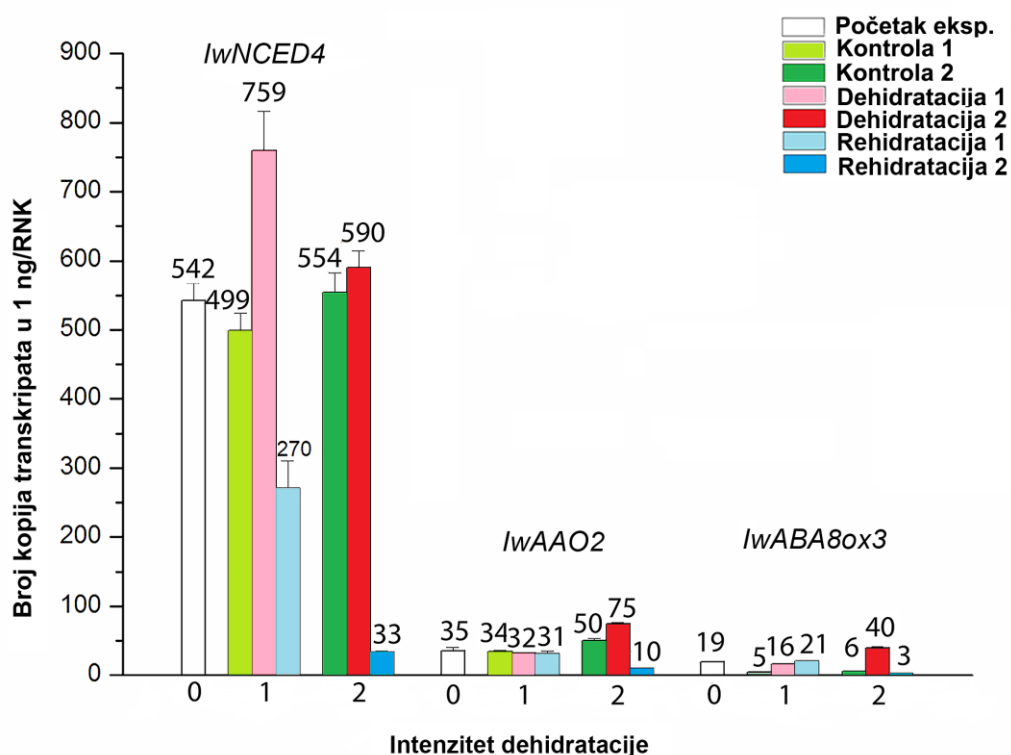
| Gen              | Nagib krive | Efikasnost reakcije (%) |
|------------------|-------------|-------------------------|
| <i>IwACT</i>     | -3,473      | 94,060                  |
| <i>IwNCED4</i>   | -3,529      | 92,025                  |
| <i>IwAAO2</i>    | -3,489      | 93,485                  |
| <i>IwABA8ox3</i> | -3,576      | 90,386                  |

Ujednačena količina ukupne cDNK na početku qPCR reakcije potvrđena je paralelnom amplifikacijom referentnog gena aktina čija je ekspresija kod svih analiziranih gena bila ujednačena (**Grafik 4**). Broj ciklusa posle koga je detektovana ekspresija aktina u uzorcima, odnosno prag detekcije (Ct vrednost), ukazuje na konstitutivnu ekspresiju ovog gena u analiziranim uzorcima *I. walleriana*. Konstitutivna ekspresija referentnog gena u različitim tkivima i pri različitim eksperimentalnim uslovima je veoma bitna jer služi kao endogena kontrola prema kojoj se vrednuju ekspresije ciljanih gena.



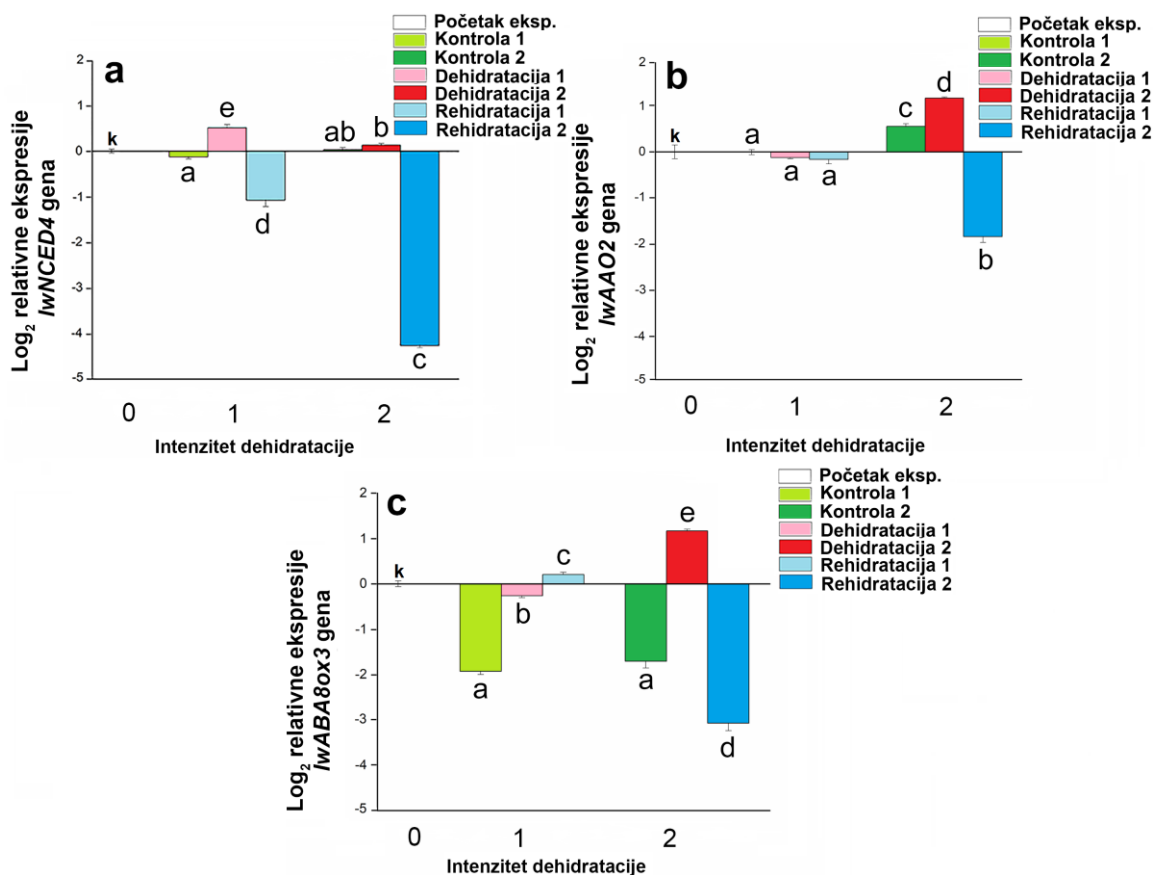
**Grafik 4.** Ct vrednosti referentnog gena aktina – *IwACT1* u listovima *I. walleriana* pri dehidraciji i rehidraciji. Brojevi na x osi označavaju različite intenzitete dehidracije uzrokovane isušivanjem supstrata do određenih zapreminskih procentualnih vrednosti: 0 – 37, 1 – 15, 2 – 5. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± standardna greška.

Na osnovu dobijenih rezultata uočen je najveći broj transkripata *IwNCED4* gena po 1 ng/RNK pri vlažnosti supstrata od 15%, dok je pri vlažnosti supstrata od 5% broj transkripata opao, ali je bio veći nego u listovima kontrolne grupe biljaka (**Grafik 5**). Sa druge strane, najveći broj transkripata *IwAAO2* gena uočen je kod biljaka koje su gajene na supstratu sa 5% vlažnosti. Broj kopija kataboličkog *IwABA8ox3* gena bio je niži u odnosu na gene za biosintezu ABA i varirao je od 16 do 40 pri 15, odnosno vlažnosti supstrata od 5%. Kod biljaka koje su bile izložene oporavku nakon oba intenziteta dehidracije, došlo je do redukcije broja kopija *IwNCED4* gena, dok je za *IwAAO2* gen redukcija ekspresije bila najizraženija tokom rehidracije nakon intenzivne dehidracije. Blagi porast zabeležen je za ekspresiju *IwABA8ox3* gena pri rehidraciji nakon isušivanja supstrata do 15% vlažnosti, dok je pri rehidraciji nakon isušivanja supstrata do 5% vlažnosti zabeležen pad ekspresije kataboličkog gena.



**Grafik 5.** Uticaj dehidracije i rehidracije na apsolutnu ekspresiju ABA metaboličkih gena u listovima *I. walleriana*. Brojevi na x osi označavaju različite intenzitete dehidracije uzrokovane isušivanjem supstrata do određenih zapreminskih procentualnih vrednosti: 0 – 37, 1 – 15, 2 – 5. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška. Modifikovano prema Đurić i sar. (2020).

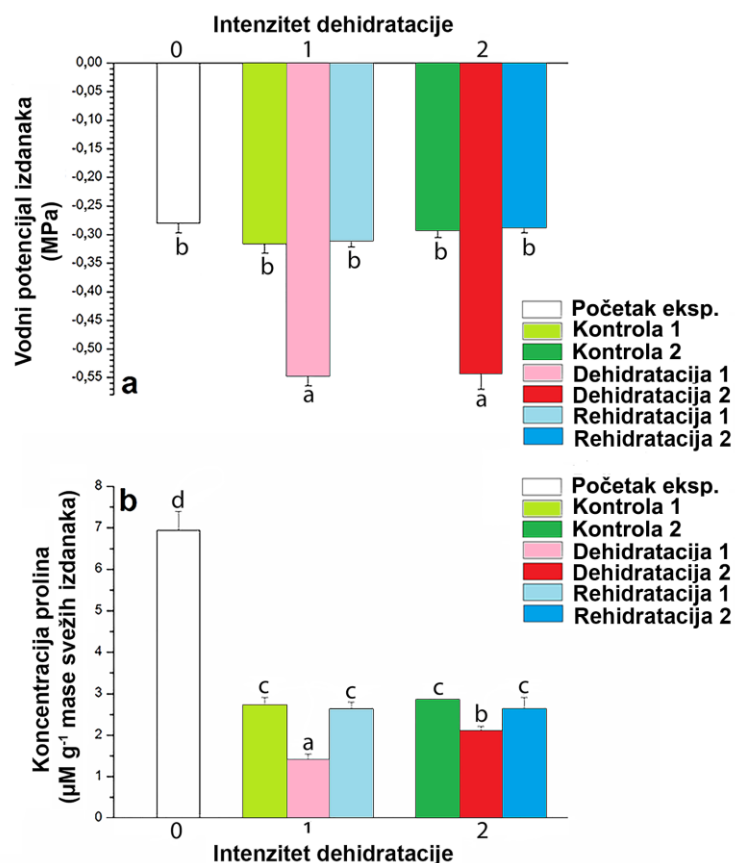
Relativna ekspresija gena prikazana na **Grafiku 6**, ukazuje na podudaranje rezultata sa apsolutnim vrednostima izraženim preko broja kopija gena po 1 ng/RNK. Rezultati su normalizovani u odnosu na referentni gen aktin i izračunati u odnosu na kalibrator start. Uočeno je značajno povećanje ekspresije *IwNCED4* i *IwAAO2* gena pri dehidraciji kao i da rehidracija značajno redukuje ekspresiju pomenutih gena. Redukcija ekspresije kataboličkog gena *IwABA8ox3* pri dehidraciji uzrokovanoj isušivanjem supstrata do 15% vlažnosti, kao i porast pri vlažnosti supstrata od 5% takođe ispoljavaju značajne razlike, dok rehidracija ima suprotan uticaj.



**Grafik 6.** Relativna ekspresija ABA metaboličkih gena, *IwNCED4* (a), *IwAAO2* (b) i *IwABA8ox3* (c). Brojevi na x osi označavaju različite intenzitete dehidracije uzrokovane isušivanjem supstrata do određenih zapreminskih procentualnih vrednosti: 0 – 37, 1 – 15, 2 – 5. Relativna ekspresija gena kvantifikovana qPCR metodom, normalizovana je na gen sa konstitutivnom ekspresijom aktin i izračunata u odnosu na kalibrator – start, označen slovom **k**. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± standardna greška dok su statistički značajne razlike između tretmana ( $p < 0,05$ ) obeležene slovima iznad barova.

#### 4.2.3. Uticaj dehidracije i rehidracije na vodni potencijal izdanaka i koncentraciju prolina

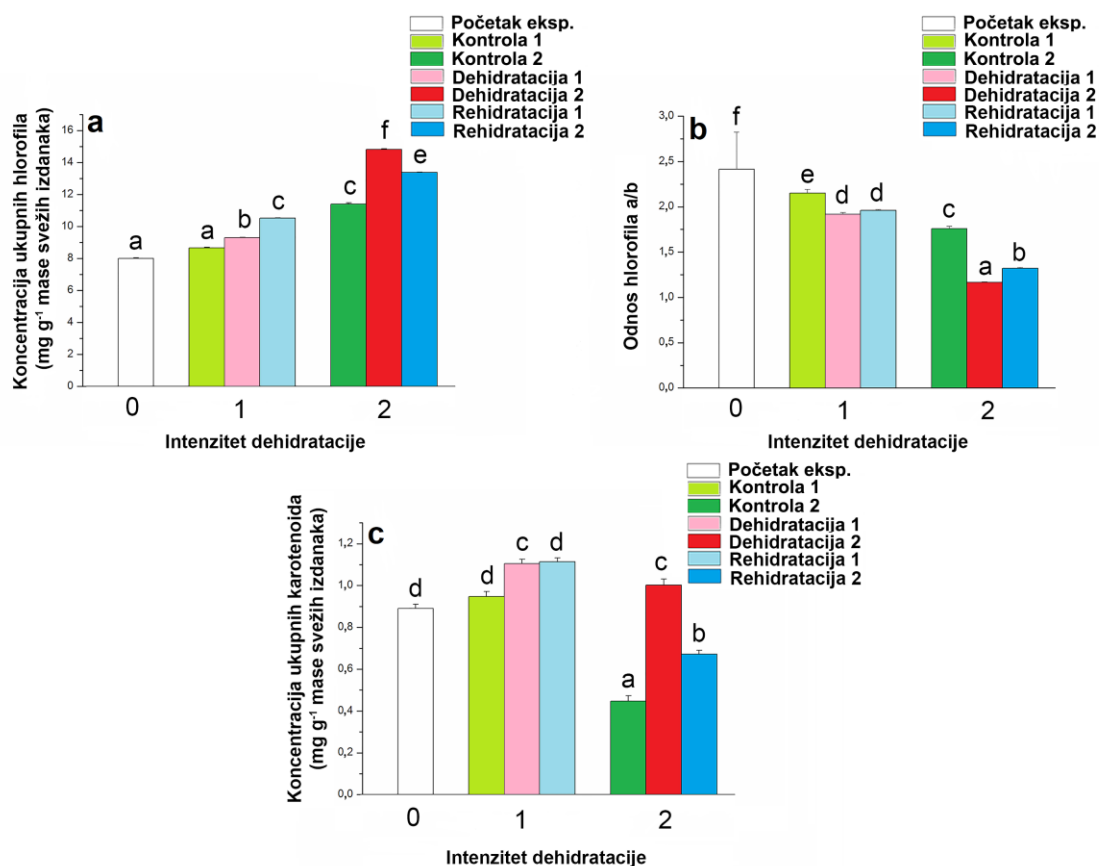
Na **Grafiku 7a** prikazane su vrednosti vodnog potencijala izdanaka izraženog u MPa, kod *I. walleriana* izlaganih dehidraciji i rehidraciji. Uočava se da vodni potencijal dostiže vrednost od oko -0,54 MPa pri dehidraciji, odnosno kod biljaka gajenih na supstratu sa 15, odnosno 5% vlažnosti. U poređenju sa kontrolnom grupom biljaka, vodni potencijal izdanaka bio je za 73,12 i 85,6% manji kod biljaka pri 15%, odnosno vlažnosti supstrata od 5%. Sa druge strane, rehidracija biljaka nakon isušivanja supstrata do 15%, odnosno 5% vlažnosti uticala je na povećanje vrednosti vodnog potencijala izdanaka sve do nivoa kontrolnih vrednosti (-0,28 i -0,29 MPa). U cilju definisanja osmotskog prilagođavanja, kvantifikovana je koncentracija aminokiseline prolina u listovima *I. walleriana* (**Grafik 7b**). U momentu indukovanja suše, koncentracija prolina u listovima *I. walleriana* bila je najveća i iznosila je  $6,94 \mu\text{M g}^{-1}$  mase svežih izdanaka, a opala je tokom trajanja eksperimentalne postavke. U poređenju sa kontrolnim biljkama koncentracija prolina kod biljaka izloženih stresu bila je niža za 48,22% i 26,46% pri 15%, odnosno vlažnosti supstrata od 5%. Rehidracija biljaka nakon isušivanja supstrata do 15%, odnosno 5% vlažnosti vratila je koncentraciju prolina do nivoa kontrolnih vrednosti ( $2,71$  i  $2,85 \mu\text{M g}^{-1}$  mase svežih izdanaka).



**Grafik 7.** Uticaj inteziteta dehidracije i rehidracije na vodni potencijal izdanaka (a) i koncentraciju prolina (b) u listovima *I. walleriana*. Brojevi na x osi označavaju različite intenzitete dehidracije uzrokovane isušivanjem supstrata do određenih zapreminskih procentualnih vrednosti: 0 – 37, 1 – 15, 2 – 5. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± standardna greška. Slova ukazuju na statistički značajne razlike na osnovu Fišerovog LSD testa ( $p \leq 0,05$ ) između kontrolne grupe biljaka, biljaka izlaganih dehidraciji i biljaka koje su podvrgnute oporavku. Modifikovano prema Đurić i sar. (2020).

#### 4.2.4. Uticaj dehidracije i rehidracije na koncentraciju fotosintetičkih pigmenata

Spektrofotometrijskom metodom određivana je koncentracija ukupnog hlorofila, odnos hlorofila a/b i ukupna količina karotenoida u listovima *I. walleriana* pri različitim vlažnostima supstrata. Na **Grafiku 8** dat je grafički prikaz koncentracije ukupnih hlorofila, odnos hlorofila a/b i koncentracija ukupnih karotenoida u listovima *I. walleriana*.

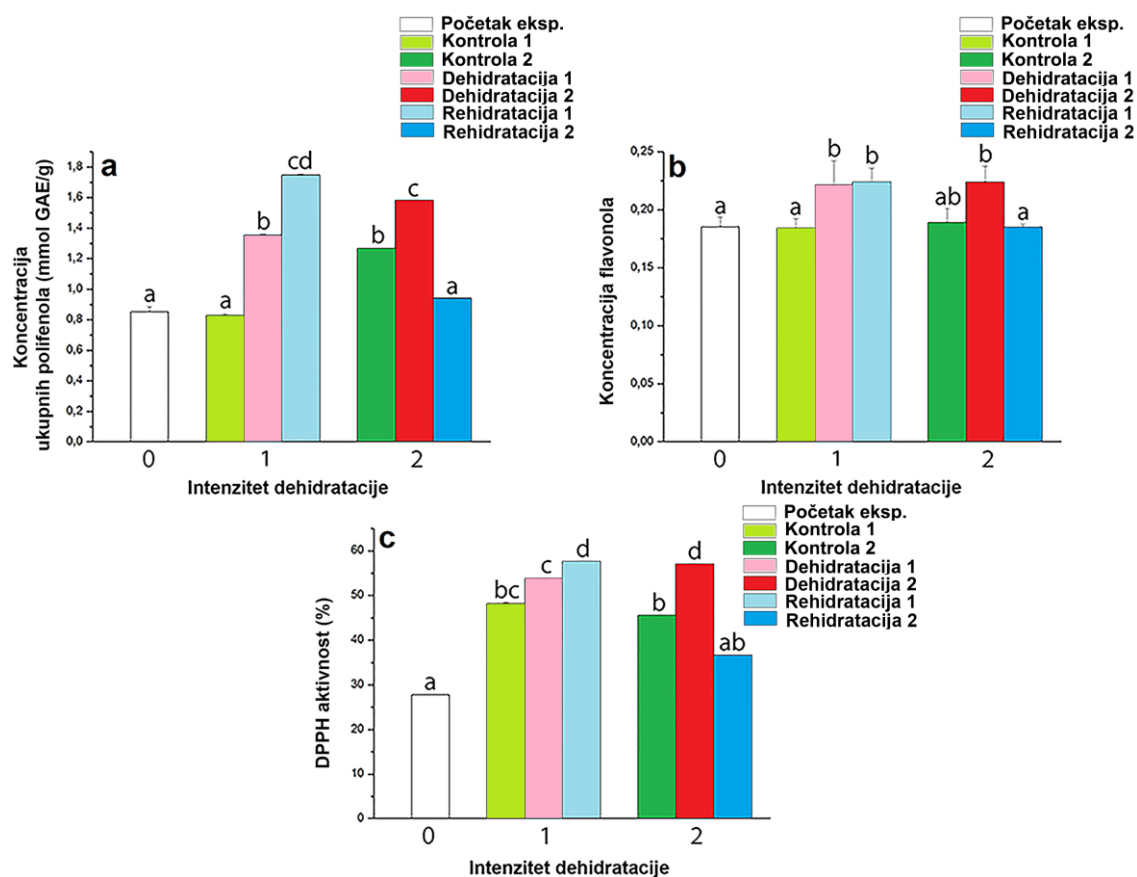


**Grafik 8.** Uticaj dehidracije i rehidracije na koncentraciju ukupnih hlorofila (a), odnos hlorofila a/b (b) i koncentraciju ukupnih karotenoida (c) u listovima *I. walleriana*. Brojevi na x osi označavaju različite intenzitete dehidracije uzrokovane isušivanjem supstrata do određenih zapreminskih procentualnih vrednosti: 0 – 37, 1 – 15, 2 – 5. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± standardna greška. Slova ukazuju na statistički značajne razlike na osnovu Fišerovog LSD testa ( $p \leq 0,05$ ) između kontrolne grupe biljaka, biljaka izlaganih dehidraciji i biljaka koje su podvrgnute oporavku. Modifikovano prema Đurić i sar. (2020).

Isušivanje supstrata do 15 i 5% vlažnosti uticalo je na povećanje ukupne koncentracije glavnih fotosintetičkih pigmenata kod *I. walleriana* (**Grafik 8a**). Povećanje koncentracije ukupnih hlorofila iznosilo je 29,85% pri vlažnosti supstrata od 5%. Sa porastom koncentracije ukupnog hlorofila, kod *I. walleriana* opadao je odnos hlorofila a/b pri dehidraciji (**Grafik 8b**). Najveći pad koncentracije hlorofila a u odnosu na hlorofil b, za 33,76%, zabeležen je pri vlažnosti supstrata od 5%. Takođe, odnos hlorofila a/b je bio značajno manji i u oporavljenim biljkama, gde dostiže manje vrednosti u poređenju sa kontrolnim biljkama. Uticaj dehidracije na koncentraciju ukupnih karotenoida u biljkama *I. walleriana* bio je sličan uočenom efektu dehidracije na koncentraciju ukupnog hlorofila i prikazan je na **Grafiku 8c**. Na osnovu dobijenih rezultata uočeno je povećanje koncentracije pomoćnih fotosintetičkih pigmenata kod biljaka pri oba indukovana intenziteta dehidracije, pri čemu je pri vlažnosti supstrata od 5% povećanje bilo čak za 123%. Oporavak biljaka je na sličan način uticao na koncentraciju ukupnih hlorofila i karotenoida u listovima *I. walleriana*. Biljke podvrgnute oporavku nakon isušivanja supstrata do 15% vlažnosti, ispoljavale su blagi porast u koncentraciji ukupnih hlorofila i karotenoida u listovima u odnosu na biljke izlagane stresu. Sa druge strane, biljke podvrgnute oporavku nakon isušivanja supstrata do 5% vlažnosti imale su smanjenu koncentraciju ukupnih hlorofila i karotenoida u listovima, u odnosu na biljke izlagane stresu.

#### 4.2.5. Uticaj dehidracije i rehidracije na koncentraciju ukupnih polifenola, flavonola i antioksidativni kapacitet

Koncentracija ukupnih polifenola, flavonola i antioksidativni kapacitet u listovima *I. walleriana*, prikazani su na **Grafiku 9**.



**Grafik 9.** Uticaj dehidracije i rehidracije na koncentraciju ukupnih polifenola (a), flavonola (b) i DPPH aktivnost (c) u listovima *I. walleriana*. Brojevi na x osi označavaju različite intenzitete dehidracije uzrokovane isušivanjem supstrata do određenih zapreminskih procentualnih vrednosti: 0 – 37, 1 – 15, 2 – 5. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška. Slova ukazuju na statistički značajne razlike na osnovu Fišerovog LSD testa ( $p \leq 0,05$ ) između kontrolne grupe biljaka, biljaka izlaganih dehidraciji i biljaka koje su podvrgnute oporavku. Modifikovano prema Đurić i sar. (2020).

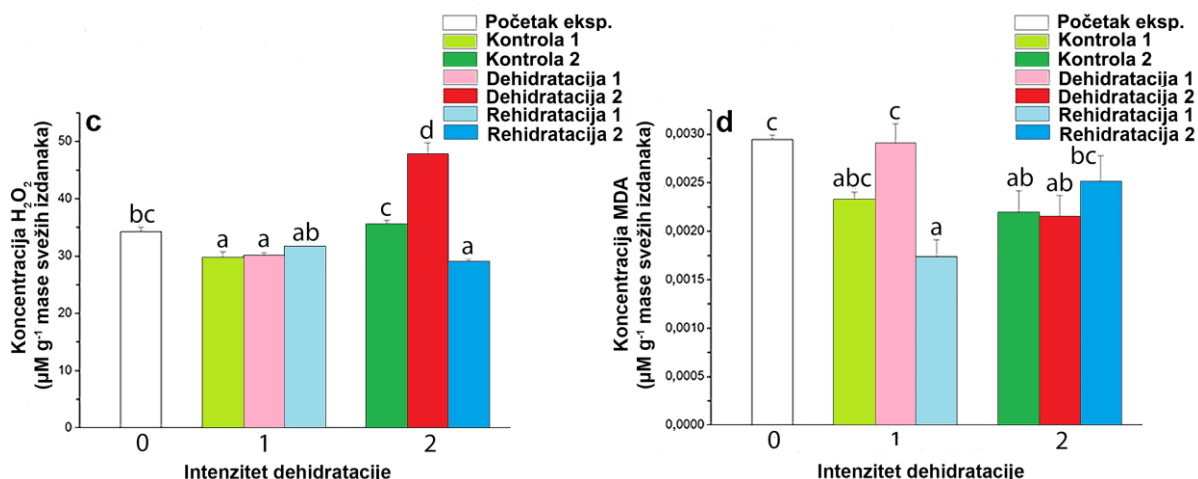
Ukupni polifenoli ispoljavali su tendenciju porasta pri dehidraciji listova uzrokovanoj isušivanjem supstrata do 15% i 5% vlažnosti, za 64,02% odnosno 24,87%. Rehidracija biljaka nakon isušivanja supstrata do 15% vlažnosti, uticala je na povećanje koncentracija ukupnih polifenola za 24,99%, dok je rehidracija nakon isušivanja supstrata do 5% vlažnosti uzrokovala smanjenje koncentracije ukupnih polifenola ispod kontrolnih vrednosti, odnosno za 59,59%. Na osnovu dobijenih rezultata, primećuje se i porast u koncentraciji flavonola kod biljaka pri oba intenziteta dehidracije za 20,41%, odnosno 18,54%. Oporavak biljaka, odnosno rehidracija uticala je na smanjenje koncentracije flavonola ispod kontrolnih vrednosti nakon isušivanja supstrata do 5% vlažnosti. Ukupni antioksidativni kapacitet biljaka, meren DPPH testom, bio je povećan za 5,60% i 11,50% pri 15% odnosno vlažnosti supstrata od 5%. Promene u vrednosti ovog parametra kod oporavljenih biljaka ispoljavale su sličan obrazac kao i za ukupne polifenole. Rehidracija nakon isušivanja supstrata do 15% vlažnosti uticala je na povećanje antioksidativne



aktivnosti ekstrakata za 3,84%, dok je smanjenje od 20,35% bilo uočeno kod biljaka oporavljenih nakon intenzivne dehidracije, odnosno isušivanja supstrata do 5% vlažnosti.

#### 4.2.6. Uticaj dehidracije i rehidracije na koncentraciju vodonik peroksida i malondialdehida

Uticaj različitih intenziteta dehidracije na stepen oksidativnog stresa u biljkama *I. walleriana* određen je na osnovu koncentracije H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i MDA (Grafik 10). Vodonik peroksid i MDA se smatraju jednim od pokazatelja jačine oksidativnog oštećenja u ćelijama, kao posledice povećane produkcije ROS u stresnim uslovima.



**Grafik 10.** Uticaj dehidracije i rehidracije na koncentraciju H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (a) i MDA (b) u listovima *I. walleriana*. Brojevi na x osi označavaju različite intenzitete dehidracije uzrokovane isušivanjem supstrata do određenih zapreminskih procentualnih vrednosti: 0 – 37, 1 – 15, 2 – 5. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± standardna greška. Slova ukazuju na statistički značajne razlike na osnovu Fišerovog LSD testa ( $p \leq 0,05$ ) između kontrolne grupe biljaka, biljaka izlaganih dehidraciji i biljaka koje su podvrgnute oporavku. Modifikovano prema Đurić i sar. (2020).

Na osnovu dobijenih rezultata uočeno je značajno povećanje koncentracije H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u listovima *I. walleriana* samo pri intenzivnoj dehidraciji uzrokovanoj isušivanjem supstrata do 5% vlažnosti. U poređenju sa kontrolnim biljkama koncentracija H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> je povećana za 34,41% pri vlažnosti supstrata od 5%, dok je rehidracija nakon isušivanja supstrata do 5% vlažnosti snižavala koncentraciju H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ispod nivoa kontrolnih vrednosti. Sa druge strane, značajno povećanje koncentracije MDA za 25,13% zabeleženo je kod biljaka pri vlažnosti supstrata od 15%. Sa povećanjem intenziteta dehidracije, koncentracija MDA je opala do nivoa vrednosti kao kod kontrolne grupe biljaka. Odgovori oporavljenih biljaka ukazuju da je koncentracija MDA bila zavisna od intenziteta dehidracije. Pri blažem intenzitetu dehidracije oporavljene biljke uspele su da snize koncentraciju ovog produkta ispod kontrolnih vrednosti. U slučaju intenzivne dehidracije navodnjavanje je uticalo na blagi skok MDA (za 14,69%) u poređenju sa kontrolnom grupom biljaka.

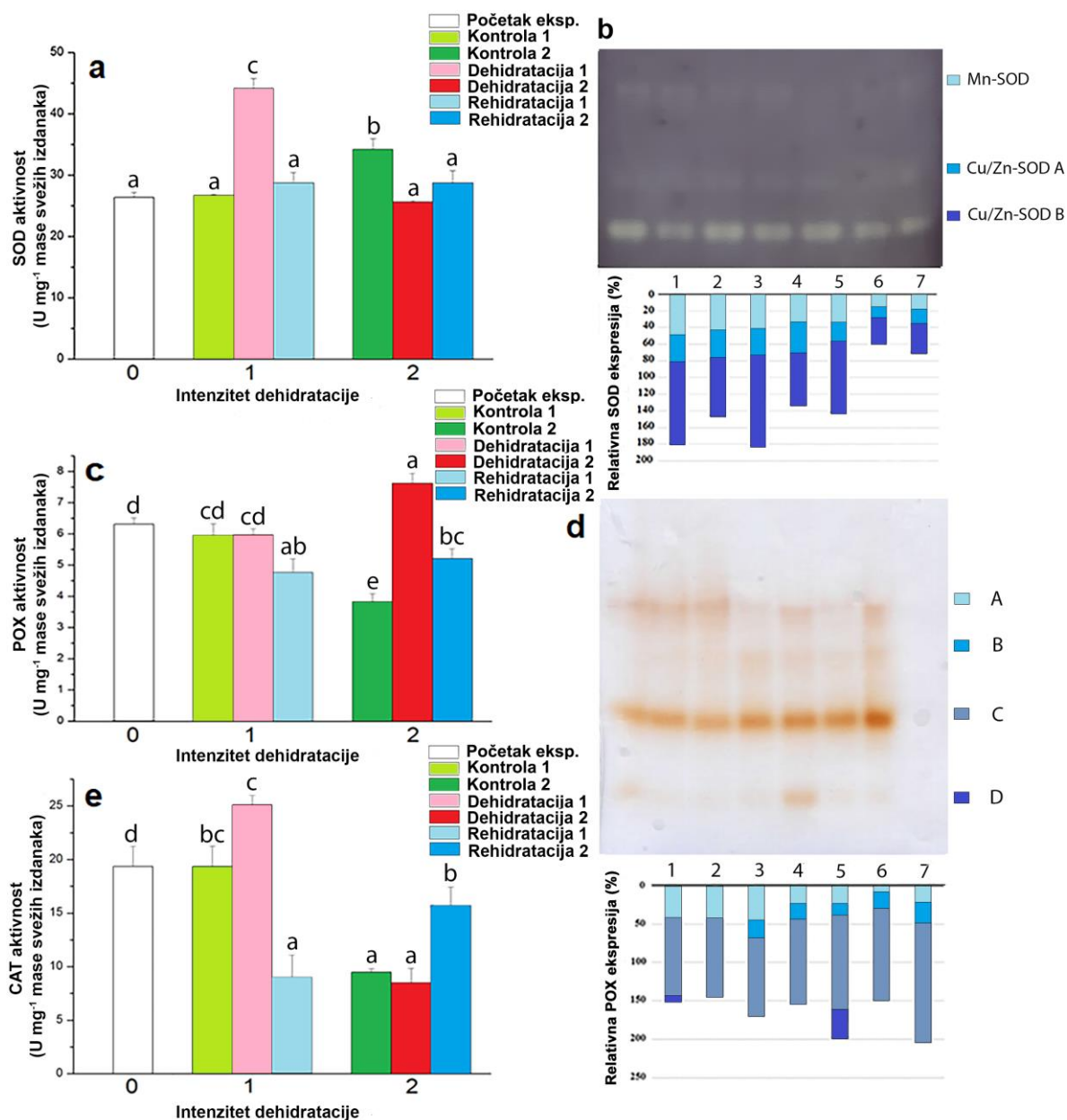
#### 4.2.7. Uticaj dehidracije i rehidracije na aktivnost antioksidativnih enzima

Na **Graficima 11a** i **11b** prikazani su SOD aktivnost i ekspresija SOD izoformi pri dehidraciji i rehidraciji u listovima *I. walleriana*. Superoksid-dismutaza predstavlja prvu liniju odbrane ćelija od reaktivnih formi kiseonika prevodeći superoksid anjon radikal u vodonik peroksid.



Pri vlažnosti supstrata od 15% zabeležen je porast aktivnosti SOD kod biljaka za 65,50%, dok pri vlažnosti supstrata od 5%, biljke snižavaju SOD aktivnost u listovima. Rehidracija biljaka nakon umerene dehidracije uticala je na redukovanje SOD aktivnost do nivoa kontrolnih vrednosti. U listovima *I. walleriana* eksprimirane su jedna Mn-SOD izoforma i dve Cu/Zn-SOD izoforme (A i B), sa najviše izraženom aktivnošću Cu/Zn-SOD B izoforme u svim tretmanima, pri čemu je relativna aktivnost Cu/Zn-SOD B izoforme najveća pri vlažnosti supstrata od 15% (uzorak broj 3 na gelu).

Na **Graficima 11c i 11d** prikazani su dobijeni rezultati za POX aktivnost i ekspresiju POX izoformi u listovima *I. walleriana*. Kako POX enzimi imaju najveći afinitet prema  $H_2O_2$ , njihova aktivnost je ključna u uslovima stresa kao što je suša. Nisu zabeležene statistički značajne razlike u promeni aktivnosti POX enzima pri vlažnosti supstrata od 15% između kontrolnih i biljaka izlaganih dehidraciji. Sa druge strane, intenzivna dehidracija uzrokovala je povećanje POX aktivnosti za 47,72% u odnosu na kontrolnu grupu biljaka. Suprotno je uočeno za aktivnost katalaza (**Grafik 11e**). Pri vlažnosti supstrata od 15% aktivnost CAT je bila veća za 29,77% u odnosu na kontrolnu grupu biljaka, dok je pri vlažnosti supstrata od 5% aktivnost opala do nivoa kontrolnih vrednosti. Rehidracija nakon isušivanja supstrata do 15% vlažnosti obara aktivnost POX i CAT do ispod nivoa kontrolnih vrednosti, dok rehidracija nakon isušivanja supstrata do 5% vlažnosti, obara POX aktivnost, ali istovremeno povećava CAT aktivnost. Detektovane su ukupno četiri POX izoforme (A, B, C i D) na gelu, od kojih je D izoforma specifična za kontrolnu grupu biljaka pri intenzivnoj dehidraciji, odnosno isušivanju supstrata do 5% vlažnosti.



**Grafik 11.** Uticaj dehidracije i rehidracije na SOD aktivnost (a), SOD izoforme (b), POX aktivnost (c), POX izoforme (d) i CAT aktivnost (e), u listovima *I. walleriana*. Brojevi na x osi za aktivnost enzima označavaju različite intenzitete dehidracije uzrokovane isušivanjem supstrata do određenih zapreminskih procentualnih vrednosti: 0 – 37, 1 – 15, 2 – 5. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± standardna greška. Slova ukazuju na statistički značajne razlike na osnovu Fišerovog LSD testa ( $p \leq 0,05$ ) između kontrolne grupe biljaka, biljaka izlaganih dehidraciji i biljaka koje su podvrgnute oporavku. Brojevi na x osi za relativnu ekspresiju izoformi enzima označavaju: 1 – početak eksperimenata, 2 – kontrolna grupa biljaka, 3 – dehidracija (isušivanje supstrata do 15% vlažnosti), 4 – rehidracija (oporavak nakon isušivanja supstrata do 15% vlažnosti), 5 – kontrolna grupa biljaka, 6 – dehidracija (isušivanje supstrata do 5% vlažnosti), 7 – rehidracija (oporavak nakon isušivanja supstrata do 5% vlažnosti). Modifikovano prema Đurić i sar. (2020).

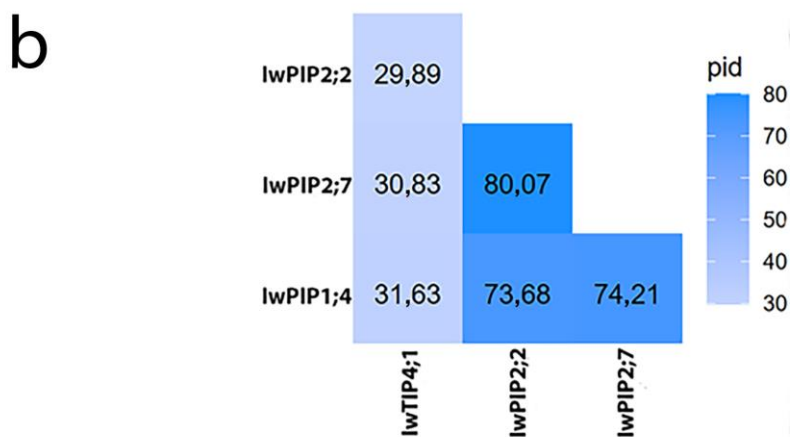
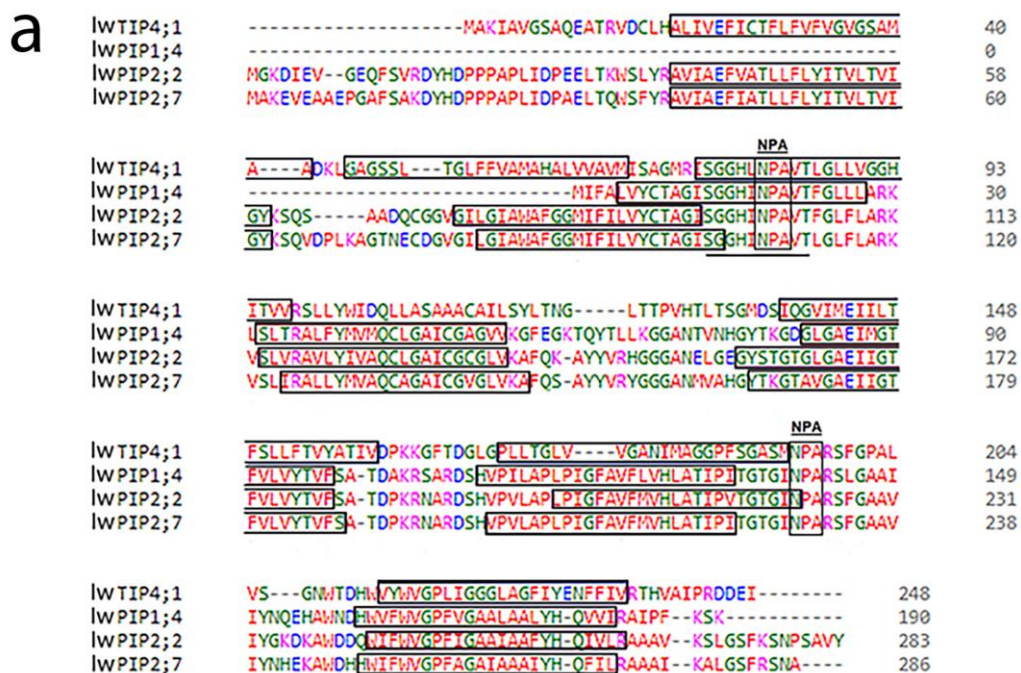
### 4.3. Karakteristike AQP proteina iz transkriptoma *I. walleriana*

Karakteristike AQP (IwPIP1;4, IwPIP2;2, IwPIP2;7 i IwTIP4;1) koje uključuju dužinu nukleotidne sekvence, broj amino kiselina, molekulsku masu, izoelektričnu tačku, indeks stabilnosti i unutarćelijsku lokalizaciju, date su u **Tabeli 12**.

**Tabela 12.** Karakteristike IwPIP1;4, IwPIP2;2, IwPIP2;7 i IwTIP4;1 AQP. Modifikovano prema Đurić i sar. (2021).

| Protein         | Dužina nukleotidne sekvence (bp) | Broj amino kiselina | Kodirajuća sekvence | Molekulska masa (kDa) | Izoelektrična tačka | Indeks stabilnosti | Unutarćelijska lokalizacija |
|-----------------|----------------------------------|---------------------|---------------------|-----------------------|---------------------|--------------------|-----------------------------|
| <b>IwPIP1;4</b> | 673                              | 190                 | parcijalna          | 20,76                 | 9,51                | 22,08              | Plazma membrana             |
| <b>IwPIP2;2</b> | 1280                             | 283                 | kompletna           | 30,05                 | 8,22                | 26,50              | Plazma membrana             |
| <b>IwPIP2;7</b> | 1302                             | 286                 | kompletna           | 30,51                 | 8,61                | 26,68              | Plazma membrana             |
| <b>IwTIP4;1</b> | 1010                             | 248                 | kompletna           | 26,39                 | 5,91                | 21,26              | Vakuola                     |

Višestruko poravnanje AQP sekvenci iz *I. walleriana* transkriptoma prikazano je na **Slici 26a**. Konzervativni NPA motivi i transmembranski regioni (TM) su uokvireni, dok je signalna sekvence (**SGxHxNPAVT**) članova MIP proteinske superfamilije podvučena. Transmembranski regioni su uokvireni redosledom od TM1 do TM6, izuzev za IwPIP1;4 kome nedostaje TM1 zbog parcijalne kodirajuće sekvence. Proteinske sekvence IwPIP2;2 i IwPIP2;7 dele sličnost od 80,07%. Sličnost IwPIP1;4 sa IwPIP2;2 i IwPIP2;7 iznosi 73,68% odnosno 74,21%, dok sa IwTIP4;1 deli 31,63% identičnosti. IwTIP4;1 deli 29,89% identičnosti sa IwPIP2;2, odnosno 30,83% sa IwPIP2;7 (**Slika 26b**).

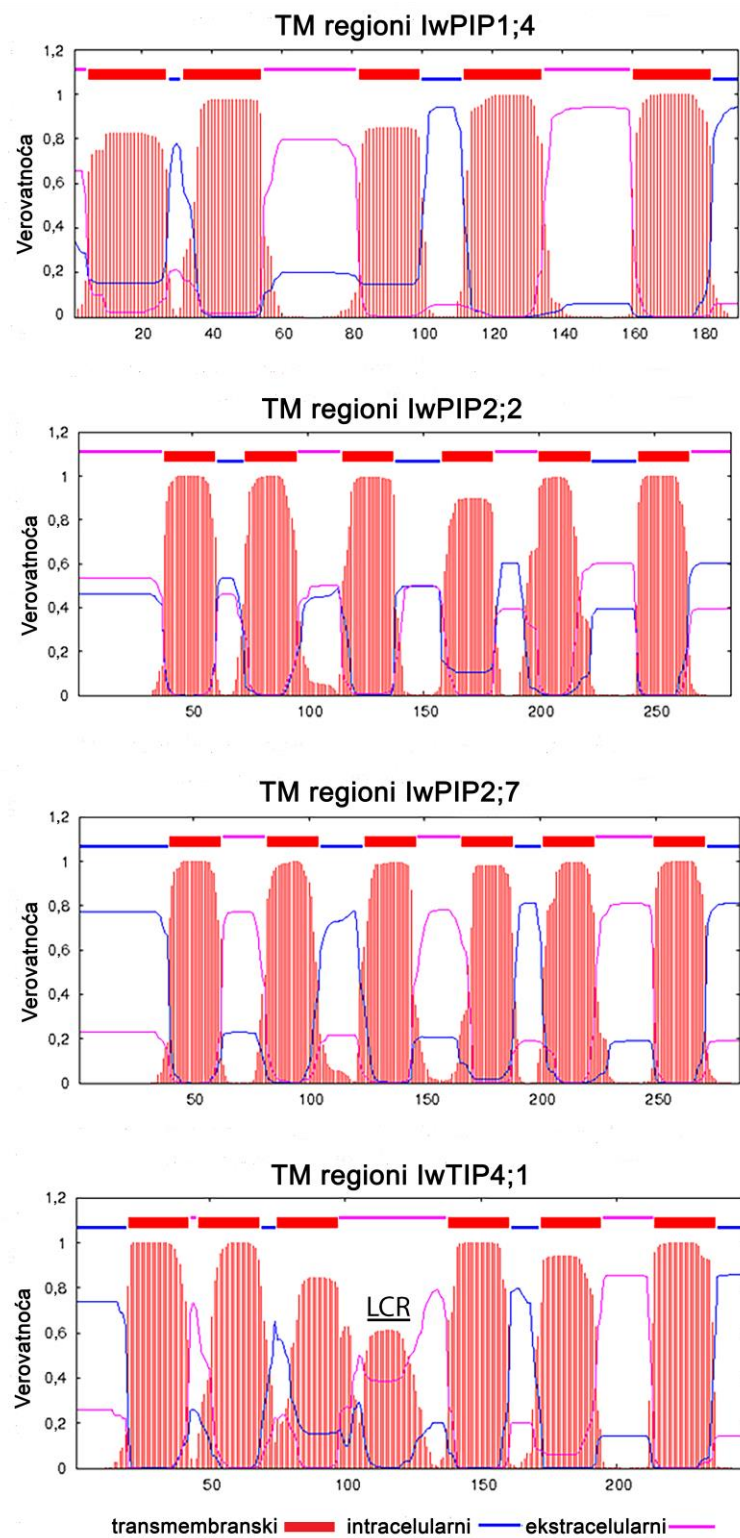


**Slika 26.** a) Poravnate sekvence AQP - IwPIP1;4, IwPIP2;2, IwPIP2;7 i IwTIP4;1 na osnovu Clustal Omega programa; NPA motivi i TMh regioni su uokvireni dok je MIP signalna sekvenca podvučena; b) procenat sličnosti – pid između četiri AQP *I. walleriana* predstavljen pomoću toplotne mape (eng. *heatmap*). Modifikovano prema Đurić i sar. (2021).

Filogenetska analiza *I. walleriana* AQP i AQP iz drugih biljnih vrsta, ukazuje da IwPIP1;4, IwPIP2;2, IwPIP2;7 i IwTIP4;1 pripadaju PIP1, PIP2 i TIP4 podgrupama (**Slika 27**). Akvaporin IwPIP1;4 deli najveći stepen sličnosti sa GmPIP1;4 iz soje (*Glycine max*), dok je IwTIP4;1 najbliži akvaporinima CsTIP4;1-like iz *Camelia sinensis* i CaTIP4;1-like iz *Coffea arabica*. Akvaporini iz PIP2 podgrupe, IwPIP2;2 i IwPIP2;7 su najbliži odgovarajućim akvaporinima iz *C. sinensis*, dok IwPIP2;7 takođe deli sličnost u strukturi i sa AQP QIPIP2;7 iz *Quercus lobata*.



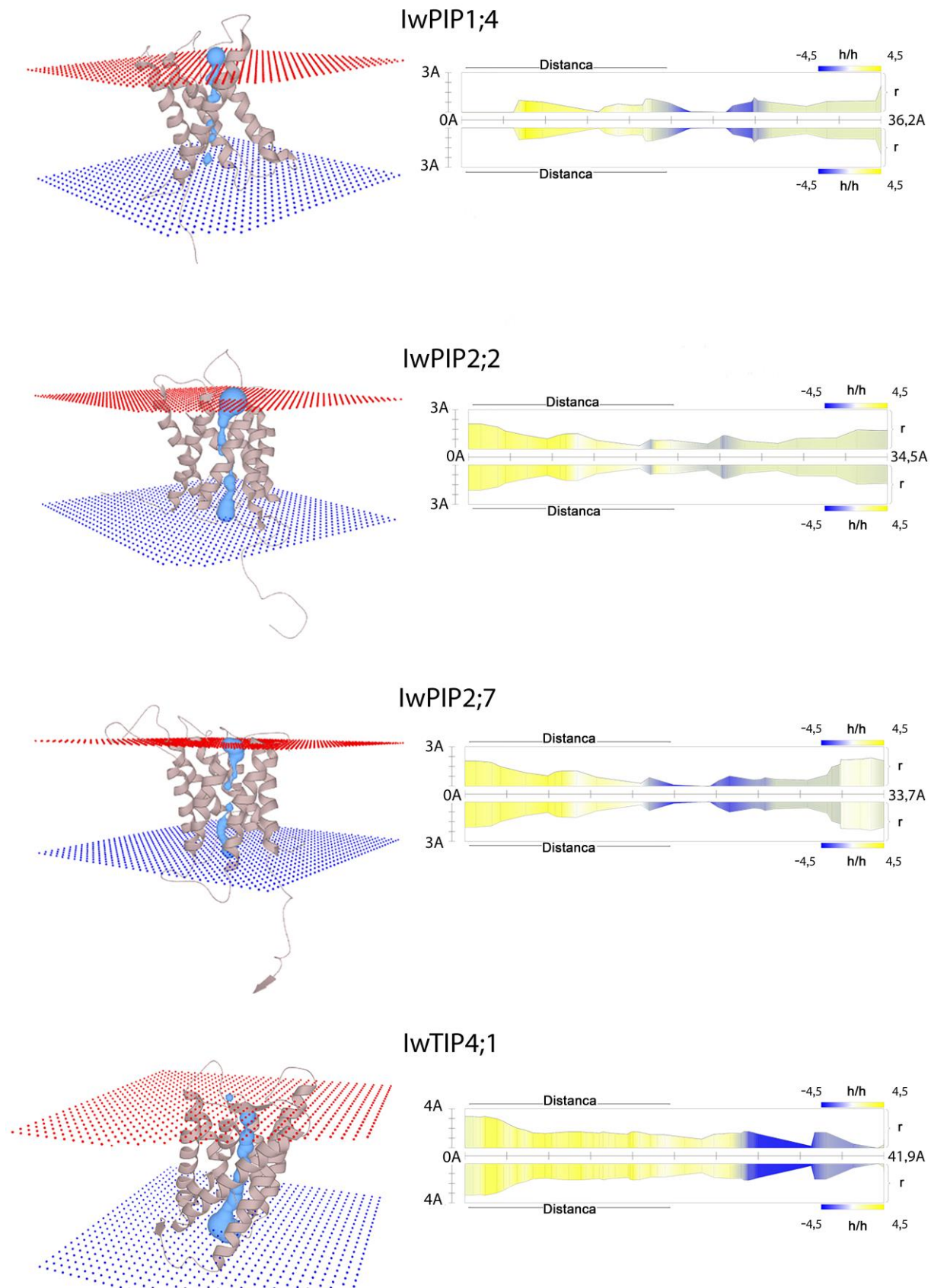




**Slika 28.** Transmembranski regioni IwPIP1;4, IwPIP2;2, IwPIP2;7 i IwTIP4;1 AQP. Modifikovano prema Đurić i sar. (2021).

Morfologija pore individualnih monomera AQP *I. walleriana* u membrani, zajedno sa indeksom hidrofobnosti/hidrofilnosti (**h/h**) aminokiselinskih ostataka prikazana je na **Slici 29**. Rezultati ukazuju na različit sastav aminokiselinskih ostataka, koji utiče na hidrofobnost/hidrofilnost, a samim tim i na mogućnost transporta različitih molekula. Indeks hidrofobnosti/hidrofilnosti uglavnom ima vrednosti od -4,5 do 4,5, pri čemu vrednost 4,5 odgovara

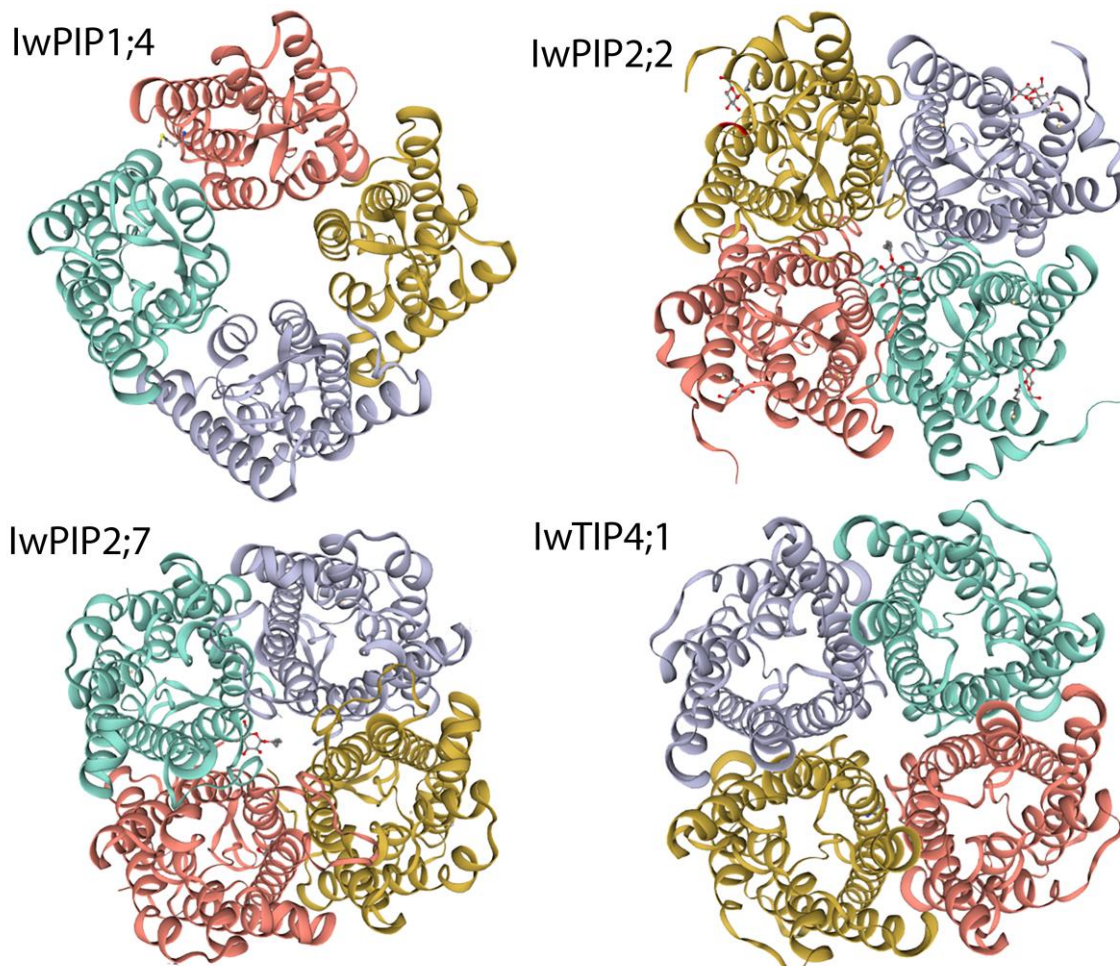
najhidrofobnijoj amino kiselinu izoleucinu, dok vrednost -4,5 ima najhidrofilniji arginin. Takođe, 3 Å prečnik pore u najužem delu (za IwPIP1;4, IwPIP2;2 i IwPIP2;7), odnosno 4 Å za IwTIP4;1, veći je od prečnika molekula vode koji iznosi približno 2,8 Å. Dužina kanala AQP iznosi 36,2 Å, 34,5 Å, 33,7 Å i 41,9 Å, redom za IwPIP1;4, IwPIP2;2, IwPIP2;7 i IwTIP4;1.



**Slika 29.** 3D struktura pore pojedinačnih AQP monomera *I. walleriana* u membrani (levo) i indeks hidrofilitnosti/hidrofobnosti (h/h) sa prečnikom (r) i dužinom pore (desno). Modifikovano prema Đurić i sar. (2021).



Na **Slici 30** predstavljena je 3D struktura holoproteina, odnosno tetramera četiri analizirana AQP iz transkriptoma *I. walleriana*. Uočavaju se četiri ujedinjena monomera sa individualnim porama, kao i prisustvo pete centralne pore.



**Slika 30.** 3D struktura holoproteina IwPIP1;4, IwPIP2;2, IwPIP2;7 i IwTIP4;1. Prema Đurić i sar. (2021).

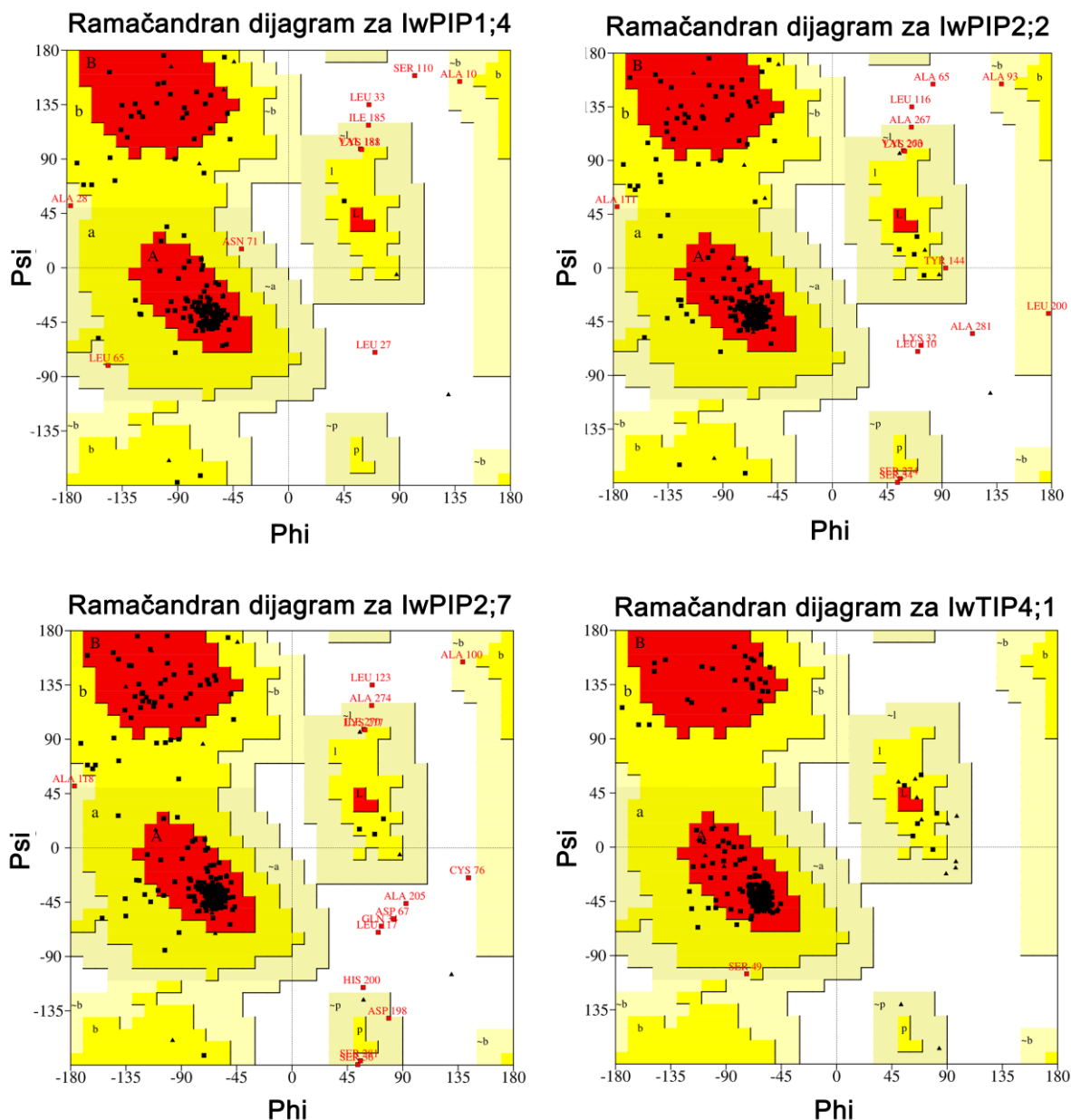
#### 4.3.2. Stereohemijske osobine AQP proteina

Kvalitetet 3D struktura *I. walleriana* AQP proveren je analizom stereohemijskih osobina pomoću Ramačandran 2D dijagrama (**Slika 31**). Svaka amino kiselina u proteinu okarakterisana je svojim rotacionim uglovima i određenom konformacijom u prostoru. Rotacioni ugao oko N-C $\alpha$  veze obeležava se sa “phi”, dok je rotacioni ugao oko C $\alpha$ -C veze “psi”. Na osnovu ovih rotacija, svaka amino kiselina zauzima određeno mesto u Ramačandran 2D prikazu u prostoru od  $-180^\circ$  do  $+180^\circ$ . Prema dobijenim rezultatima uočava se da većina amino kiselina u akvaporinima kod vrste *I. walleriana* zauzima energetske dozvoljene regione koji uključuju najviše favorizovane regione, odnosno A region (odgovara strukturi  $\alpha$  heliksa), B region (odgovara strukturi  $\beta$  ploče) i L region (obuhvata oba tipa sekundarne strukture); dodatno favorizovane (a, b, l, p) i generički favorizovane

regione (~a,~b,~l,~p). Na osnovu analize Ramačandran dijagrama, pokazano je da IwPIP1;4, IwPIP2;2, IwPIP2;7 i TIP4;1 imaju 98,1, 97,7, 96,8 i 100% aminokiselina u energetski dozvoljenim regionima (**Tabela 13**). U energetski nedozvoljenim regionima nalazi se 1,95, 2,3, 3,2 i 0% aminokiselinskih ostataka, redom za IwPIP1;4, IwPIP2;2, IwPIP2;7 i TIP4;1.

**Tabela 13.** Stereoheмиjske karakteristike AQP iz *I. walleriana* transkriptoma. Modifikovano prema Đurić i sar. (2021).

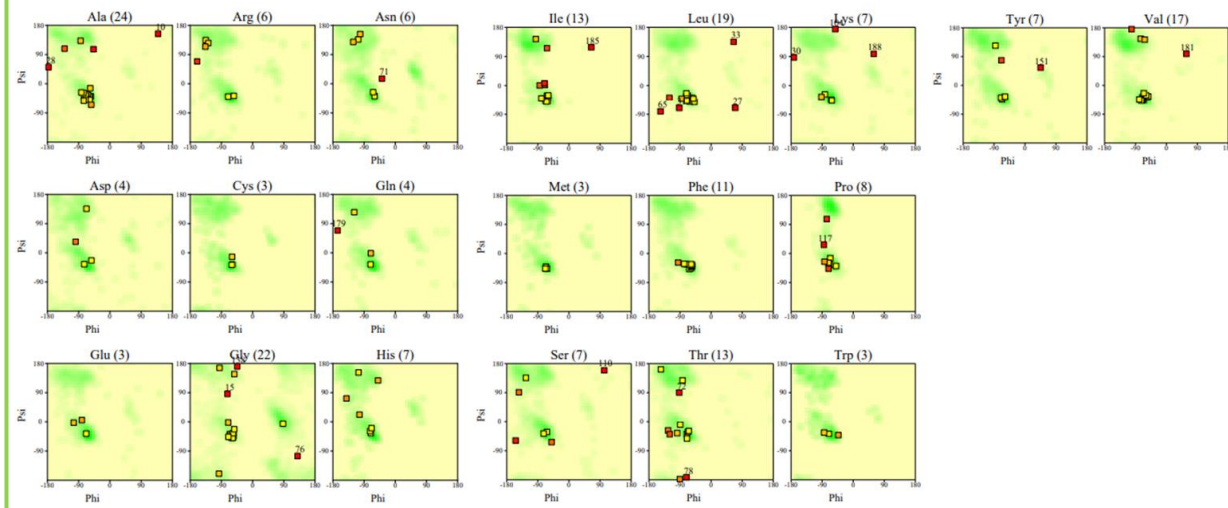
| Protein         | A, B, L | a, b, l, p | ~a,~b,~l,~p | Nedozvoljeni regioni (%) | Energetski povoljni regioni (%)<br>Σ |
|-----------------|---------|------------|-------------|--------------------------|--------------------------------------|
| <b>IwPIP1;4</b> | 81,5    | 12,1       | 4,5         | 1,9                      | 98,1                                 |
| <b>IwPIP2;2</b> | 79,9    | 13,6       | 4,2         | 2,3                      | 97,7                                 |
| <b>IwPIP2;7</b> | 80,3    | 12,8       | 3,7         | 3,2                      | 96,8                                 |
| <b>IwTIP4;1</b> | 91,8    | 7,7        | 0,5         | 0                        | 100                                  |



**Slika 31.** Ramačandran dijagrami 2D strukture AQP iz *I. walleriana* transkriptoma. Crvenom bojom su označeni najviše favorizovani regioni, žutom dodatno favorizovani, a krem bojom generički favorizovani regioni. Belom bojom su označeni nedozvoljeni regioni. Amino kiseline u generičkim i nedozvoljenim regionima su obeležene odgovarajućom skraćenicom. Modifikovano prema Đurić i sar. (2021).

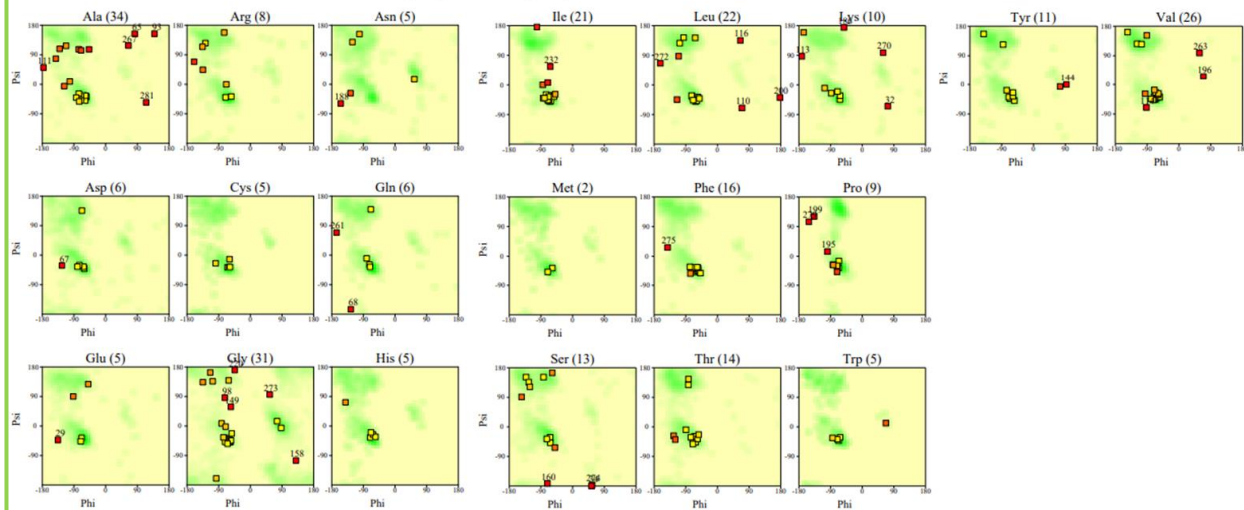
Na Slikama 32, 33, 34 i 35 dat je prikaz Ramačandran konformacije pojedinačnih aminokiselina za IwPIP1;4, IwPIP2;2, IwPIP2;7 i IwTIP4;1.

### Ramačandran dijagrami pojedinačnih aminokiselina IwPIP1;4



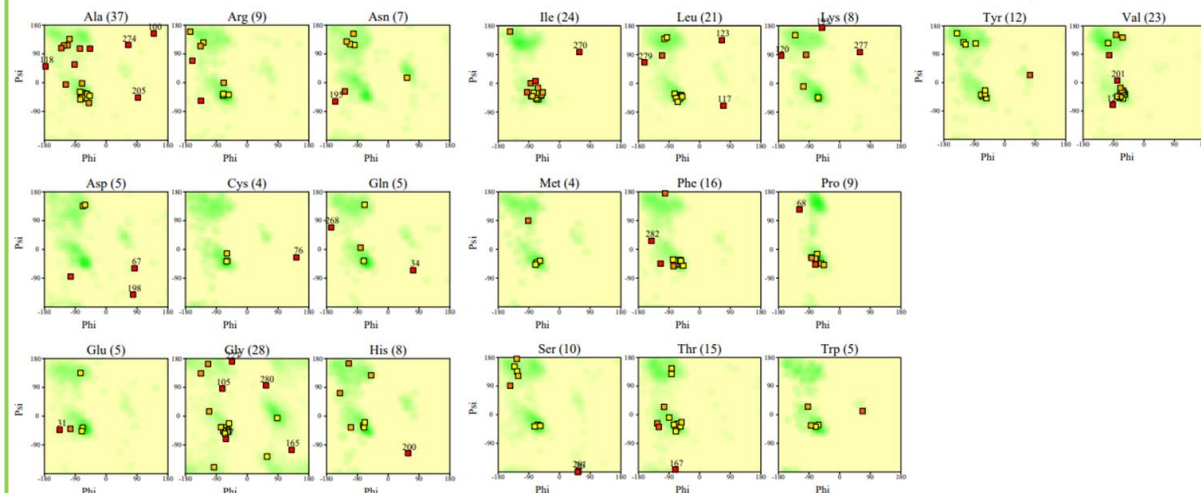
Slika 32. Ramačandran dijagrami pojedinačnih aminokiselina za akvaporin IwPIP1;4.

### Ramačandran dijagrami pojedinačnih aminokiselina IwPIP2;2



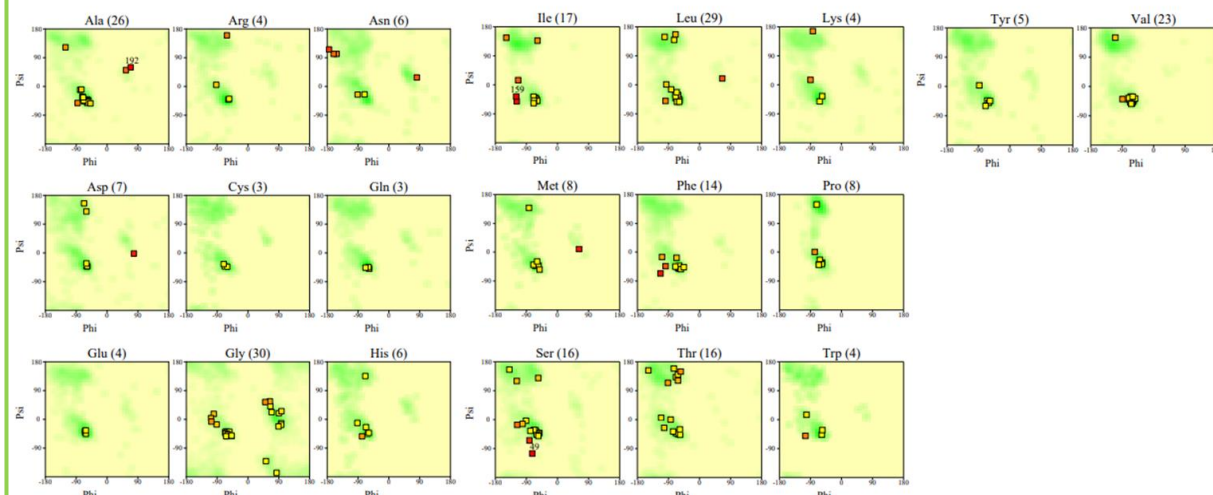
Slika 33. Ramačandran dijagrami pojedinačnih aminokiselina za akvaporin IwPIP2;2.

### Ramačandran dijagrami pojedinačnih aminokiselina IwPIP2;7



**Slika 34.** Ramačandran dijagrami pojedinačnih aminokiselina za akvaporin IwPIP2;7.

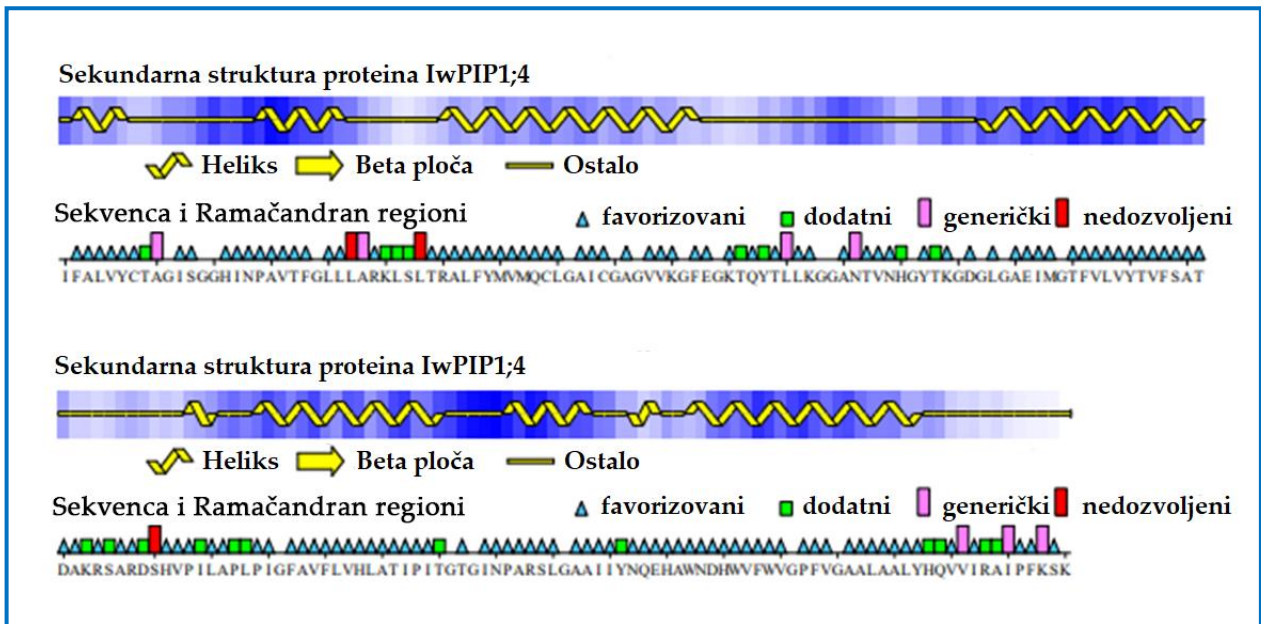
### Ramačandran dijagrami pojedinačnih aminokiselina IwTIP4;1



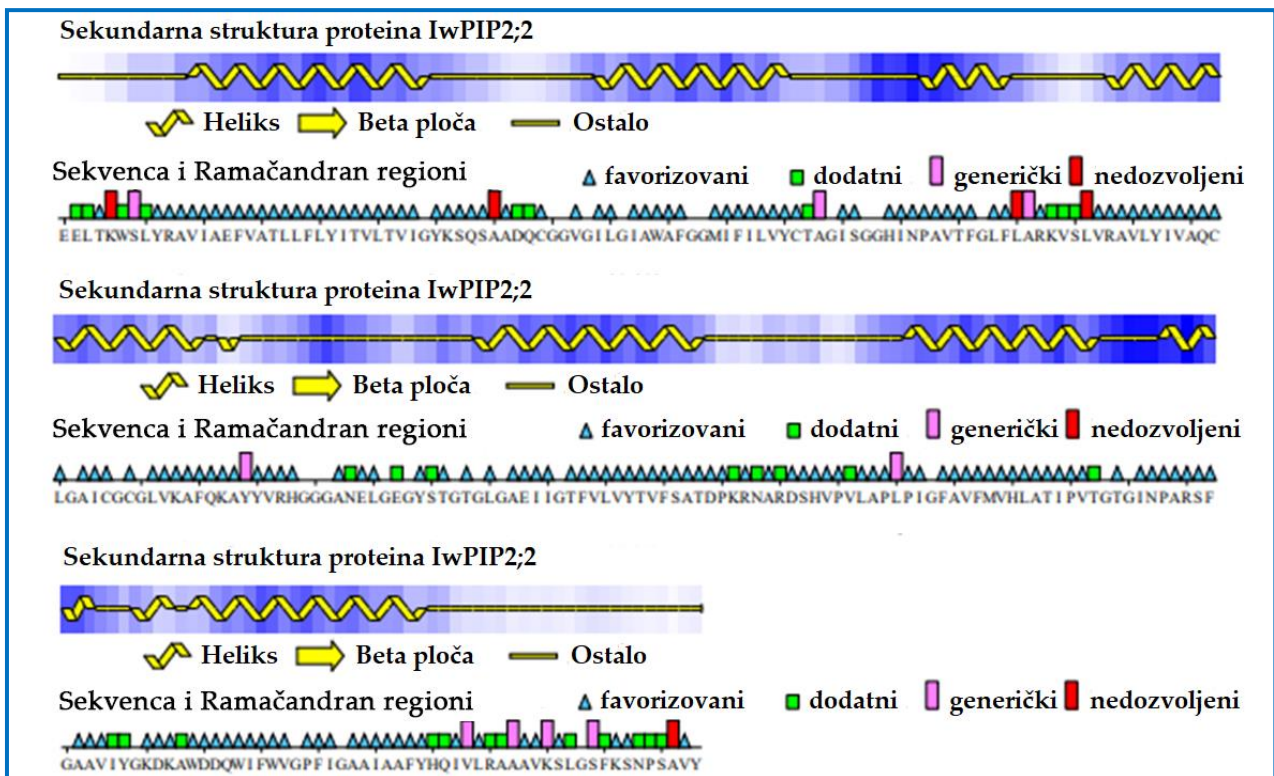
**Slika 35.** Ramačandran dijagrami pojedinačnih aminokiselina za akvaporin IwTIP4;1.

Na **Slikama 36, 37, 38 i 39** dat je prikaz sekundarne strukture IwPIP1;4, IwPIP2;2, IwPIP2;7 i IwTIP4;1, na osnovu analize Ramačandran dijagrama. Na osnovu prikaza sekundarnih struktura AQP, uočava se da se je dominantna sekundarna struktura AQP  $\alpha$ -heliks, dok je  $\beta$ -ploča zastupljena jedino kod IwPIP2;7 u relativno malom udelu. Takođe, primećuje se da aminokiselinski ostaci koji se prema Ramačandran analizi klasifikuju kao dodatni, generički i nedozvoljeni regioni, uglavnom nalaze u delovima proteina koji ne uključuju  $\alpha$ -heliks i  $\beta$ -ploča strukturnu organizaciju.

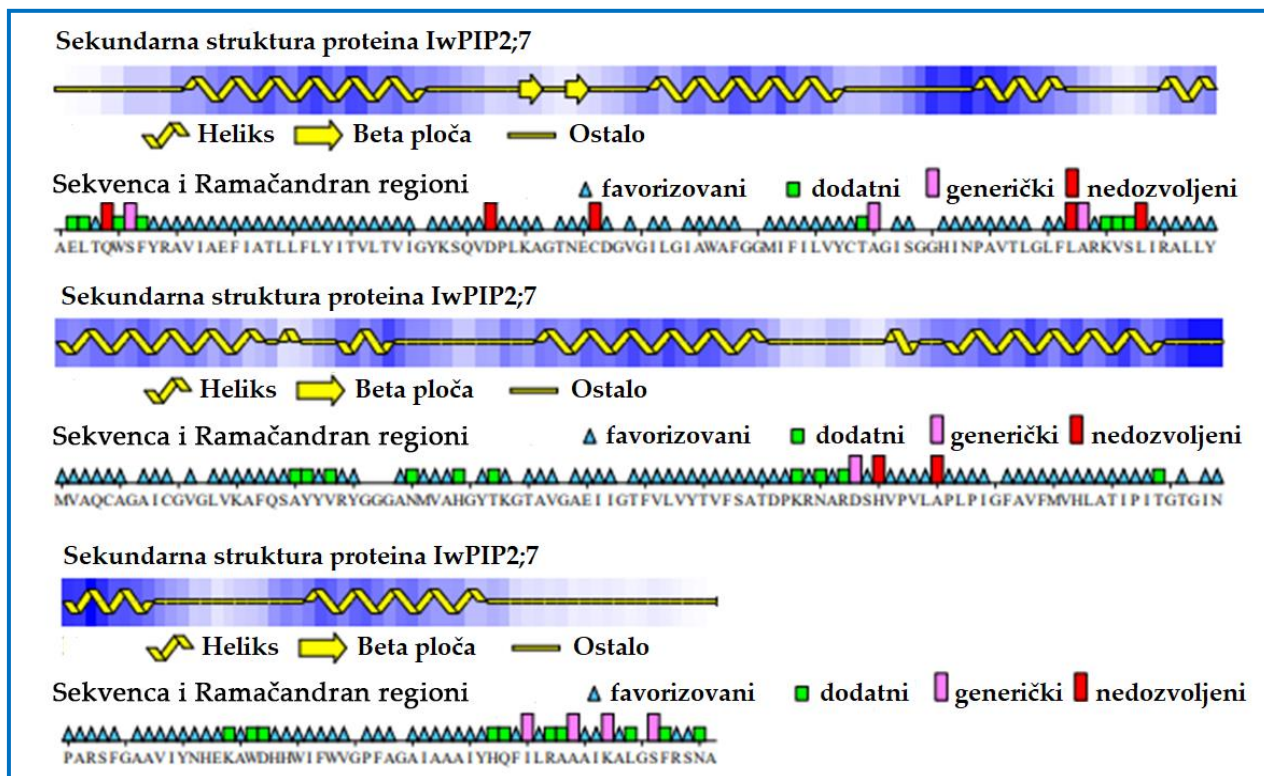




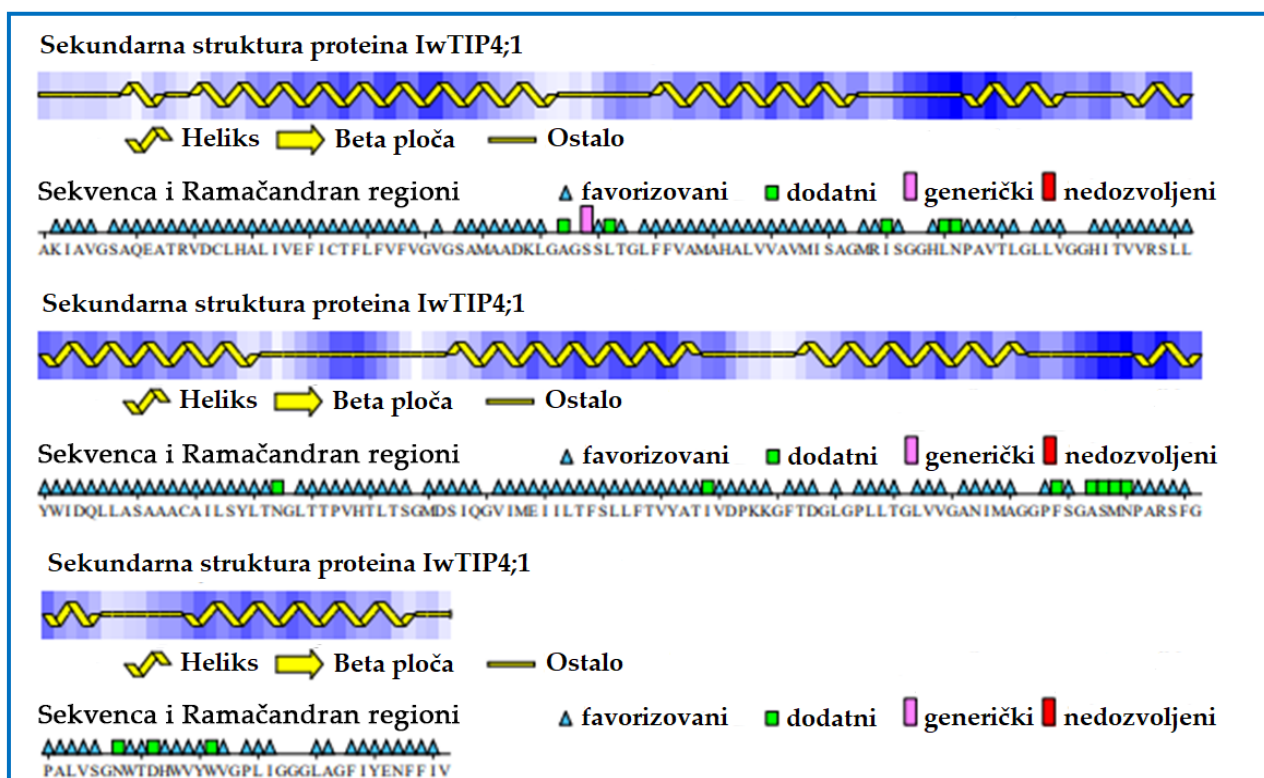
Slika 36. Sekundarna struktura IwPIP1;4 proteina prema Ramačandran analizi.



Slika 37. Sekundarna struktura IwPIP2;2 proteina prema Ramačandran analizi.



Slika 38. Sekundarna struktura IwPIP2;7 AQP prema Ramačandran analizi.



Slika 39. Sekundarna struktura IwTIP4;1 AQP prema Ramačandran analizi.

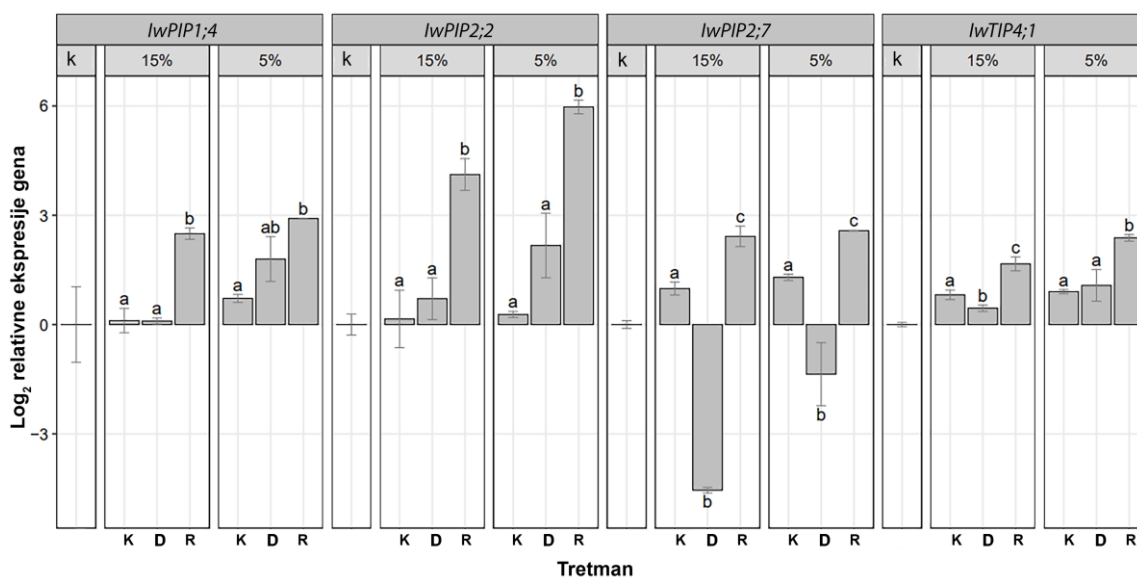
### 4.3.3. Ekspresija gena za AQP

Na osnovu dobijenih nagiba kriva izračunate su efikasnosti qPCR reakcija za svaki od analiziranih gena za akvaporine, čime je pokazano da su sve bile u opsegu preporučenih vrednosti od 80 do 120% (**Tabela 14**).

**Tabela 14.** Nagibi kriva za ispitivane AQP gene i efikasnosti reakcija izračunate na osnovu njih.

| Gen           | Nagib krive | Efikasnost reakcije (%) |
|---------------|-------------|-------------------------|
| <i>PIP1;4</i> | -3,656      | 87,719                  |
| <i>PIP2;2</i> | -3,683      | 88,864                  |
| <i>PIP2;7</i> | -3,521      | 92,314                  |
| <i>TIP4;1</i> | -3,522      | 92,264                  |

Relativna ekspresija gena za akvaporine u listovima *I. walleriana* pri dehidraciji i rehidraciji prikazana je na **Grafiku 12**. Značajno povećanje ekspresije *IwPIP1;4* uočeno je tokom faze rehidracije, dok je neznatno povećanje zabeleženo prilikom izlaganja biljaka intenzivnoj dehidraciji. Povećanje ekspresije *IwPIP2;2* bilo je od značaja samo tokom procesa rehidracije. Najveći uticaj dehidracije na ekspresiju AQP gena zabeležen je u slučaju *IwPIP2;7*. Ekspresija gena *IwPIP2;7* bila je značajno redukovana pri dehidraciji, naročito pri vlažnosti supstrata od 15%. Rehidracija je ispoljavala suprotan uticaj na ekspresiju *IwPIP2;7*, odnosno indukovala ju je. Promena ekspresije tonoplastnog AQP *IwTIP4;1* bila je od značaja pri umerenijem intenzitetu dehidracije, gde je blago redukovana, kao i tokom oporavka biljaka u kom je ekspresija bila povećana.



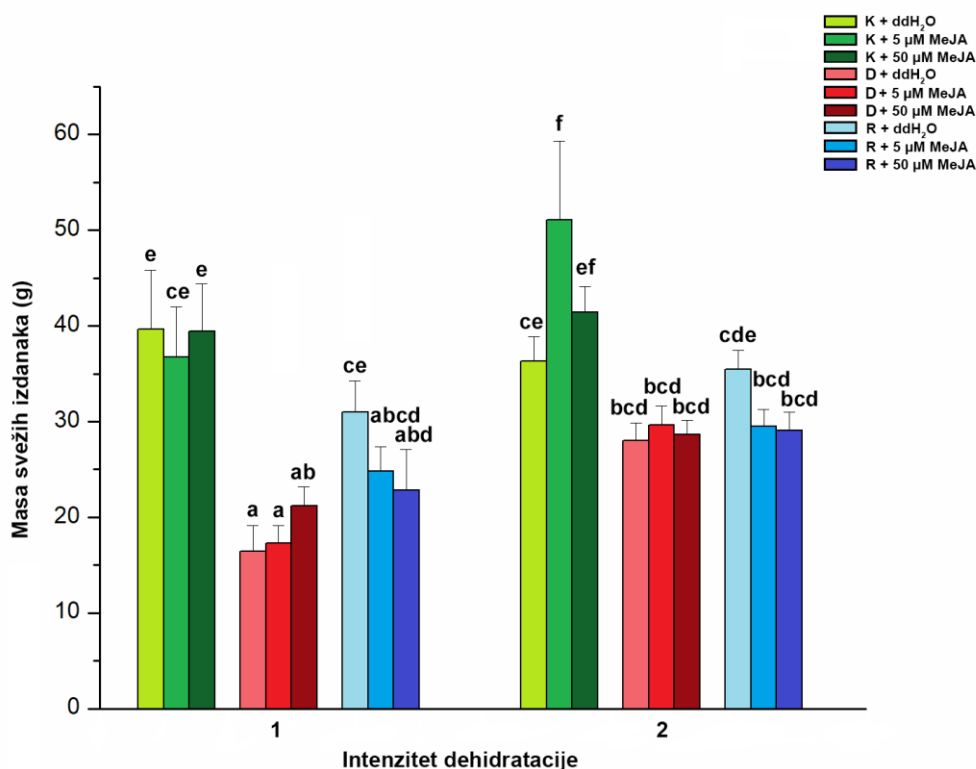
**Grafik 12.** Uticaj dehidracije i rehidracije na relativnu ekspresiju gena *IwPIP1;4*, *IwPIP2;2*, *IwPIP2;7* i *IwTIP4;1* u listovima *I. walleriana*. Relativna ekspresija gena kvantifikovana qPCR metodom, normalizovana je na gen sa konstitutivnom ekspresijom – aktin i izračunata u odnosu na kalibrator **k** – početak eksperimenta. **K** – kontrola, **D** – dehidracija, **R** – rehidracija. Statistički značajne razlike između tretmana ( $p < 0,05$ ) obeležene su slovima iznad barova. Modifikovano prema Đurić i sar. (2021).



#### 4.4. Uticaj folijarne primene MeJA na rastenje i razviće *I. walleriana*

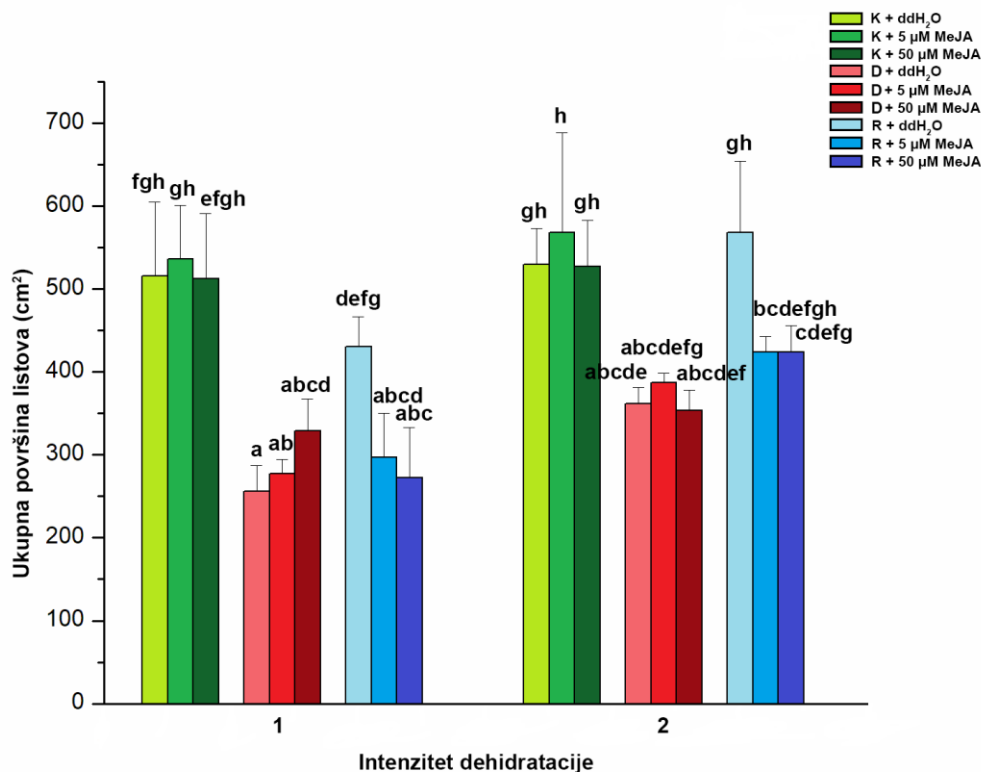
##### 4.4.1. Uticaj folijarne primene MeJA na morfološke parametre *I. walleriana*

Na **Grafiku 13** predstavljen je uticaj folijarne primene dve koncentracije MeJA (5 i 50  $\mu\text{M}$ ) na masu svežih izdanaka *I. walleriana*. Uočeno je da obe koncentracije MeJA utiču na povećanje mase svežih biljaka kod kontrolne grupe biljaka za intenzitet dehidracije uzrokovan isušivanjem supstrata do 5% vlažnosti. Povećanje mase svežih izdanaka iznosilo je 40,72% i 14,21% za 5  $\mu\text{M}$ , odnosno 50  $\mu\text{M}$  koncentraciju MeJA u odnosu na kontrolnu grupu biljaka koje su tretirane destilovanom vodom. Oba intenziteta dehidracije značajno su uticala na redukciju mase svežih izdanaka. Pri vlažnosti supstrata od 15% masa svežih izdanaka tretiranih destilovanom vodom bila je manja za 58,31% u odnosu na kontrolnu grupu biljaka tretiranih destilovanom vodom. Biljke tretirane MeJA u koncentracijama od 5 i 50  $\mu\text{M}$  pri vlažnosti supstrata od 15% imale su redukovanu masu svežih izdanaka za 52,95% i 46,24%, u odnosu na kontrolnu grupu biljaka tretiranu sa 5, odnosno 50  $\mu\text{M}$  MeJA. Pri 15% vlažnosti supstrata nisu zabeležene značajne razlike između biljaka tretiranih destilovanom vodom i nižom koncentracijom MeJA, dok je viša koncentracija elicitora uticala na značajno povećanje mase svežih izdanaka. Sa druge strane, intenzivna dehidracija, odnosno redukovanje vlažnosti supstrata do 5%, uticalo je na smanjenje mase svežih izdanaka za 22,76, 41,98 i 30,95% kod biljaka tretiranih destilovanom vodom, 5 i 50  $\mu\text{M}$  MeJA, u odnosu na kontrolnu grupu biljaka koje su tretirane navedenim elicitorima istim redosledom. Međutim, u okviru intenziteta dehidracije, vrednosti mase svežih izdanaka nisu ispoljavale značajne razlike između biljaka tretiranih destilovanom vodom i različitim koncentracijama MeJA. Rehidracija nakon isušivanja supstrata do 15% vlažnosti je uticala na povećanje mase svežih izdanaka u svim tretmanima. Povećanje mase svežih izdanaka za 51,03% u odnosu na dehidraciju, bilo je najveće kod biljaka tretiranih destilovanom vodom. Takođe, rehidracija nakon isušivanja supstrata do 5% vlažnosti značajno je uticala samo na povećanje mase svežih izdanaka kod biljaka prethodno tretiranih destilovanom vodom, i to za 26,41%.



**Grafik 13.** Uticaj folijarne primene MeJA na masu svežih izdanaka *I. walleriana* pri dehidraciji i rehidraciji. Brojevi na x osi označavaju različite intenzitete dehidracije uzrokovane isušivanjem supstrata do određenih zapreminskih procentualnih vrednosti: 1 – 15, 2 – 5. Oznake u legendi grafika: K – kontrolna grupa biljaka tretirana destilovanom vodom (ddH<sub>2</sub>O) odnosno MeJA (5 ili 50 µM), D – biljke izlagane dehidraciji tretirane destilovanom vodom (ddH<sub>2</sub>O) odnosno MeJA (5 ili 50 µM), R – rehidratirane biljke tretirane destilovanom vodom (ddH<sub>2</sub>O) odnosno MeJA (5 ili 50 µM). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± standardna greška. Slova ukazuju na statistički značajne razlike na osnovu Fišerovog LSD testa ( $p \leq 0,05$ ) između kontrolnih grupa biljaka, biljaka izlaganih dehidraciji i biljaka podvrgnutih oporavku.

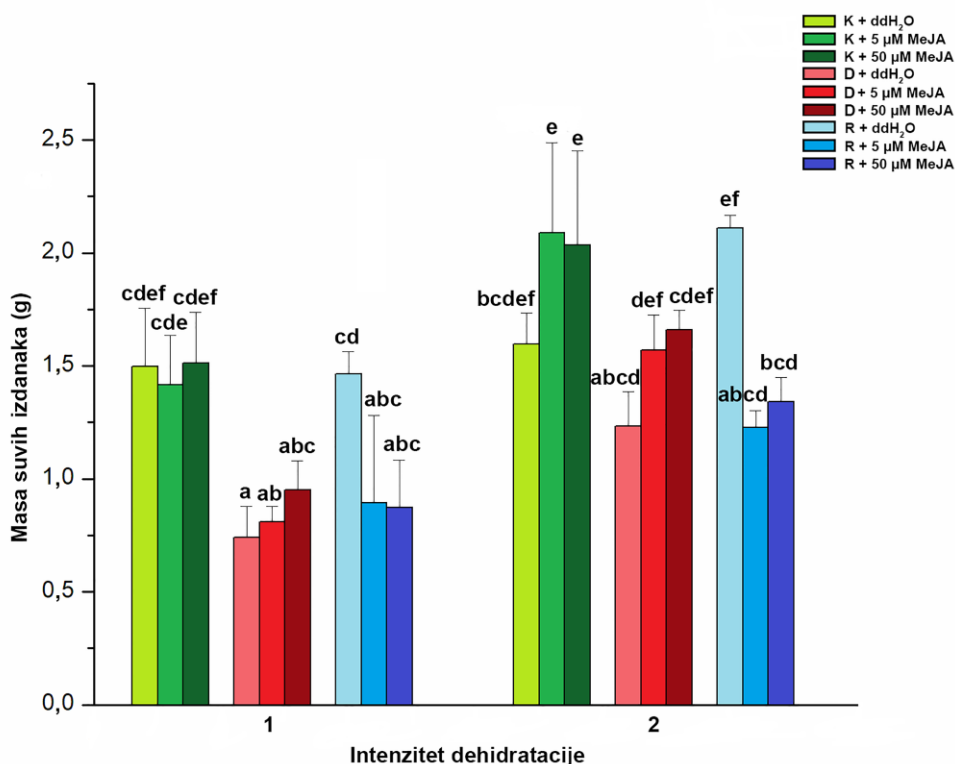
Sličan trend uočen je i prilikom određivanja ukupne površine listova *I. walleriana* pri dehidraciji i rehidraciji (**Grafik 14**). Folijarna primena MeJA u koncentraciji 5 µM neznatno je uticala na povećanje ukupne površine listova kod kontrolne grupe biljaka za oba intenziteta dehidracije. Ukupna površina listova pri vlažnosti supstrata od 15% bila je redukovana za 50,31, 48,27 i 35,82% kod biljaka tretiranih destilovanom vodom, 5 i 50 µM MeJA, u odnosu na kontrolne grupe biljaka tretiranih navedenim elicitorima istim redosledom. Pri vlažnosti supstrata od 15%, najveći uticaj na povećanje ukupne površine listova imala je viša koncentracija MeJA. Pri vlažnosti supstrata od 5% ukupna površina listova redukovana je za 31,77, 31,9 i 32,94% kod biljaka tretiranih destilovanom vodom, 5 µM i 50 µM MeJA, u odnosu na kontrolne grupe biljaka za iste tretmane, dok je u okviru intenziteta dehidracije niža koncentracija MeJA neznatno uticala na povećanje ukupne površine listova. Slično uticaju na masu svežih izdanaka, rehidracija je povećavala ukupnu površinu listova, sa najvećim efektom kod biljaka prethodno tretiranih destilovanom vodom. Povećanje ukupne površine listova za 68,12% u odnosu na dehidraciju, zabeleženo je pri rehidraciji nakon isušivanja supstrata do 15% vlažnosti, dok je povećanje ukupne površine listova pri rehidraciji nakon isušivanja supstrata do 5% vlažnosti iznosilo 57,32%.



**Grafik 14.** Uticaj folijarne primene MeJA na ukupnu površinu listova *I. walleriana* pri dehidraciji i rehidraciji. Brojevi na x osi označavaju različite intenzitete dehidratacije uzrokovane isušivanjem supstrata do određenih zapreminskih procentualnih vrednosti: 1 – 15, 2 – 5. Oznake u legendi grafika: K – kontrolna grupa biljaka tretirana destilovanom vodom (ddH<sub>2</sub>O) odnosno MeJA (5 ili 50 µM), D – biljke izlagane dehidraciji tretirane destilovanom vodom (ddH<sub>2</sub>O) odnosno MeJA (5 ili 50 µM), R – rehidratirane biljke tretirane destilovanom vodom (ddH<sub>2</sub>O) odnosno MeJA (5 ili 50 µM). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± standardna greška. Slova ukazuju na statistički značajne razlike na osnovu Fišerovog LSD testa ( $p \leq 0,05$ ) između kontrolnih grupa biljaka, biljaka izlaganih dehidraciji i biljaka podvrgnutih oporavku.

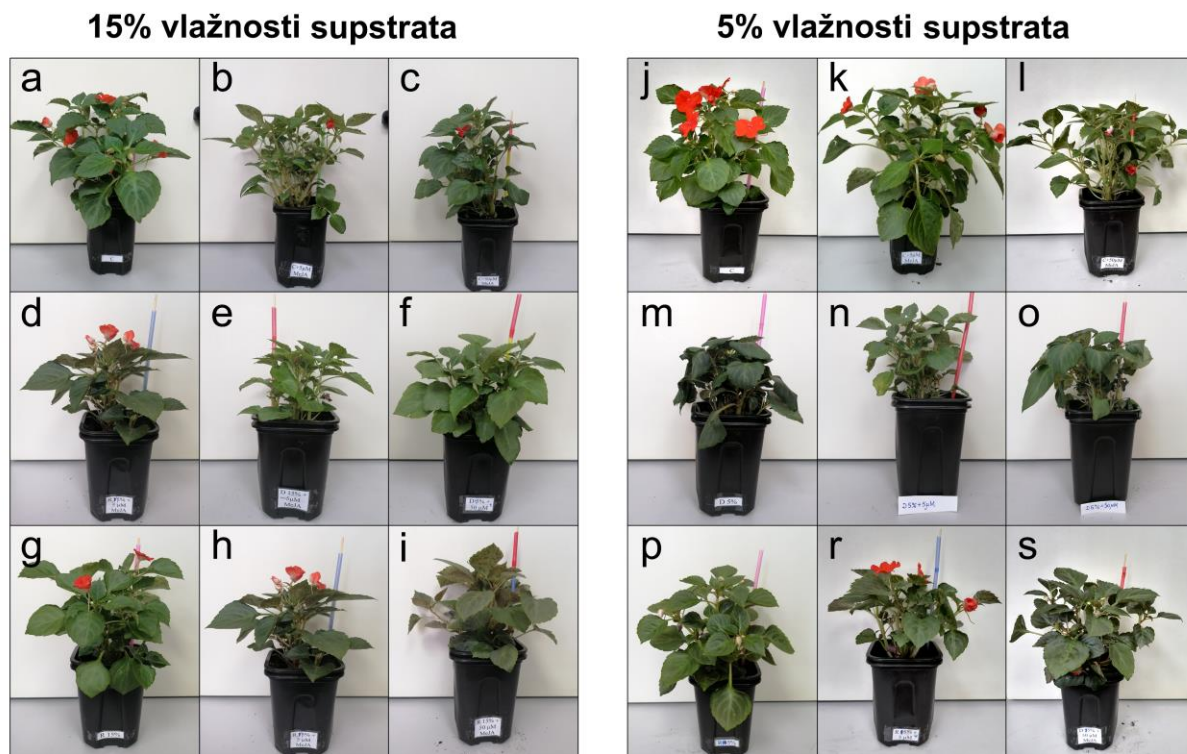
Na **Grafiku 15** predstavljen je uticaj dehidracije, rehidracije i folijarne primene MeJA na masu suvih izdanaka. Masa suvih izdanaka pri vlažnosti supstrata od 15% smanjena je za 50,43, 48,83 i 37,05% kod biljaka tretiranih destilovanom vodom, 5 i 50 µM MeJA, u odnosu na kontrolne grupe biljaka tretiranih navedenim elicitorima prema istom redosledu. Folijarna primena MeJA u koncentracijama od 5 i 50 µM uticala je na povećanje mase suvih izdanaka za 30,89 i 27,51%, kod kontrolne grupe biljaka za drugi intenzitet dehidracije (vlažnosti supstrata od 5%), u poređenju sa kontrolnom grupom biljaka tretiranih destilovanom vodom. Uočeno je se da je u okviru oba intenziteta dehidracije, masa suvih izdanaka bila najveća kod biljaka tretiranih sa 50 µM MeJA, slično efektu na masu svežih izdanaka i ukupnu površinu listova. Pri vlažnosti supstrata od 5% smanjenje mase suvih izdanaka u odnosu na kontrolnu grupu biljaka iznosilo je 22,87, 24,97 i 18,47%, redom za biljke tretirane destilovanom vodom, 5 i 50 µM MeJA. Međutim, u okviru oba intenziteta dehidracije masa suvih izdanaka tretiranih MeJA bila je veća u odnosu na masu suvih izdanaka tretiranih destilovanom vodom. Biljke koje su prethodno tretirane destilovanom vodom i

izlagane dehidraciji, najviše su povećavale suhu masu tokom rehidracije. Povećanje mase suvih izdanaka za 97,27% bilo je primećeno pri rehidraciji nakon isušivanja supstrata do 15% vlažnosti, dok je povećanje od 71,31% zabeleženo tokom rehidracije nakon isušivanja supstrata do 5% vlažnosti. Oporavak biljaka koje su prethodno tretirane 5  $\mu\text{M}$  MeJA i izlagane isušivanju supstrata do 15% vlažnosti, neznatno je uticao na povećanje mase suvih izdanaka. Sa druge strane, rehidracija nakon isušivanja supstrata do 5% vlažnosti uticala je na smanjenje mase suvih izdanaka kod biljaka prethodno tretiranih MeJA.



**Grafik 15.** Uticaj folijarne primene MeJA na masu suvih izdanaka *I. walleriana* pri dehidraciji i rehidraciji. Brojevi na x osi označavaju različite intenzitete dehidracije uzrokovane isušivanjem supstrata do određenih zapreminskih procentualnih vrednosti: 1 – 15, 2 – 5. Oznake u legendi grafika: K – kontrolna grupa biljaka tretirana destilovanom vodom (ddH<sub>2</sub>O) odnosno MeJA (5 ili 50  $\mu\text{M}$ ), D – biljke izlagane dehidraciji tretirane destilovanom vodom (ddH<sub>2</sub>O) odnosno MeJA (5 ili 50  $\mu\text{M}$ ), R – rehidratirane biljke tretirane destilovanom vodom (ddH<sub>2</sub>O) odnosno MeJA (5 ili 50  $\mu\text{M}$ ). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška. Slova ukazuju na statistički značajne razlike na osnovu Fišerovog LSD testa ( $p \leq 0,05$ ) između kontrolnih grupa biljaka, biljaka izlaganih dehidraciji i biljaka podvrgnutih oporavku.

Uticaj folijarne primene MeJA na rastenje i razviće *I. walleriana* pri dehidraciji i rehidraciji, izražen promenama u masi svežih izdanaka i ukupnoj površini listova (**Grafici 13 i 14**), prikazan je na **Slici 40**. Uočeno je da kontrolna grupa biljaka tretirana 5 $\mu\text{M}$  MeJA tokom intenzivne dehidracije (vlažnosti supstrata od 5%) (**Slika 40k**) ima najveću površinu listova u odnosu na ostale kontrolne grupe biljaka. Najdestruktivniji uticaj na rastenje *I. walleriana* ispoljava intenzivna dehidracija (**Slika 40m**), dok rehidracija biljaka prethodno tretiranih destilovanom vodom najviše doprinosi oporavku.

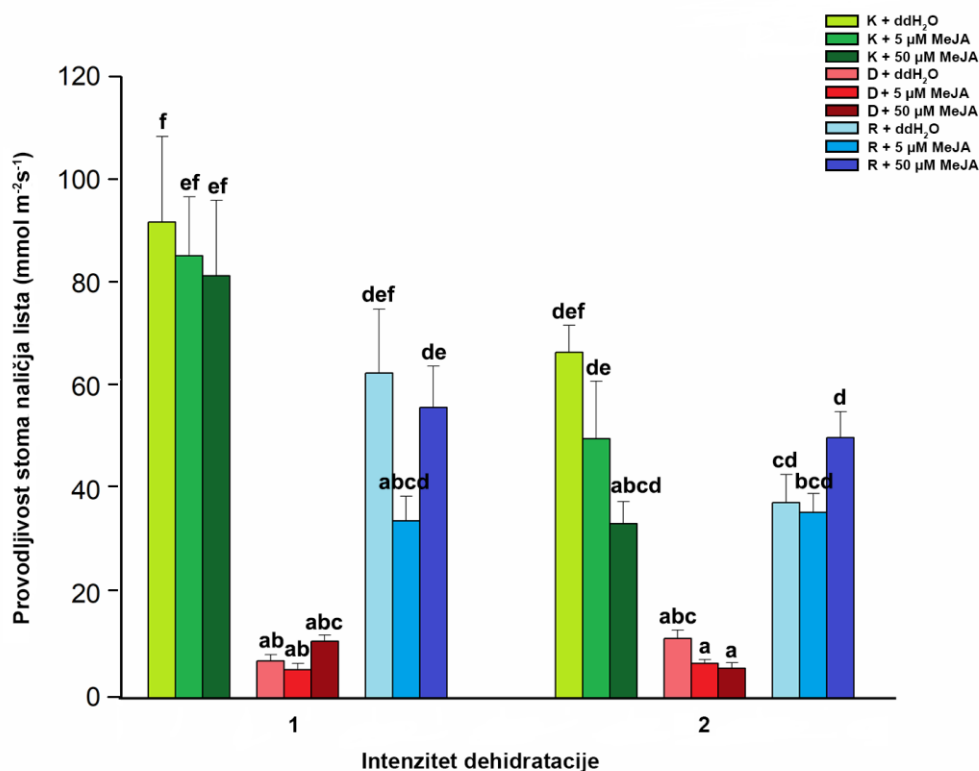


**Slika 40.** Uticaj folijarne primene MeJA na rastenje *I. walleriana* pri vlažnosti supstrata od 15 i 5%. **a i j** – kontrola + ddH<sub>2</sub>O, **b i k** – kontrola + 5  $\mu$ M MeJA, **c i l** – kontrola + 50  $\mu$ M MeJA, **d i m** – dehidracija + ddH<sub>2</sub>O, **e i n** – dehidracija + 5  $\mu$ M MeJA, **f i o** – dehidracija + 50  $\mu$ M MeJA, **g i p** – rehidracija + ddH<sub>2</sub>O, **h i r** – rehidracija + 5  $\mu$ M MeJA, **i i s** – rehidracija + 50  $\mu$ M MeJA.

#### 4.4.2. Uticaj folijarne primene MeJA na provodljivost stoma i ekspresiju ABA metaboličkih gena

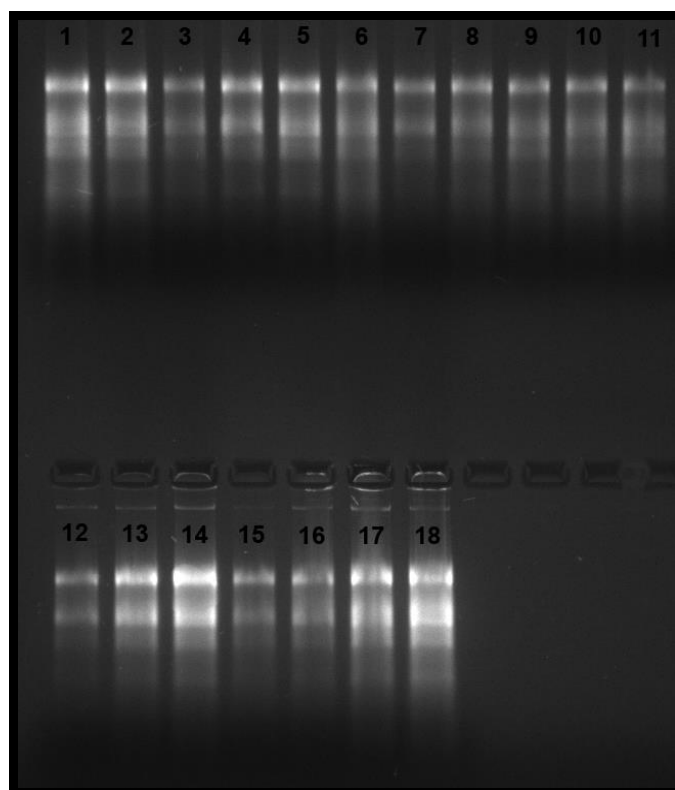
Promene u provodljivosti stoma na naličju listova *I. walleriana* prikazane su na **Grafiku 16**. Na osnovu rezultata uočeno je da primena MeJA u koncentracijama od 5 i 50  $\mu$ M smanjuje provodljivost stoma kod kontrolne grupe biljaka za oba intenziteta dehidracije, u poređenju sa kontrolnim biljkama tretiranim destilovanom vodom. Biljke iz prve kontrolne grupe, tretirane nižom koncentracijom MeJA redukuju provodljivost stoma za 7,11%, dok je redukcija provodljivosti stoma kod biljaka iz druge kontrolne grupe iznosila 24,93%. Elicitacija višom koncentracijom MeJA redukuje provodljivost stoma za 11,28% i 49,54%, kod biljaka iz prve, odnosno druge kontrolne grupe. Pri vlažnosti supstrata od 15% provodljivost stoma je redukovana za 92,22, 93,56 i 86,6%, kod biljaka prethodno tretiranih destilovanom vodom, 5 i 50  $\mu$ M MeJA. Nisu zabeležene značajne razlike u provodljivosti stoma između biljaka tretiranih destilovanom vodom i nižom koncentracijom MeJA. Pri vlažnosti supstrata od 5% provodljivost stoma je redukovana za 82,75, 86,68 i 83,09% kod biljaka prethodno tretiranih destilovanom vodom, 5 i 50  $\mu$ M MeJA, u odnosu na kontrolne grupe biljaka iz istih tretmana elicitanje. Uočeno je da je provodljivost stoma kod dva intenziteta dehidracije bila niža kod biljaka tretiranih MeJA u odnosu na biljke tretirane

destilovanom vodom. Rehidracija biljaka uticala je na povećanje provodljivosti stoma *I. walleriana* u odnosu na grupe biljaka izložene stresu. Povećanje provodljivosti stoma biljaka rehidriranih nakon isušivanja supstrata do 15% vlažnosti bilo je 777,04, 522,42 i 412,78% u odnosu na prethodni tretman destilovanom vodom, 5 i 50  $\mu\text{M}$  MeJA. Povećanje provodljivosti stoma kod grupa biljaka rehidriranih nakon isušivanja supstrata do 5% vlažnosti bilo je 227,45 437,45 i 779,20%, u zavisnosti od prethodnog tretmana destilovanom vodom, 5 i 50  $\mu\text{M}$  MeJA.



**Grafik 16.** Uticaj folijarne primene MeJA na provodljivost stoma naličja lista *I. walleriana* pri dehidraciji i rehidraciji. Brojevi na x osi označavaju različite intenzitete dehidracije uzrokovane isušivanjem supstrata do određenih zapreminskih procentualnih vrednosti: 1 – 15, 2 – 5. Oznake u legendi grafika: K – kontrolna grupa biljaka tretirana destilovanom vodom (ddH<sub>2</sub>O) odnosno MeJA (5 ili 50  $\mu\text{M}$ ), D – biljke izlagane dehidraciji tretirane destilovanom vodom (ddH<sub>2</sub>O) odnosno MeJA (5 ili 50  $\mu\text{M}$ ), R – rehidratirane biljke tretirane destilovanom vodom (ddH<sub>2</sub>O) odnosno MeJA (5 ili 50  $\mu\text{M}$ ). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška. Slova ukazuju na statistički značajne razlike na osnovu Fišerovog LSD testa ( $p \leq 0,05$ ) između kontrolnih grupa biljaka, biljaka izlaganih dehidraciji i biljaka podvrgnutih oporavku.

Nakon izolacije RNK iz 18 uzoraka listova, provereni su kvalitet i čistoća molekula elektroforezom na 1,5% agaroznom gelu (**Slika 41**). Analiza ekspresije gena qPCR metodom potvrdila je visoko specifične i efikasne reakcije amplifikacije analiziranih gena (80-120%).



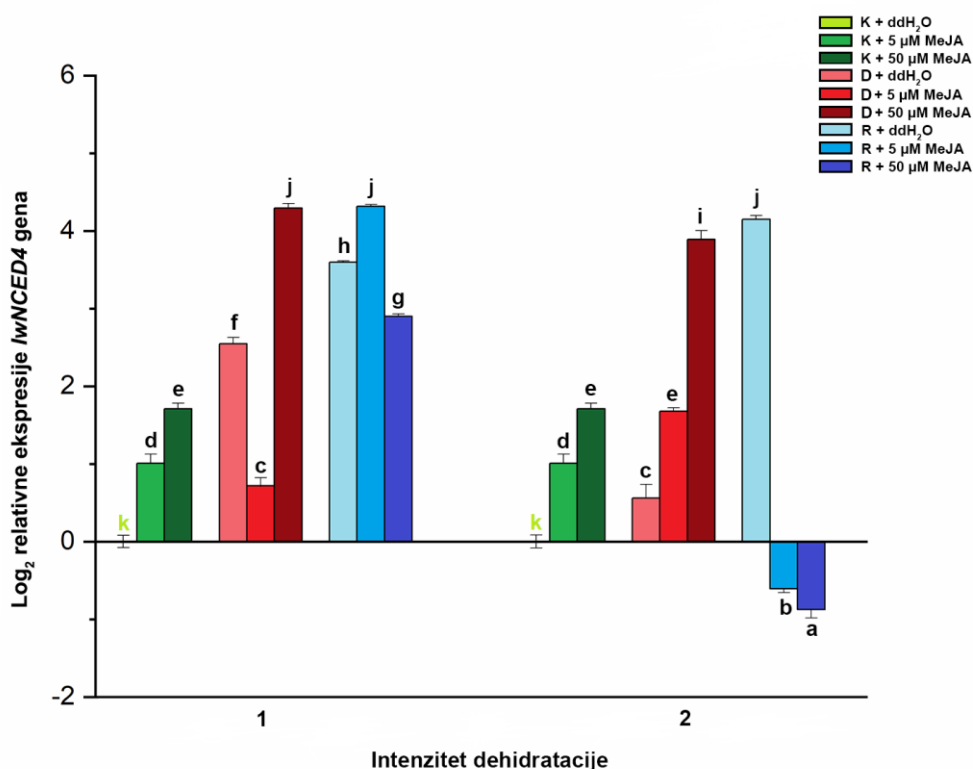
**Slika 41.** Izolovana RNK na 1,5% agaroznom gelu iz listova *I. walleriana*. **1** – kontrola + ddH<sub>2</sub>O, **2** – kontrola + 5 μM MeJA, **3** – kontrola + 50 μM MeJA, **4** – dehidracija (uzrokovana isušivanjem supstrata do 15% vlažnosti) + ddH<sub>2</sub>O, **5** – dehidracija (uzrokovana isušivanjem supstrata do 15% vlažnosti) + 5 μM MeJA, **6** - dehidracija (uzrokovana isušivanjem supstrata do 15% vlažnosti) + 50 μM MeJA, **7** – rehidracija (oporavak nakon isušivanja supstrata do 15% vlažnosti) + ddH<sub>2</sub>O, **8** – rehidracija (oporavak nakon isušivanja supstrata do 15% vlažnosti) + 5 μM MeJA, **9** – rehidracija (oporavak nakon isušivanja supstrata do 15% vlažnosti) + 50 μM MeJA, **10** – kontrola + ddH<sub>2</sub>O, **11** – kontrola + 5 μM MeJA, **12** – kontrola + 50 μM MeJA, **13** – dehidracija (uzrokovana isušivanjem supstrata do 5% vlažnosti) + ddH<sub>2</sub>O, **14** – dehidracija (uzrokovana isušivanjem supstrata do 5% vlažnosti) + 5 μM MeJA, **15** – dehidracija (uzrokovana isušivanjem supstrata do 5% vlažnosti) + 50 μM MeJA, **16** – rehidracija (oporavak nakon isušivanja supstrata do 5% vlažnosti) + ddH<sub>2</sub>O, **17** – rehidracija (oporavak nakon isušivanja supstrata do 5% vlažnosti) + 5 μM MeJA, **18** – rehidracija (oporavak nakon isušivanja supstrata do 5% vlažnosti) + 50 μM MeJA.

Na **Graficima 17, 18 i 19** predstavljena je relativna ekspresija ABA metaboličkih gena *IwNCED4*, *IwAAO2* i *IwABA8ox3* u listovima *I. walleriana* pri dehidraciji i rehidraciji, u zavisnosti od prethodnog tretmana elicitacije. Rezultati su normalizovani u odnosu na referentni gen aktin i izračunati u odnosu na kalibrator – kontrolne biljke tretirane destilovanom vodom.

Na osnovu dobijenih rezultata uočava se da je elicitacija MeJA uticala na povećanje ekspresije *IwNCED4* gena kod kontrolne grupe biljaka, kao i pri izlaganju biljaka dehidraciji. Kontrolne grupe biljaka tretirane višom koncentracijom MeJA imale su veću ekspresiju *IwNCED4* gena u odnosu na biljke tretirane sa 5 μM MeJA. Pri vlažnosti supstrata od 15% najveći uticaj na povećanje ekspresije *IwNCED4* gena imala je viša koncentracija folijarno primenjenog MeJA, dok je pri intenzivnoj dehidraciji zabeležen pozitivan uticaj obe koncentracije elicitora na povećanje ekspresije analiziranog biosintetskog gena. Rehidracija biljaka nakon isušivanja supstrata do 15% vlažnosti ispoljila je neočekivan uticaj na ekspresiju *IwNCED4* gena, tj. povećavala ju je, izuzev kod grupe biljaka tretiranih 50 μM koncentracijom MeJA. Rehidracija biljaka nakon intenzivne



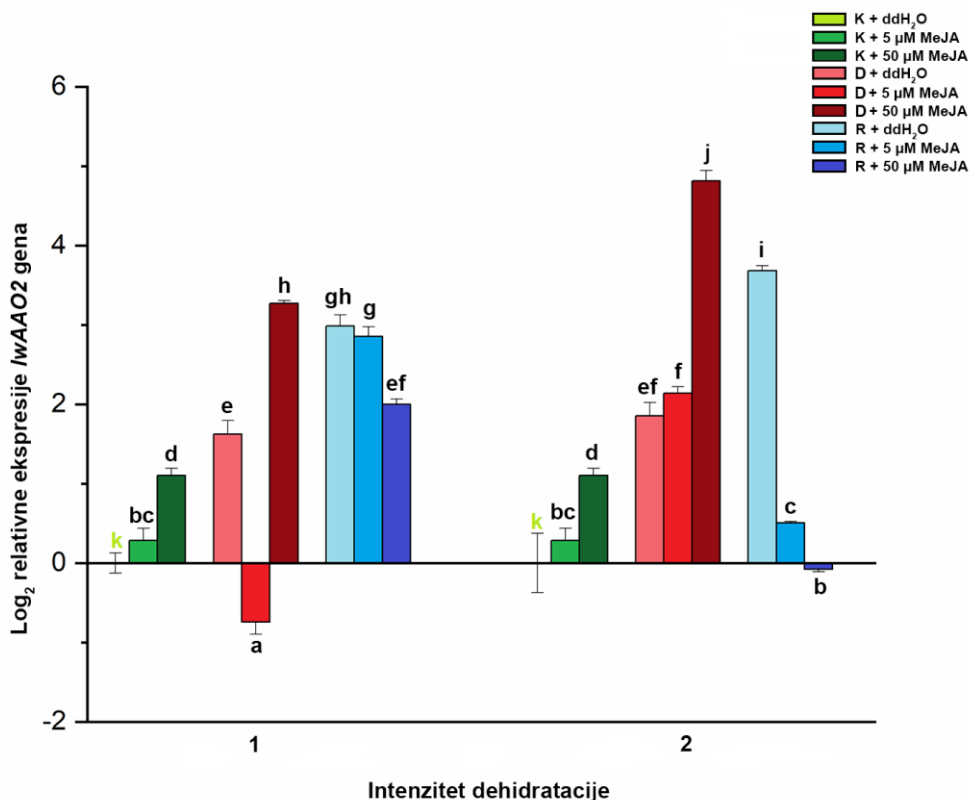
dehidracije redukovala je ekspresiju *IwNCED4* gena kod biljaka elicitiranih sa obe koncentracije MeJA, a povećanje je zabeleženo samo kod biljaka prethodno tretiranih destilovanom vodom.



**Grafik 17.** Relativna ekspresija ABA metaboličkog gena *IwNCED4*. Brojevi na x osi označavaju različite intenzitete dehidracije uzrokovane isušivanjem supstrata do određenih zapreminskih procentualnih vrednosti: 1 – 15, 2 – 5. Oznake u legendi grafika: K – kontrolna grupa biljaka tretirana destilovanom vodom (ddH<sub>2</sub>O) odnosno MeJA (5 ili 50 μM), D – biljke izlagane dehidraciji tretirane destilovanom vodom (ddH<sub>2</sub>O) odnosno MeJA (5 ili 50 μM), R – rehidratirane biljke tretirane destilovanom vodom (ddH<sub>2</sub>O) odnosno MeJA (5 ili 50 μM). Relativna ekspresija gena kvantifikovana qPCR metodom, normalizovana je na gen sa konstitutivnom ekspresijom – aktin i izračunata u odnosu na kalibrator – kontrole tretirane destilovanom vodom obeležene slovom **k**. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± standardna greška dok su statistički značajne razlike između tretmana ( $p < 0,05$ ) obeležene slovima iznad barova.

Slični rezultati zabeleženi su i prilikom analize ekspresije *IwAAO2* gena (**Grafik 18**). Izlaganje biljaka dehidraciji uticalo je na povećanje ekspresije analiziranog gena. Prvi intenzitet dehidracije, odnosno isušivanje supstrata do 15% vlažnosti, značajno je povećao ekspresiju *IwAAO2* gena u listovima *I. walleriana*, izuzev kod biljaka prethodno tretiranih sa 5 μM MeJA. Elicitacija sa 50 μM MeJA imala je najveći uticaj na povećanje ekspresije *IwAAO2* gena pri vlažnosti supstrata od 15%. Intenzivna dehidracija, odnosno isušivanje supstrata do 5% vlažnosti, uticala je na povećanje ekspresije *IwAAO2* gena kod svih tretiranih grupa u poređenju sa kontrolnim grupama biljakama, sa najviše ispoljenim vrednostima kod biljaka iz tretmana elicitanog sa 50 μM MeJA. Proces rehidracije biljaka nakon isušivanja supstrata do 15% vlažnosti, redukovao je ekspresiju *IwAAO2* gena samo kod biljaka prethodno tretiranih 50 μM MeJA, dok je proces

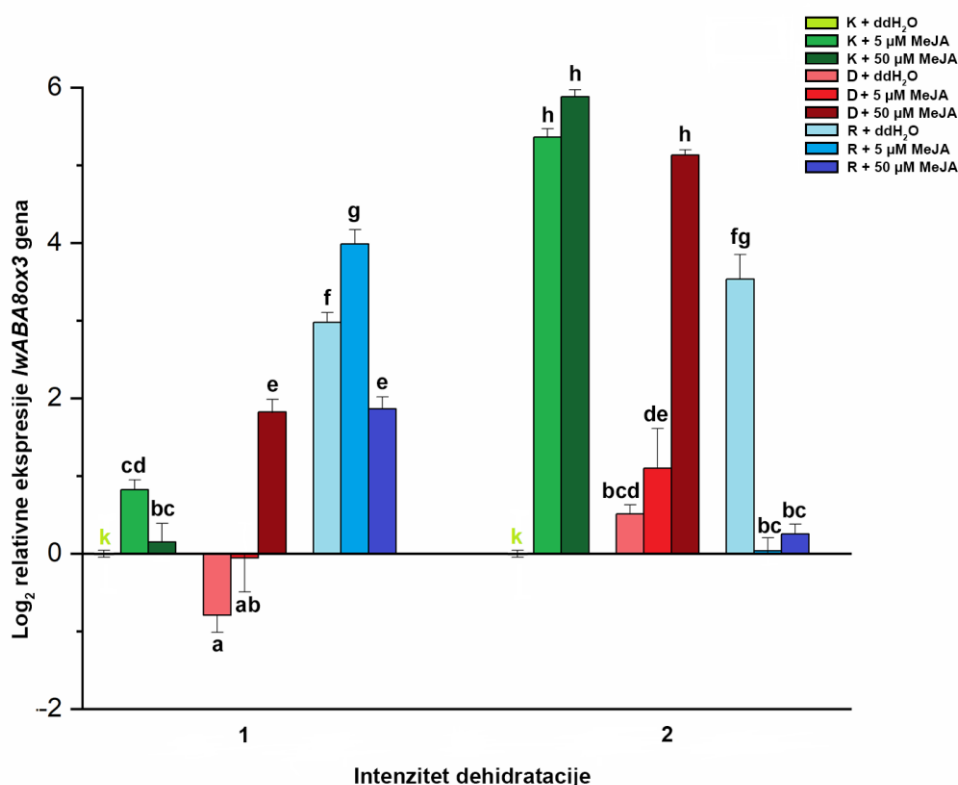
rehidracije nakon isušivanja supstrata do 5% vlažnosti uticao na redukciju ekspresije *IwAAO2* gena kod biljaka tretiranih sa obe koncentracije MeJA.



**Grafik 18.** Relativna ekspresija ABA metaboličkog gena *IwAAO2*. Brojevi na x osi označavaju različite intenzitete dehidracije uzrokovane isušivanjem supstrata do određenih zapreminskih procentualnih vrednosti: 1 – 15, 2 – 5. Oznake u legendi grafika: K – kontrolna grupa biljaka tretirana destilovanom vodom (ddH<sub>2</sub>O) odnosno MeJA (5 ili 50 μM), D – biljke izlagane dehidraciji tretirane destilovanom vodom (ddH<sub>2</sub>O) odnosno MeJA (5 ili 50 μM), R – rehidratirane biljke tretirane destilovanom vodom (ddH<sub>2</sub>O) odnosno MeJA (5 ili 50 μM). Relativna ekspresija gena kvantifikovana qPCR metodom, normalizovana je na gen sa konstitutivnom ekspresijom – aktin i izračunata u odnosu na kalibrator – kontrole tretirane destilovanom vodom obeležene slovom **k**. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± standardna greška dok su statistički značajne razlike između tretmana ( $p < 0,05$ ) obeležene slovima iznad barova.

Relativna ekspresija *IwABA8ox3* gena za katabolizam apscisinske kiseline prikazana je na **Grafiku 19**. Na osnovu rezultata uočeno je da elicitacija MeJA povećava ekspresiju *IwABA8ox3* gena kod obe kontrolne grupe biljaka i to sa najvišim vrednostima detektovanim kod druge kontrolne grupe biljaka. Intenzitet dehidracije, uzrokovan isušivanjem supstrata do 15% vlažnosti redukuje ekspresiju *IwABA8ox3* gena kod biljaka prethodno tretiranih destilovanom vodom i nižom koncentracijom MeJA, dok je zabeležen porast ekspresije *IwABA8ox3* gena kod biljaka prethodno tretiranih višom koncentracijom MeJA. Intenzitet dehidracije, uzrokovan isušivanjem supstrata do 5% vlažnosti, utiče na blagi porast u ekspresiji *IwABA8ox3* gena kod biljaka prethodno tretiranih

destilovanom vodom, dok je ekspresija i dalje redukovana kod biljaka tretiranih sa 5  $\mu\text{M}$  MeJA u odnosu na kontrolnu grupu biljaka. Stepenn ekspresije *IwABA8ox3* gena kod biljaka prethodno tretiranih sa 50  $\mu\text{M}$  MeJA, pri intenzivnoj dehidrataciji nije značajno različit od ekspresije kod kontrolne grupe biljaka. U okviru intenziteta dehidratacije, najveća ekspresija *IwABA8ox3* gena bila je kod biljaka prethodno tretiranih 50  $\mu\text{M}$  MeJA. Rehidratacija biljaka nakon isušivanja supstrata do 15% vlažnosti povećavala je ekspresiju *IwABA8ox3* gena kod biljaka prethodno tretiranih destilovanom vodom i nižom koncentracijom MeJA, dok je rehidratacija biljaka nakon isušivanja supstrata do 5% vlažnosti povećavala ekspresiju ovog gena samo kod biljaka prethodno tretiranih destilovanom vodom.

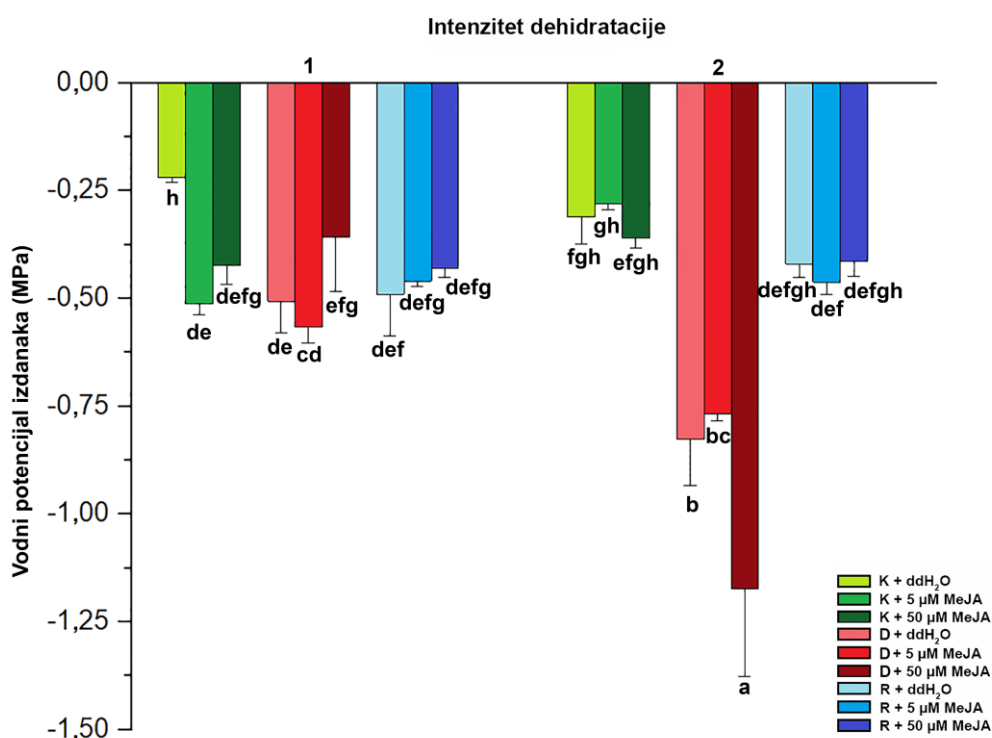


**Grafik 19.** Relativna ekspresija ABA metaboličkog gena *IwABA8ox3*. Brojevi na x osi označavaju različite intenzitete dehidratacije uzrokovane isušivanjem supstrata do određenih zapreminskih procentualnih vrednosti: 1 – 15, 2 – 5. Oznake u legendi grafika: K – kontrolna grupa biljaka tretirana destilovanom vodom (ddH<sub>2</sub>O) odnosno MeJA (5 ili 50  $\mu\text{M}$ ), D – biljke izlagane dehidrataciji tretirane destilovanom vodom (ddH<sub>2</sub>O) odnosno MeJA (5 ili 50  $\mu\text{M}$ ), R – rehidratirane biljke tretirane destilovanom vodom (ddH<sub>2</sub>O) odnosno MeJA (5 ili 50  $\mu\text{M}$ ). Relativna ekspresija gena kvantifikovana qPCR metodom, normalizovana je na gen sa konstitutivnom ekspresijom – aktin i izračunata u odnosu na kalibrator – kontrole tretirane destilovanom vodom obeležene slovom **k**. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška dok su statistički značajne razlike između tretmana ( $p < 0,05$ ) obeležene slovima iznad barova.

#### 4.4.3. Uticaj folijarne primene MeJA na vodni potencijal izdanaka i koncentraciju prolina

Promene u vodnom potencijalu izdanaka *I. walleriana* prikazane su na **Grafiku 20**. Na osnovu dobijenih rezultata, uočeno je da primena elicitora kod kontrolne grupe biljaka utiče na snižavanje vodnog potencijala izdanaka *I. walleriana*, osim u slučaj kontrolne grupe biljaka za intenzivnu dehidrataciju koje su prethodno tretirane 5  $\mu\text{M}$  MeJA. Kod kontrolne grupe biljaka za prvi intenzitet dehidratacije, elicitacija 5  $\mu\text{M}$  MeJA snizila je vodni potencijal izdanaka 133,33%

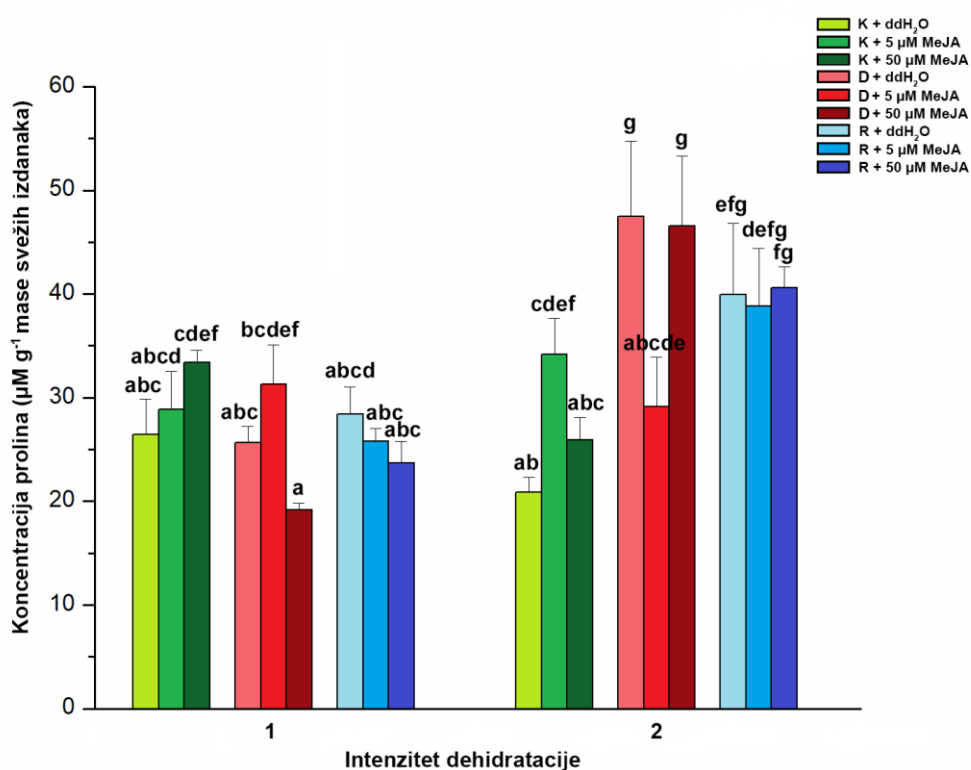
puta, dok je elicitacija 50  $\mu\text{M}$  MeJA snizila vodni potencijal izdanaka 92,42%. U drugoj kontrolnoj grupi biljaka vodni potencijal izdanaka bio je sličan između biljaka tretiranih destilovanom vodom i biljaka tretiranih sa 5  $\mu\text{M}$  MeJA, dok je kod biljaka tretiranih sa 50  $\mu\text{M}$  MeJA vodni potencijal izdanaka bio niži za 16,12% u odnosu na kontrolnu grupu biljaka koje su tretirane destilovanom vodom. Dehidracija uzrokovana isušivanjem supstrata do 15% vlažnosti snizila je vodni potencijal izdanaka 2,30 puta kod biljaka tretiranih destilovanom vodom, u odnosu na vrednosti vodnog potencijala kod kontrolnih biljaka takođe tretiranih destilovanom vodom. Elicitacija sa 5  $\mu\text{M}$  MeJA, uticala je na smanjenje vodnog potencijala za 10,39%, dok je elicitacija višom koncentracijom MeJA uticala na blagi porast (15,75%) vodnog potencijala izdanaka pri vlažnosti supstrata od 15%. Pri vlažnosti supstrata od 5%, vodni potencijal izdanaka *I. walleriana* bio je snižen 2,66, 2,73 i 3,25 puta u zavisnosti od toga da li su biljke prethodno tretirane destilovanom vodom, sa 5 odnosno 50  $\mu\text{M}$  MeJA. Nakon izlaganja biljaka prvom intenzitetu dehidracije, pa potom rehidraciji, uočen je porast vodnog potencijala izdanaka za 3,3 i 18,83% kod grupa biljaka koje su prethodno elicirane destilovanom vodom i sa 5  $\mu\text{M}$  MeJA, dok se vodni potencijal neznatno redukovao kod biljaka prethodno tretiranih sa 50  $\mu\text{M}$  MeJA. Rehidracija biljaka nakon intenzivne dehidracije (vlažnosti supstrata od 5%) povećavala je vrednost vodnog potencijala izdanaka za 49,2, 39,68 i 64,78%, redom za biljke prethodno tretirane destilovanom vodom, 5 tj. 50  $\mu\text{M}$  MeJA.



**Grafik 20.** Uticaj folijarne primene MeJA na vodni potencijal izdanaka *I. walleriana* pri dehidraciji i rehidraciji. Brojevi na x osi označavaju različite intenzitete dehidracije uzrokovane isušivanjem supstrata do određenih zapreminskih procentualnih vrednosti: 1 – 15, 2 – 5. Oznake u legendi grafika: K – kontrolna grupa biljaka tretirana destilovanom vodom (ddH<sub>2</sub>O) odnosno MeJA (5 ili 50 µM), D – biljke izlagane dehidraciji tretirane destilovanom vodom (ddH<sub>2</sub>O) odnosno MeJA (5 ili 50 µM), R – rehidratirane biljke tretirane destilovanom vodom (ddH<sub>2</sub>O) odnosno MeJA (5 ili 50 µM). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± standardna greška. Slova ukazuju na statistički značajne razlike na osnovu Fišerovog LSD testa ( $p \leq 0,05$ ) između kontrolnih grupa biljaka, biljaka izlaganih dehidraciji i biljaka podvrgnutih oporavku.

Na **Grafiku 21** predstavljene su promene u koncentraciji aminokiseline prolina u listovima *I. walleriana* pri dehidraciji i rehidraciji. Na osnovu rezultata uočeno je da je elicitacija MeJA u koncentracijama od 5 i 50 µM, uticala na povećanje koncentracije prolina u listovima kontrolnih grupa biljaka za oba intenziteta dehidracije. Kod kontrolne grupe biljaka za prvi intenzitet dehidracije, elicitacija MeJA u koncentracijama od 5 i 50 µM povećavala je koncentraciju prolina u listovima *I. walleriana* za 9,09 odnosno 26,31%, u poređenju sa biljkama tretiranim destilovanom vodom. Kod kontrolne grupe biljaka za drugi intenzitet dehidracije povećanje koncentracije prolina iznosilo je 63,51 tj. 23,94%, u odnosu na kontrolnu grupu biljaka koje su tretirane destilovanom vodom. Isušivanje supstrata do 15% vlažnosti uticalo je na blagi pad koncentracije prolina u listovima biljaka tretiranih destilovanom vodom, ali zabeležene razlike nisu ispoljile značajnu razliku u poređenju sa kontrolnom grupom biljaka tretiranih destilovanom vodom. Prethodna elicitacija sa 5 µM MeJA uticala je na povećanje koncentracije prolina za 8,42% u listovima *I. walleriana* tokom isušivanja supstrata do 15% vlažnosti. Suprotan uticaj uočen je za višu koncentraciju MeJA, koja je pri istoj količini vlažnosti supstrata uzrokovala pad koncentracije prolina za 42,67%, u odnosu na kontrolnu grupu biljaka iz istog tretmana elicitacije. Prolongirano dejstvo stresa, tj. isušivanje supstrata do 5% vlažnosti, uzrokovalo je dinamičnije promene u

koncentraciji aminokiseline prolina u listovima *I. walleriana*, u odnosu na kontrolnu grupu biljaka iz istih tretmana elicitacije. Koncentracija prolina povećana je za 127,13% puta u listovima biljaka prethodno tretiranih destilovanom vodom, snižena za 14,86% u listovima biljaka prethodno tretiranih sa 5  $\mu\text{M}$  MeJA, odnosno povećana je 79,61% u listovima biljaka prethodno tretiranih sa 50  $\mu\text{M}$  MeJA. Rehidracija biljaka nakon isušivanja supstrata do 15 i 5% imala je sličan trend. Biljke koje su pri dehidraciji imale povećanu koncentraciju prolina, smanjivale su je pri rehidraciji, dok su biljke koje su imale smanjenu koncentraciju prolina pri dehidraciji, istu povećavale tokom rehidracije. Rehidracija biljaka nakon isušivanja supstrata do 15% vlažnosti uticala je na povećanje koncentracije prolina za 10,79% kod biljaka prethodno tretiranih destilovanom vodom, a u isto vreme i na smanjenje za 17,61% kod biljaka prethodno tretiranih sa 5  $\mu\text{M}$  MeJA i povećanje za 23,87% kod biljaka prethodno tretiranih sa 50  $\mu\text{M}$  MeJA. Rehidracija biljaka nakon isušivanja supstrata do 5% vlažnosti uticala je na smanjenje koncentracije prolina za 15,85% kod biljaka prethodno tretiranih destilovanom vodom, a zatim na povećanje za 33,31% kod biljaka prethodno tretiranih sa 5  $\mu\text{M}$  MeJA, odnosno smanjenje za 12,81% kod biljaka prethodno tretiranih sa 50  $\mu\text{M}$  MeJA.



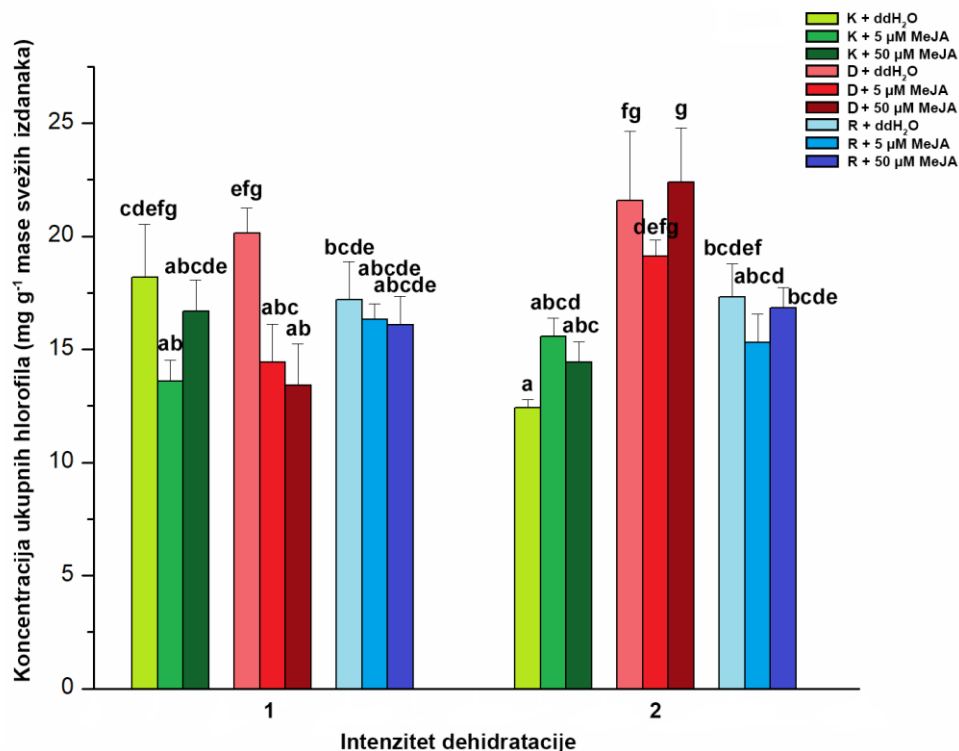
**Grafik 21.** Uticaj folijarne primene MeJA na koncentraciju prolina u listovima *I. walleriana* pri dehidraciji i rehidraciji. Brojevi na x osi označavaju različite intenzitete dehidracije uzrokovane isušivanjem supstrata do određenih zapreminskih procentualnih vrednosti: 1 – 15, 2 – 5. Oznake u legendi grafika: K – kontrolna grupa biljaka tretirana destilovanom vodom (ddH<sub>2</sub>O) odnosno MeJA (5 ili 50  $\mu\text{M}$ ), D – biljke izlagane dehidraciji tretirane destilovanom vodom (ddH<sub>2</sub>O) odnosno MeJA (5 ili 50  $\mu\text{M}$ ), R – rehidratirane biljke tretirane destilovanom vodom (ddH<sub>2</sub>O) odnosno MeJA (5 ili 50  $\mu\text{M}$ ). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška. Slova ukazuju na statistički značajne razlike na osnovu Fišerovog LSD testa ( $p \leq 0,05$ ) između kontrolnih grupa biljaka, biljaka izlaganih dehidraciji i biljaka podvrgnutih oporavku.

#### 4.4.4. Uticaj folijarne primene MeJA na koncentraciju fotosintetičkih pigmenata

Koncentracija ukupnog hlorofila, odnos hlorofila a/b i koncentracija ukupnih karotenoida prikazani su na **Graficima 22, 23 i 24**.

Elicitacija sa 5 i 50  $\mu\text{M}$  MeJA kod kontrolne grupe biljaka za prvi intenzitet dehidracije uticala je smanjenje ukupne koncentracije hlorofila za 23,84 odnosno 8,4%, u poređenju sa kontrolnom grupom biljaka tretiranih destilovanom vodom (**Grafik 22**). Kod kontrolne grupe biljaka za drugi intenzitet dehidracije uočen je suprotan uticaj, tj. povećanje ukupne koncentracije hlorofila za 25,52 odnosno 16,23% u odnosu na kontrolnu grupu biljaka koje su tretirane destilovanom vodom. Dehidracija uzrokovana isušivanjem supstrata do 15% vlažnosti uticala je na povećanje ukupne koncentracije hlorofila za 10,66 tj. 4,09% kod biljaka prethodno tretiranih destilovanom vodom odnosno 5  $\mu\text{M}$  MeJA, dok se smanjenje od 19,64% beleži kod biljaka prethodno tretiranih 50  $\mu\text{M}$  MeJA u odnosu na kontrolne grupe biljaka. Intenzivna dehidracija uzrokovana isušivanjem supstrata do 5% vlažnosti povećavala je koncentraciju hlorofila za 73,90, 22,70 i 55,21% kod biljaka prethodno tretiranih destilovanom vodom, 5 i 50  $\mu\text{M}$  MeJA, u odnosu na kontrolne grupe biljaka tretirane istim elicitorima. U okviru drugog intenziteta dehidracije, najveće povećanje koncentracije ukupnih hlorofila zabeleženo je kod biljaka tretiranih višom koncentracijom MeJA. Rehidracija biljaka nakon isušivanja supstrata do 15% vlažnosti uticala je na smanjenje koncentracije ukupnih hlorofila za 14,6% u listovima biljaka prethodno tretiranih destilovanom vodom, dok je uticaj prethodne elicitacije sa obe primenjene koncentracije MeJA uticao na blagi porast koncentracije ukupnih hlorofila. Rehidracija biljaka nakon isušivanja supstrata do 5% vlažnosti smanjila je koncentraciju ukupnih hlorofila za 19,76, 19,94 i 24,79% za biljke prethodno tretirane destilovanom vodom, 5 i 50  $\mu\text{M}$  MeJA.

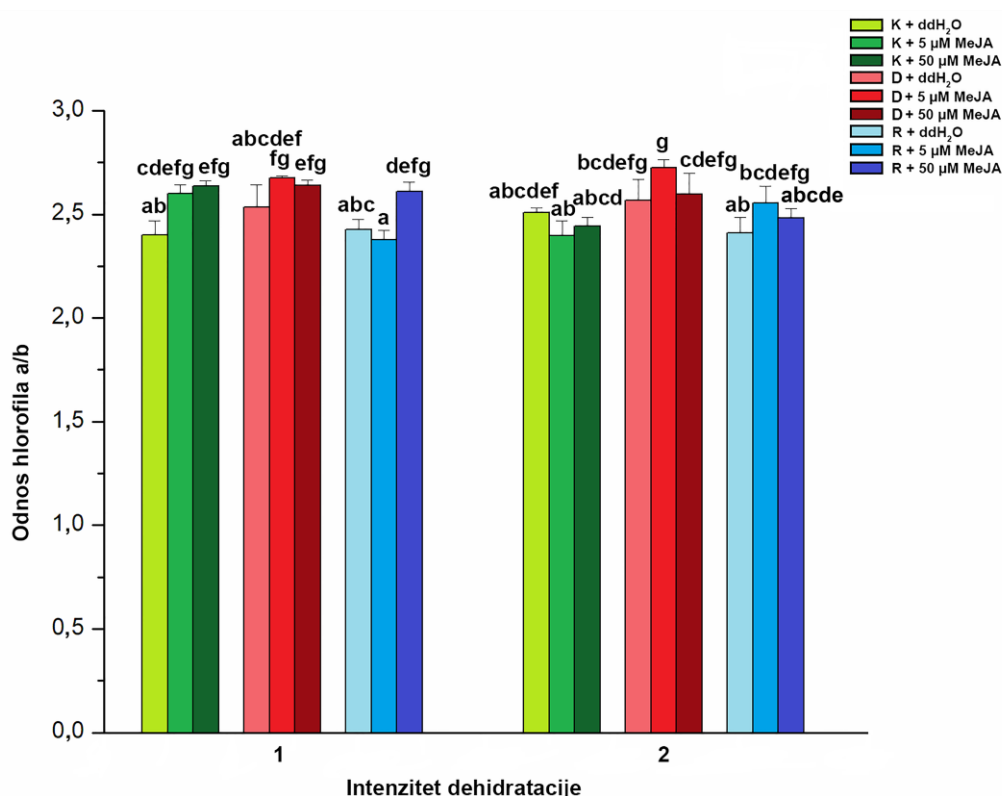




**Grafik 22.** Uticaj folijarne primene MeJA na koncentraciju ukupnih hlorofila u listovima *I. walleriana* pri dehidraciji i rehidraciji. Brojevi na x osi označavaju različite intenzitete dehidracije uzrokovane isušivanjem supstrata do određenih zapreminskih procentualnih vrednosti: 1 – 15, 2 – 5. Oznake u legendi grafika: K – kontrolna grupa biljaka tretirana destilovanom vodom (ddH<sub>2</sub>O) odnosno MeJA (5 ili 50 μM), D – biljke izlagane dehidraciji tretirane destilovanom vodom (ddH<sub>2</sub>O) odnosno MeJA (5 ili 50 μM), R – rehidratirane biljke tretirane destilovanom vodom (ddH<sub>2</sub>O) odnosno MeJA (5 ili 50 μM). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± standardna greška. Slova ukazuju na statistički značajne razlike na osnovu Fišerovog LSD testa ( $p \leq 0,05$ ) između kontrolnih grupa biljaka, biljaka izlaganih dehidraciji i biljaka podvrgnutih oporavku.

Na **Grafiku 23** predstavljen je odnos hlorofila a/b u listovima *I. walleriana* pri dehidraciji i rehidraciji, a u zavisnosti od prethodnog tretmana elicitacije. Elicitacija sa 5 i 50 μM MeJA povećala je odnos hlorofila a/b kod kontrolne grupe biljaka za prvi intenzitet dehidracije za 8,29 i 9,86% u odnosu na kontrolnu grupu biljaka koje su tretirane destilovanom vodom. Sa druge strane, elicitacija MeJA smanjila je odnos hlorofila a/b kod kontrolne grupe biljaka za drugi intenzitet dehidracije za 4,54 i 2,63%, za nižu i višu koncentraciju MeJA. Pri vlažnosti supstrata od 15% u biljkama prethodno tretiranim destilovanom vodom i sa 5 μM MeJA zapažen je povišen odnos hlorofila a/b za 5,63 i 2,90%, dok elicitacija sa 50 μM MeJA nije uticala na ispoljavanje značajnih razlika u odnosu na kontrolnu grupu biljaka koje su tretirane istom koncentracijom elicitora. Izlaganje biljaka intenzivnoj dehidraciji, odnosno isušivanju supstrata do 5% vlažnosti, uticalo je na povećanje odnosa hlorofila a/b kod svih tretiranih grupa biljaka u odnosu na kontrolne grupe biljaka iz istog tretmana elicitacije. Povišen odnos hlorofila a/b u vrednosti od 2,33, 13,78 i 6,28% zabeležen je kod biljaka prethodno tretiranih destilovanom vodom, sa 5 i 50 μM MeJA. Rehidracija biljaka nakon isušivanja supstrata do 15% vlažnosti uticala je na smanjenje odnosa hlorofila a/b za 4,09, 11,13 i 1,08%, dok je rehidracija biljaka nakon isušivanja supstrata do 5%

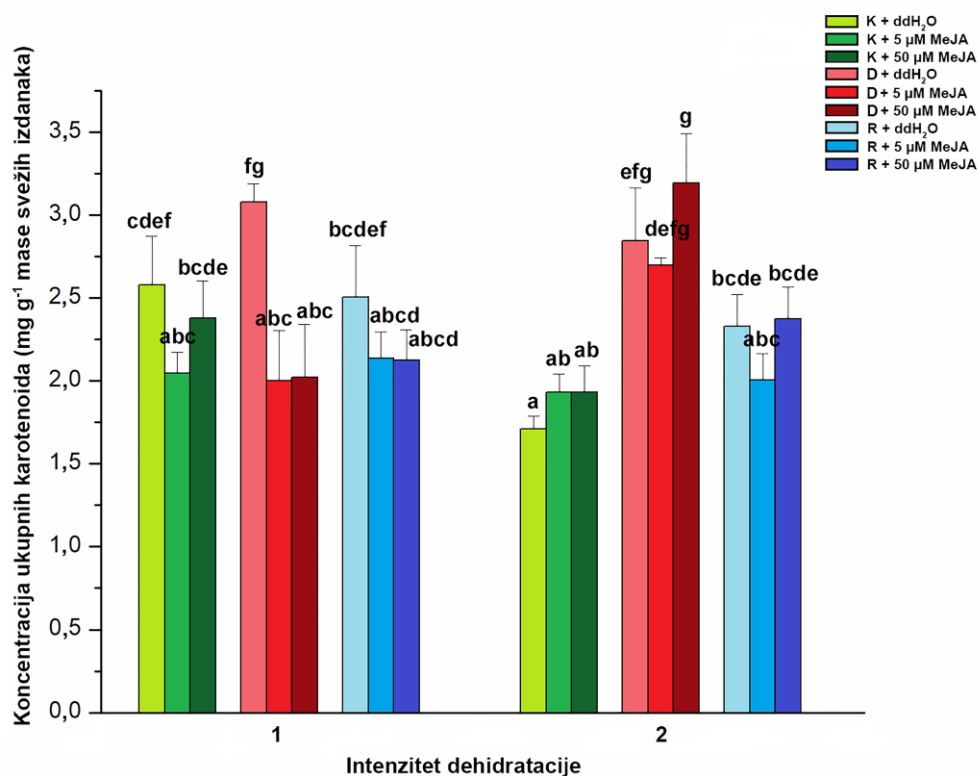
vlažnosti, smanjila odnos hlorofila a/b za 6,22, 6,27 i 4,41%, u poređenju sa biljkama izloženim stresu iz istog tretmana elicitacije.



**Grafik 23.** Uticaj folijarne primene MeJA na odnos hlorofila a/b u listovima *I. walleriana* pri dehidraciji i rehidraciji. Brojevi na x osi označavaju različite intenzitete dehidracije uzrokovane isušivanjem supstrata do određenih zapreminskih procentualnih vrednosti: 1 – 15, 2 – 5. Oznake u legendi grafika: K – kontrolna grupa biljaka tretirana destilovanom vodom (ddH<sub>2</sub>O) odnosno MeJA (5 ili 50 µM), D – biljke izlagane dehidraciji tretirane destilovanom vodom (ddH<sub>2</sub>O) odnosno MeJA (5 ili 50 µM), R – rehidratirane biljke tretirane destilovanom vodom (ddH<sub>2</sub>O) odnosno MeJA (5 ili 50 µM). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± standardna greška. Slova ukazuju na statistički značajne razlike na osnovu Fišerovog LSD testa ( $p \leq 0,05$ ) između kontrolnih grupa biljaka, biljaka izlaganih dehidraciji i biljaka podvrgnutih oporavku.

Koncentracija ukupnih karotenoida u listovima *I. walleriana* prikazana je na **Grafiku 24**. Sličan trend promene koncentracije ukupnih karotenoida uočeno je u odnosu na promenu koncentracije ukupnog hlorofila. Zabeležen je pad koncentracije ukupnih karotenoida za 20,73% i 7,87% kod kontrolne grupe biljaka za prvi intenzitet dehidracije, tretiranih sa 5 i 50 µM MeJA, u odnosu na kontrolnu grupu biljaka tretiranih destilovanom vodom. Suprotan uticaj uočeno je kod kontrolne grupe biljaka za drugi intenzitet dehidracije, kod kojih elicitacija sa obe primenjene koncentracije MeJA indukuje blagi porast koncentracije ukupnih karotenoida u listovima *I. walleriana*. Prvi intenzitet dehidracije uzrokovan isušivanjem supstrata do 15% vlažnosti uticao je na povećanje koncentracije ukupnih karotenoida za 19,25% samo kod biljaka prethodno tretiranih destilovanom vodom, u poređenju sa kontrolnim biljkama takođe tretiranim destilovanom vodom. Elicitacija sa 5 µM MeJA nije rezultovala značajnim promenama u koncentraciji ukupnih karotenoida, dok je elicitacija sa 50 µM MeJA redukovala ukupne karotenoide za 15,02% u poređenju sa kontrolnom grupom biljaka iz istog tretmana elicitacije. Izlaganje biljaka intenzivnoj dehidraciji, odnosno isušivanju supstrata do 5% vlažnosti, indukovala je porast koncentracije

ukupnih karotenoida kod svih tretiranih grupa biljaka u poređenju sa kontrolnim grupama biljaka iz istih tretmana elicitacije. Povećanje koncentracije ukupnih karotenoida iznosilo je 66,27, 39,59 i 65,27% kod biljaka koje su prethodno tretirane destilovanom vodom i sa 5 i 50  $\mu\text{M}$  MeJA, s tim što je u okviru ove grupe najveći uticaj imala viša koncentracija MeJA. Rehidratacija biljaka koje su tretirane destilovanom vodom, nakon isušivanja supstrata do 15% vlažnosti, uticala je na smanjenje koncentracije ukupnih karotenoida za 18,58%, dok je rehidratacija biljaka prethodno tretiranih sa obe koncentracije MeJA uticala na blagi porast ukupnih karotenoida u listovima *I. walleriana*. Rehidratacija biljaka nakon isušivanja supstrata do 5% vlažnosti, uticala je na redukciju koncentracije ukupnih karotenoida za 18,17, 25,64 i 25,62% za biljke koje su prethodno tretirane destilovanom vodom, sa 5 i 50  $\mu\text{M}$  MeJA.

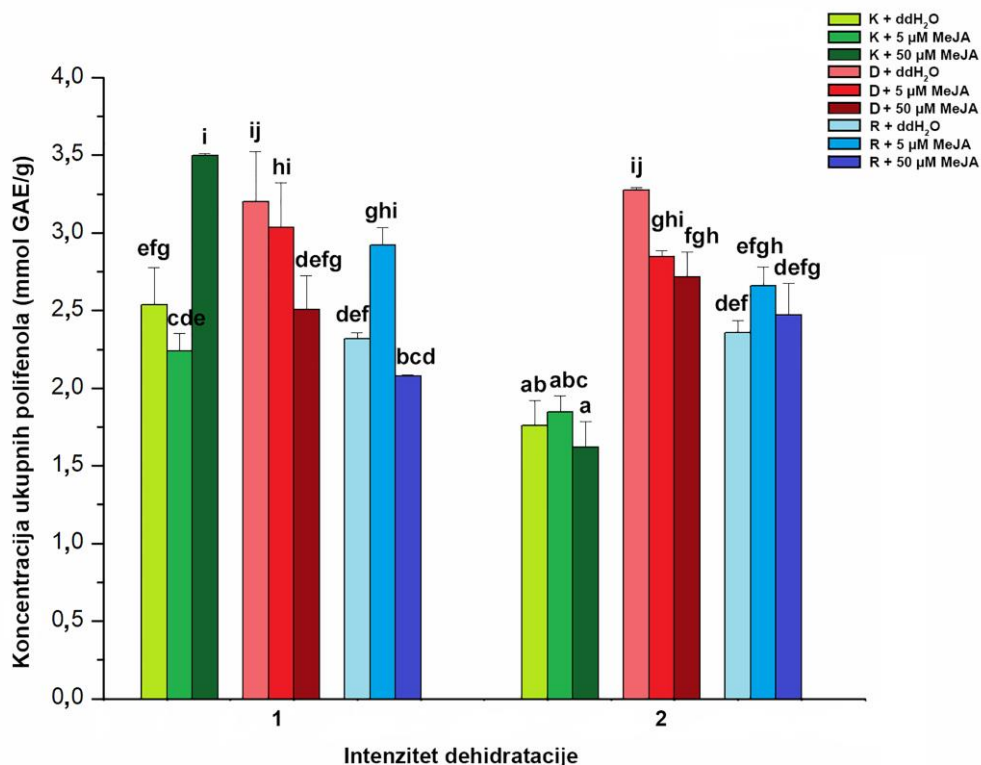


**Grafik 24.** Uticaj folijarne primene MeJA na koncentraciju ukupnih karotenoida u listovima *I. walleriana* pri dehidraciji i rehidraciji. Brojevi na x osi označavaju različite intenzitete dehidracije uzrokovane isušivanjem supstrata do određenih zapreminskih procentualnih vrednosti: 1 – 15, 2 – 5. Oznake u legendi grafika: K – kontrolna grupa biljaka tretirana destilovanom vodom (ddH<sub>2</sub>O) odnosno MeJA (5 ili 50  $\mu\text{M}$ ), D – biljke izlagane dehidraciji tretirane destilovanom vodom (ddH<sub>2</sub>O) odnosno MeJA (5 ili 50  $\mu\text{M}$ ), R – rehidratirane biljke tretirane destilovanom vodom (ddH<sub>2</sub>O) odnosno MeJA (5 ili 50  $\mu\text{M}$ ). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška. Slova ukazuju na statistički značajne razlike na osnovu Fišerovog LSD testa ( $p \leq 0,05$ ) između kontrolnih grupa biljaka, biljaka izlaganih dehidraciji i biljaka podvrgnutih oporavku.

#### 4.4.5. Uticaj folijarne primene MeJA na koncentraciju ukupnih polifenola, flavonola i antioksidativni kapacitet

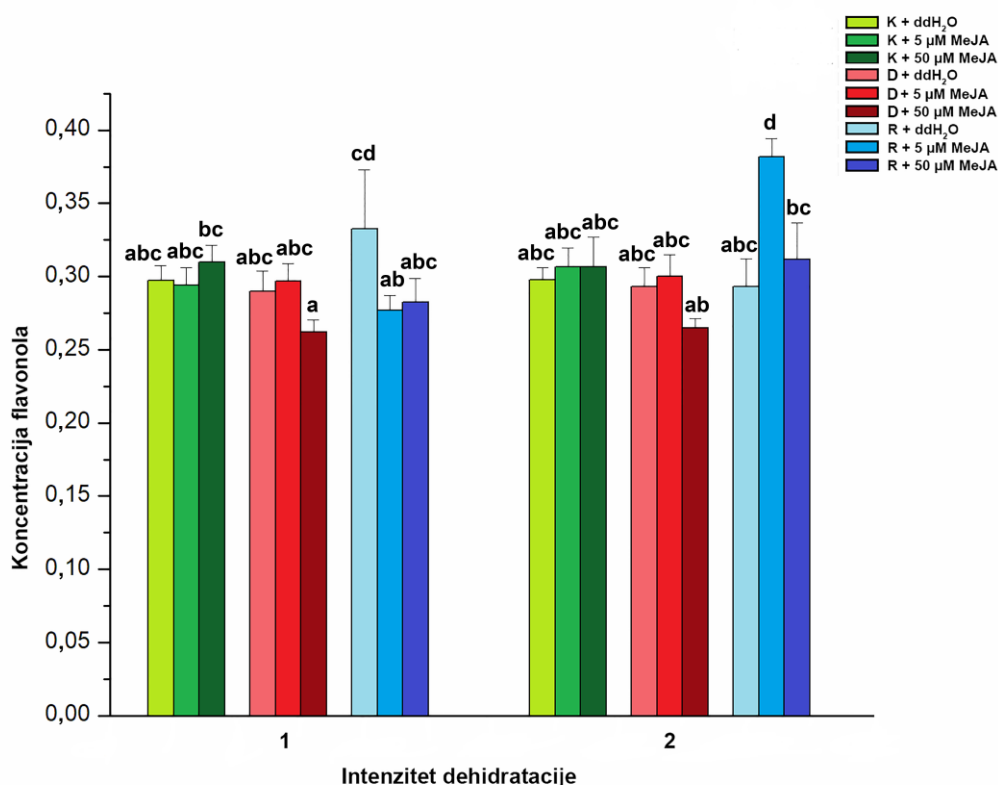
Rezultati spektrofotometrijske analize ukupnih polifenola, flavonola i antioksidativnog kapaciteta u listovima *I. walleriana* predstavljeni su na **Graficima 25, 26 i 27**.

Nakon folijarne primene 5  $\mu\text{M}$  MeJA koncentracija ukupnih polifenola opala je za 11,68% u kontrolnoj grupi biljaka za prvi intenzitet dehidracije, dok je elicitacija višom koncentracijom MeJA indukovala porast za 37,90% (**Grafik 25**). U drugoj kontrolnoj grupi biljaka zabeležen je blagi porast ukupnih polifenola kod biljaka prethodno tretiranih sa 5  $\mu\text{M}$  MeJA, dok je blagi pad zabeležen kod biljaka prethodno tretiranih višom koncentracijom MeJA. Dehidracija uzrokovana isušivanjem supstrata do 15% vlažnosti, povećavala je koncentraciju ukupnih polifenola za 26,13 i 35,37% kod biljaka prethodno tretiranih destilovanom vodom i sa 5  $\mu\text{M}$  MeJA. Prethodna elicitacija sa 50  $\mu\text{M}$  MeJA rezultovala je smanjenjem ukupnih polifenola za 28,36% pri vlažnosti supstrata od 15%, u odnosu na kontrolnu grupu biljaka koja je tretirana na isti način. Intenzivna dehidracija, odnosno redukovanje količine vlažnosti supstrata do 5%, značajno je povećalo koncentraciju ukupnih polifenola kod svih tretiranih grupa biljaka. Biljke prethodno tretirane destilovanom vodom, kao i sa 5 i 50  $\mu\text{M}$  MeJA, povećavale su koncentraciju ukupnih polifenola za 86,16, 54,30 i 67,90%, u poređenju sa kontrolnim grupama biljaka iz istih tretmana elicitacije. Rehidracija *I. walleriana* nakon isušivanja supstrata do 15% vlažnosti dovela je do smanjenja koncentracije ukupnih polifenola za 27,57, 3,66 i 17,10% u poređenju sa biljkama izloženim dehidraciji, dok je rehidracija biljaka nakon isušivanja supstrata do 5% vlažnosti redukovala analizirani parametar za 27,96, 6,69 i 9,05%.



**Grafik 25.** Uticaj folijarne primene MeJA na koncentraciju ukupnih polifenola u listovima *I. walleriana* pri dehidraciji i rehidraciji. Brojevi na x osi označavaju različite intenzitete dehidracije uzrokovane isušivanjem supstrata do određenih zapreminskih procentualnih vrednosti: 1 – 15, 2 – 5. Oznake u legendi grafika: K – kontrolna grupa biljaka tretirana destilovanom vodom (ddH<sub>2</sub>O) odnosno MeJA (5 ili 50 µM), D – biljke izlagane dehidraciji tretirane destilovanom vodom (ddH<sub>2</sub>O) odnosno MeJA (5 ili 50 µM), R – rehidratirane biljke tretirane destilovanom vodom (ddH<sub>2</sub>O) odnosno MeJA (5 ili 50 µM). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± standardna greška. Slova ukazuju na statistički značajne razlike na osnovu Fišerovog LSD testa ( $p \leq 0,05$ ) između kontrolnih grupa biljaka, biljaka izlaganih dehidraciji i biljaka podvrgnutih oporavku.

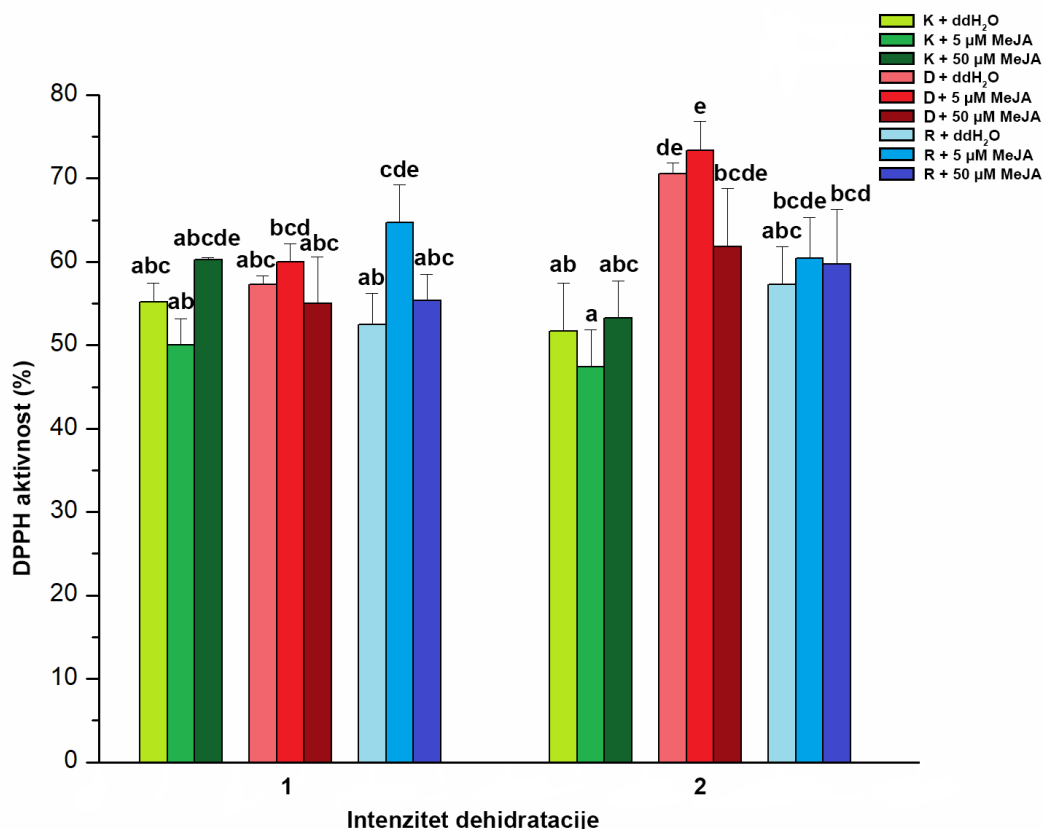
Koncentracija flavonola u listovima *I. walleriana* prikazana je na **Grafiku 26**. Na osnovu prikazanih rezultata uočeno je da jedino elicitacija sa 50 µM MeJA utiče na blagi porast koncentracije flavonola kod kontrolne grupe biljaka za prvi intenzitet dehidracije i to za 4,20%, u poređenju sa kontrolnom grupom biljaka tretiranih destilovanom vodom. Prvi intenzitet dehidracije uzrokovan isušivanjem supstrata do 15% vlažnosti, uticao je na smanjenje koncentracije flavonola samo kod biljaka prethodno tretiranih sa 50 µM MeJA, i to za 15,49%. Biljke prethodno tretirane destilovanom vodom i sa 5 µM MeJA nisu ispoljavale značajne promene u koncentraciji flavonola u poređenju sa kontrolnim grupama biljaka tretiranim istim elicitorima. Smanjenje koncentracije flavonola pri vlažnosti supstrata od 5%, takođe je zabeleženo samo kod biljaka prethodno tretiranih sa 50 µM MeJA, u odnosu na kontrolnu grupu biljaka iz istog tretmana elicitacije. Rehidracija biljaka nakon isušivanja supstrata do 15% vlažnosti, uticala je na povećanje flavonola samo kod biljaka prethodno tretiranih destilovanom vodom za 14,65%, dok je rehidracija biljaka nakon isušivanja supstrata do 5% vlažnosti, najviše uticala na povećanje flavonola kod biljaka prethodno tretiranih sa 5 µM MeJA, i to za 27,33%.



**Grafik 26.** Uticaj folijarne primene MeJA na koncentraciju flavonola u listovima *I. walleriana* pri dehidraciji i rehidraciji. Brojevi na x osi označavaju različite intenzitete dehidracije uzrokovane isušivanjem supstrata do određenih zapreminskih procentualnih vrednosti: 1 – 15, 2 – 5. Oznake u legendi grafika: K – kontrolna grupa biljaka tretirana destilovanom vodom (ddH<sub>2</sub>O) odnosno MeJA (5 ili 50 μM), D – biljke izlagane dehidraciji tretirane destilovanom vodom (ddH<sub>2</sub>O) odnosno MeJA (5 ili 50 μM), R – rehidratirane biljke tretirane destilovanom vodom (ddH<sub>2</sub>O) odnosno MeJA (5 ili 50 μM). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± standardna greška. Slova ukazuju na statistički značajne razlike na osnovu Fišerovog LSD testa ( $p \leq 0,05$ ) između kontrolnih grupa biljaka, biljaka izlaganih dehidraciji i biljaka podvrgnutih oporavku.

Na osnovu rezultata dobijenih DPPH testom, na **Grafiku 27** prikazan je antioksidativni kapacitet sekundarnih metabolita u listovima *I. walleriana* pri različitim intenzitetima dehidracije i tokom rehidracije, a u zavisnosti od prethodnog tretmana elicitacije. Sličan trend promene antioksidativnog kapaciteta uočava se kod obe kontrolne grupe biljaka. Naime, elicitacija sa 5 μM MeJA uticala je na blagi pad antioksidativnog kapaciteta sekundarnih metabolita, za 9,32 i 8,24% kod prve, odnosno druge kontrolne grupe biljaka, u poređenju sa kontrolnim grupama biljaka tretiranih destilovanom vodom. Sa druge strane, elicitacija sa 50 μM MeJA blago je povećavala antioksidativni kapacitet biljaka za 9,12 i 3,07% kod prve, odnosno druge kontrolne grupe biljaka. Pri vlažnosti supstrata od 15%, biljke prethodno tretirane destilovanom vodom ne ispoljavaju značajne promene u antioksidativnom kapacitetu u poređenju sa kontrolnom grupom biljaka tretiranih destilovanom vodom. Pri istoj količini vlažnosti supstrata, biljke prethodno tretirane sa 5 μM MeJA povećavaju antioksidativni kapacitet za 19,77%, dok biljke prethodno tretirane sa 50 μM MeJA smanjuju antioksidativni kapacitet za 8,74%, u poređenju sa kontrolnim grupama biljaka tretiranih istim koncentracijama elicitora. Pri vlažnosti supstrata od 5%, kod svih grupa biljaka izloženih dehidraciji primećuje se porast antioksidativnog kapaciteta. Povećanje antioksidativnog

kapaciteta za 36,61, 54,71 i 16,02% zabeleženo je kod biljaka prethodno tretiranih destilovanom vodom, sa 5 i 50  $\mu\text{M}$  MeJA. Rehidracija *I. walleriana* nakon isušivanja supstrata do 15% vlažnosti uticala je na blago smanjenje antioksidativnog kapaciteta kod biljaka prethodno tretiranih destilovanom vodom, odnosno na blagi porast kod biljaka prethodno tretiranih sa 5  $\mu\text{M}$  MeJA. Sa druge strane, rehidracija *I. walleriana* nakon isušivanja supstrata do 5% vlažnosti, uticala je na smanjenje antioksidativnog kapaciteta za 18,79, 17,6 i 3,31%, kod grupa biljaka prethodno tretiranih destilovanom vodom, sa 5 i 50  $\mu\text{M}$  MeJA.



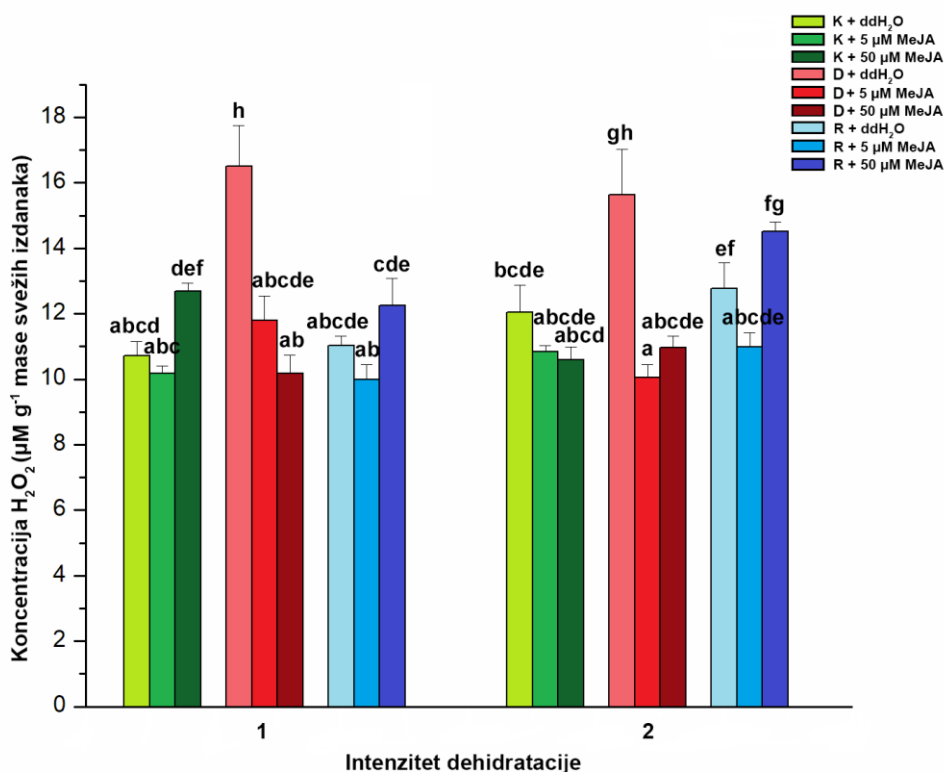
**Grafik 27.** Uticaj folijarne primene MeJA na DPPH aktivnost u listovima *I. walleriana* pri dehidraciji i rehidraciji. Brojevi na x osi označavaju različite intenzitete dehidracije uzrokovane isušivanjem supstrata do određenih zapreminskih procentualnih vrednosti: 1 – 15, 2 – 5. Oznake u legendi grafika: K – kontrolna grupa biljaka tretirana destilovanom vodom (ddH<sub>2</sub>O) odnosno MeJA (5 ili 50  $\mu\text{M}$ ), D – biljke izlagane dehidraciji tretirane destilovanom vodom (ddH<sub>2</sub>O) odnosno MeJA (5 ili 50  $\mu\text{M}$ ), R – rehidratirane biljke tretirane destilovanom vodom (ddH<sub>2</sub>O) odnosno MeJA (5 ili 50  $\mu\text{M}$ ). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška. Slova ukazuju na statistički značajne razlike na osnovu Fišerovog LSD testa ( $p \leq 0,05$ ) između kontrolnih grupa biljaka, biljaka izlaganih dehidraciji i biljaka podvrgnutih oporavku.

#### 4.4.6. Uticaj folijarne primene MeJA na koncentraciju vodonik peroksida i malondialdehida

Uticaj folijarne primene MeJA na promene u koncentraciji H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u listovima *I. walleriana* izlaganih dehidraciji i rehidraciji prikazan je na **Grafiku 28**. Na osnovu rezultata uočeno je da elicitacija MeJA u koncentraciji od 50  $\mu\text{M}$  neznatno povećava koncentraciju H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kod kontrolne grupe biljaka za prvi intenzitet dehidracije (isušivanje supstrata do 15% vlažnosti), u odnosu na



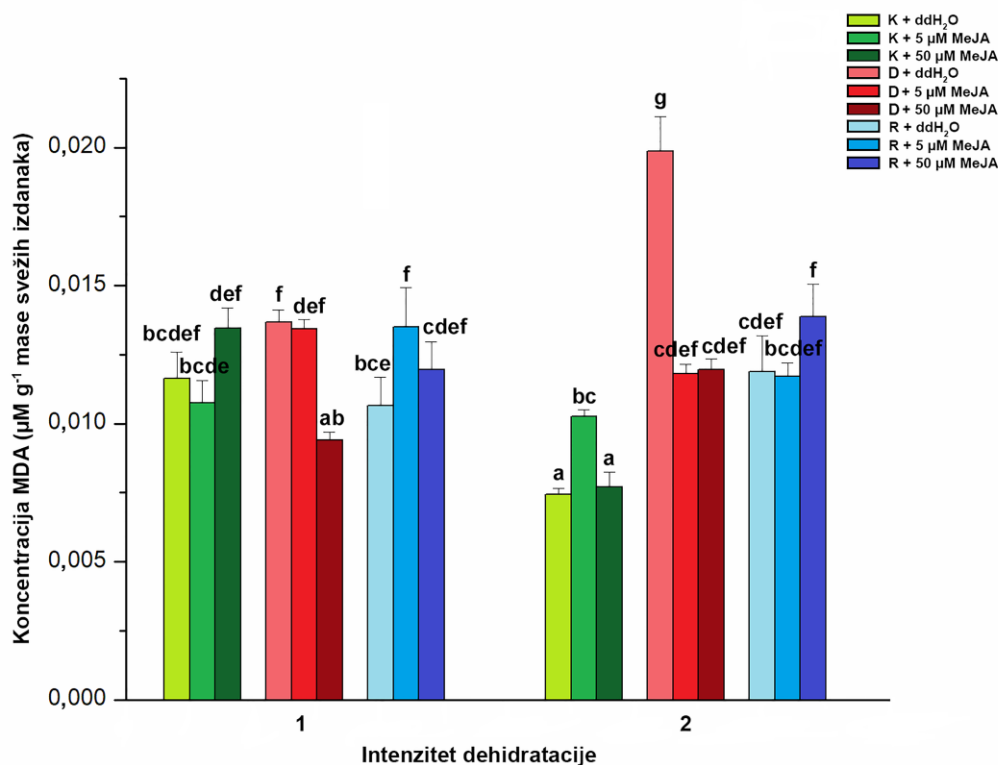
biljke koje su tretirane destilovanom vodom. Sa druge strane, kod kontrolne grupe biljaka za drugi intenzitet dehidracije (isušivanje supstrata do 5% vlažnosti), elicitacija MeJA sa obe koncentracije (5 i 50  $\mu\text{M}$ ) uticala je na blago smanjenje koncentracije  $\text{H}_2\text{O}_2$  u listovima *I. walleriana*, u odnosu na biljke kod kojih je umesto elicitora korišćena destilovana voda. Izlaganje biljaka dehidraciji uzrokovanoj isušivanjem do vlažnosti supstrata od 15%, uticalo je na porast koncentracije  $\text{H}_2\text{O}_2$  za 54,12% u listovima *I. walleriana* prethodno tretiranih destilovanom vodom u odnosu na kontrolnu grupu biljaka iz istog tretmana elicitacije. Pri istoj količini vlažnosti supstrata biljke tretirane MeJA u koncentraciji od 5  $\mu\text{M}$  povećavale su koncentraciju  $\text{H}_2\text{O}_2$  za 15,79%, dok su biljke tretirane MeJA u koncentraciji od 50  $\mu\text{M}$  smanjivale koncentraciju  $\text{H}_2\text{O}_2$  za 19,84%, u odnosu na kontrolnu grupu biljaka koje su tretirane istim koncentracijama MeJA. U okviru intenziteta dehidracije, uočeno je da MeJA značajno smanjuje koncentraciju  $\text{H}_2\text{O}_2$  u odnosu na biljke tretirane destilovanom vodom. Sličan trend promene u koncentraciji  $\text{H}_2\text{O}_2$  se uočava i pri izlaganju biljaka dehidraciji uzrokovanoj isušivanjem supstrata do 5% vlažnosti. Povećanje koncentracije  $\text{H}_2\text{O}_2$  za 29,73% zabeleženo je kod biljaka prethodno tretiranih destilovanom vodom u odnosu na kontrolnu grupu biljaka. Elicitacija MeJA u koncentraciji od 5  $\mu\text{M}$  uticala je na smanjenje koncentracije  $\text{H}_2\text{O}_2$  za 7,22% pri dehidraciji uzrokovanoj isušivanjem supstrata do 5% vlažnosti, dok je elicitacija sa 50  $\mu\text{M}$  MeJA uticala na blago povećanje koncentracije  $\text{H}_2\text{O}_2$  od 3,65%, u odnosu na kontrolnu grupu biljaka iz istog tretmana elicitacije. Međutim, kao i u slučaju sa promenama pri vlažnosti supstrata od 15%, u okviru tretmana intenzivne dehidracije, uočeno je da MeJA značajno smanjuje koncentraciju  $\text{H}_2\text{O}_2$  u odnosu na grupu biljaka tretiranih destilovanom vodom. Rehidracija biljaka je uticala na značajno smanjenje  $\text{H}_2\text{O}_2$  u listovima biljaka prethodno tretiranih destilovanom vodom, a to smanjenje iznosilo je 33,34 i 18,27% pri rehidraciji nakon isušivanja supstrata do 15 odnosno 5% vlažnosti. Rehidracija biljaka prethodno tretiranih MeJA u koncentraciji od 5  $\mu\text{M}$  i izlaganih isušivanju supstrata do 15% vlažnosti, uticala je na smanjenje  $\text{H}_2\text{O}_2$  za 15,31%, dok je rehidracija nakon isušivanja supstrata do 5% vlažnosti uticala na blagi porast koncentracije  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Rehidracija biljaka prethodno tretiranih MeJA u koncentraciji od 50  $\mu\text{M}$  i izlaganih isušivanju supstrata do 15 i 5% vlažnosti, uticala je na porast koncentracije  $\text{H}_2\text{O}_2$  u listovima *I. walleriana* u odnosu na biljke izložene stresu dehidracije.



**Grafik 28.** Uticaj folijarne primene MeJA na koncentraciju H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> *I. walleriana* pri dehidraciji i rehidraciji. Brojevi na x osi označavaju različite intenzitete dehidracije uzrokovane isušivanjem supstrata do određenih zapreminskih procentualnih vrednosti: 1 – 15, 2 – 5. Oznake u legendi grafika: K – kontrolna grupa biljaka tretirana destilovanom vodom (ddH<sub>2</sub>O) odnosno MeJA (5 ili 50 µM), D – biljke izlagane dehidraciji tretirane destilovanom vodom (ddH<sub>2</sub>O) odnosno MeJA (5 ili 50 µM), R – rehidratirane biljke tretirane destilovanom vodom (ddH<sub>2</sub>O) odnosno MeJA (5 ili 50 µM). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± standardna greška. Slova ukazuju na statistički značajne razlike na osnovu Fišerovog LSD testa ( $p \leq 0,05$ ) između kontrolnih grupa biljaka, biljaka izlaganih dehidraciji i biljaka podvrgnutih oporavku.

Na **Grafiku 29** predstavljen je uticaj folijarne primene MeJA na stepen lipidne peroksidacije, koji je određen količinom MDA u listovima *I. walleriana*. Na prikazanom grafiku može se uočiti da je prethodni tretman biljaka sa 50 µM MeJA smanjio koncentraciju MDA pri vlažnosti supstrata od 15% za 30,13%, u odnosu na kontrolnu grupu biljaka tretiranih istom koncentracijom elicitora. Porast koncentracije MDA za 17,41 i 24,94% zapažen je kod biljaka prethodno tretiranih destilovanom vodom i sa 5 µM MeJA pri dehidraciji uzrokovanj isušivanjem supstrata do 15% vlažnosti, u odnosu na kontrolnu grupu biljaka. Međutim, u okviru grupa biljaka kod kojih je vlažnost supstrata iznosila 15%, primećeno je da biljke prethodno tretirane destilovanom vodom ispoljavaju najviše vrednosti MDA. Najveći porast koncentracije MDA detektovan je kod biljaka pri vlažnosti supstrata od 5% koje su prethodno tretirane destilovanom vodom. Povećanje koncentracije MDA kod ovih biljaka bilo je čak za 167,15% puta u odnosu na kontrolnu grupu biljaka tretiranih destilovanom vodom. Pri istoj vlažnosti supstrata, biljke prethodno tretirane sa 5 i 50 µM MeJA, povećavale su koncentraciju MDA za 15,14 i 55,34%, u odnosu na kontrolnu grupu biljaka tretiranih istim koncentracijama MeJA, ali je povećanje u odnosu na biljke tretirane destilovanom vodom bilo znatno manje. Rehidracija biljaka je uticala na značajno smanjenje MDA u listovima biljaka prethodno tretiranih destilovanom

vodom, a to smanjenje iznosilo je 22,02 i 40,14% pri rehidraciji nakon isušivanja supstrata do 15 odnosno 5% vlažnosti. Rehidracija biljaka prethodno tretiranih sa 5  $\mu\text{M}$  MeJA i izlaganih isušivanju supstrata do 15 i 5% vlažnosti, uticala je na blagi porast odnosno na blagi pad koncentracije MDA u listovima *I. walleriana*. Rehidracija biljaka prethodno tretiranih sa 50  $\mu\text{M}$  MeJA i izlaganih isušivanju supstrata do 15 i 5% vlažnosti, uticala je na povećanje koncentracije MDA u listovima *I. walleriana*.



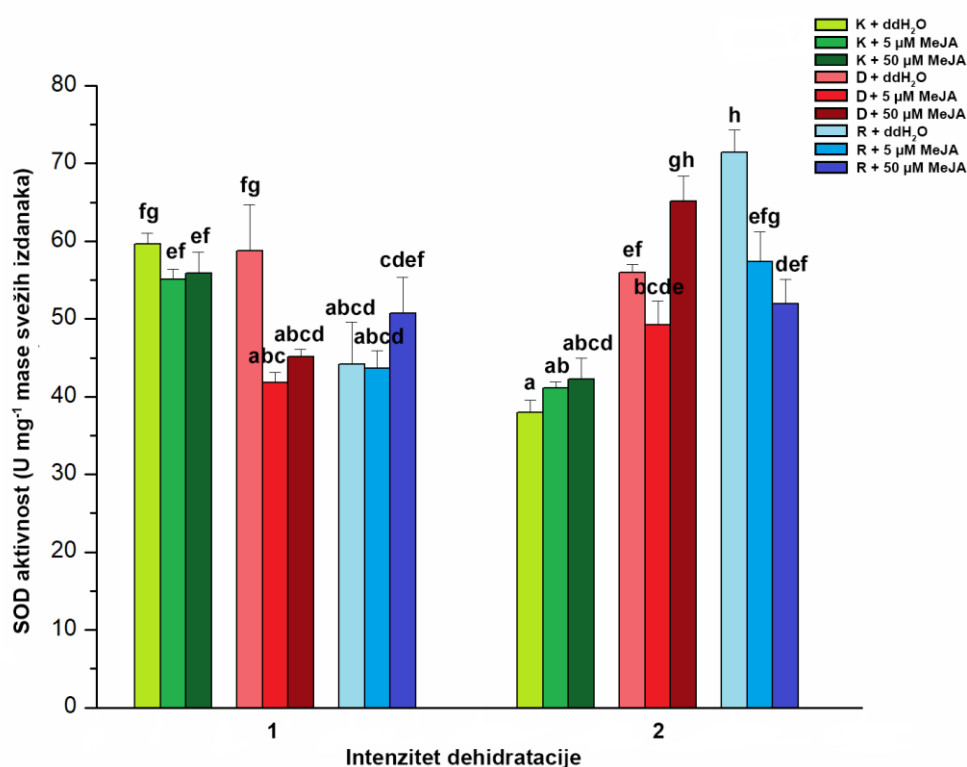
**Grafik 29.** Uticaj folijarne primene MeJA na koncentraciji MDA u listovima *I. walleriana* pri dehidraciji i rehidraciji. Brojevi na x osi označavaju različite intenzitete dehidracije uzrokovane isušivanjem supstrata do određenih zapreminskih procentualnih vrednosti: 1 – 15, 2 – 5. Oznake u legendi grafika: K – kontrolna grupa biljaka tretirana destilovanom vodom (ddH<sub>2</sub>O) odnosno MeJA (5 ili 50  $\mu\text{M}$ ), D – biljke izlagane dehidraciji tretirane destilovanom vodom (ddH<sub>2</sub>O) odnosno MeJA (5 ili 50  $\mu\text{M}$ ), R – rehidratirane biljke tretirane destilovanom vodom (ddH<sub>2</sub>O) odnosno MeJA (5 ili 50  $\mu\text{M}$ ). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška. Slova ukazuju na statistički značajne razlike na osnovu Fišerovog LSD testa ( $p \leq 0,05$ ) između kontrolnih grupa biljaka, biljaka izlaganih dehidraciji i biljaka podvrgnutih oporavku.

#### 4.4.7. Uticaj folijarne primene MeJA na aktivnost antioksidativnih enzima

Uticaj folijarno primenjenog MeJA na aktivnost antioksidativnih enzima SOD, POX i CAT, pri dehidraciji i rehidraciji *I. walleriana* prikazan je na **Graficima 30, 31 i 32**.

Na osnovu rezultata (**Grafik 30**) uočeno je da elicitacija sa MeJA utiče na pad aktivnosti SOD kod kontrolne grupe biljaka za prvi intenzitet dehidracije, dok se suprotan uticaj uočava kod kontrolne grupe biljaka za drugi intenzitet dehidracije, u odnosu na kontrolnu grupu biljaka tretiranih destilovanom vodom. Prvi intenzitet dehidracije uzrokovan isušivanjem supstrata do 15% vlažnosti, uticao je na opadanje SOD aktivnosti kod biljaka *I. walleriana* prethodno tretiranih

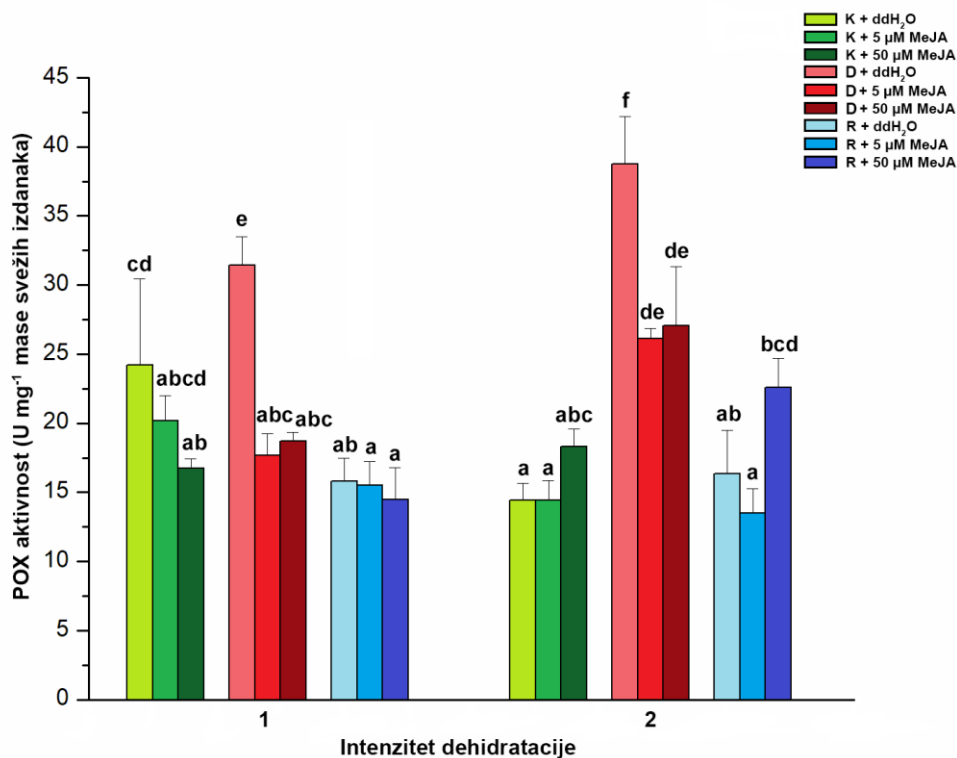
sa 5 i 50  $\mu\text{M}$  MeJA za 24,13 odnosno 19,11%, u poređenju sa SOD aktivnošću kod kontrolne grupe biljaka tretiranih istim koncentracijama MeJA. Najveći porast aktivnosti SOD zabeležen je kod *I. walleriana* izlaganih intenzivnoj dehidraciji, odnosno pri vlažnosti supstrata od 5%, u odnosu na kontrolnu grupu biljaka iz istog tretmana elicitacije. Kada je vlažnost supstrata iznosila 5% zapažena je povećana SOD aktivnost koja je iznosila 47,37, 19,65 i 54,10% za biljke prethodno tretirane destilovanom vodom, sa 5 i 50  $\mu\text{M}$  MeJA. Rehidracija *I. walleriana* nakon isušivanja supstrata do 15% vlažnosti uticala je na smanjenje SOD aktivnosti u listovima biljaka prethodno tretiranih destilovanom vodom za 23,21%. Rehidracija biljaka nakon isušivanja supstrata do 15% vlažnosti, a prethodno tretiranih sa 50  $\mu\text{M}$  MeJA, uticala je na povećanje SOD aktivnosti u listovima *I. walleriana*. Rehidracija *I. walleriana* prethodno tretiranih destilovanom vodom ili sa 5  $\mu\text{M}$  MeJA, nakon isušivanja supstrata do 5% vlažnosti, povećavala je SOD aktivnost za 27,63 odnosno 16,55% dok je rehidracija biljaka prethodno tretiranih sa 50  $\mu\text{M}$  MeJA smanjila SOD aktivnost za 20,29%.



**Grafik 30.** Uticaj folijarne primene MeJA na SOD aktivnost u listovima *I. walleriana* pri dehidraciji i rehidraciji. Brojevi na x osi označavaju različite intenzitete dehidracije uzrokovane isušivanjem supstrata do određenih zapreminskih procentualnih vrednosti: 1 – 15, 2 – 5. Oznake u legendi grafika: K – kontrolna grupa biljaka tretirana destilovanom vodom (ddH<sub>2</sub>O) odnosno MeJA (5 ili 50  $\mu\text{M}$ ), D – biljke izlagane dehidraciji tretirane destilovanom vodom (ddH<sub>2</sub>O) odnosno MeJA (5 ili 50  $\mu\text{M}$ ), R – rehidratirane biljke tretirane destilovanom vodom (ddH<sub>2</sub>O) odnosno MeJA (5 ili 50  $\mu\text{M}$ ). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška. Slova ukazuju na statistički značajne razlike na osnovu Fišerovog LSD testa ( $p \leq 0,05$ ) između kontrolnih grupa biljaka, biljaka izlaganih dehidraciji i biljaka podvrgnutih oporavku.

Promene u aktivnosti POX enzima predstavljene su na **Grafiku 31**. Uočeno je da elicitacija sa MeJA utiče na blagi pad POX aktivnosti kod kontrolne grupe biljaka za prvi intenzitet

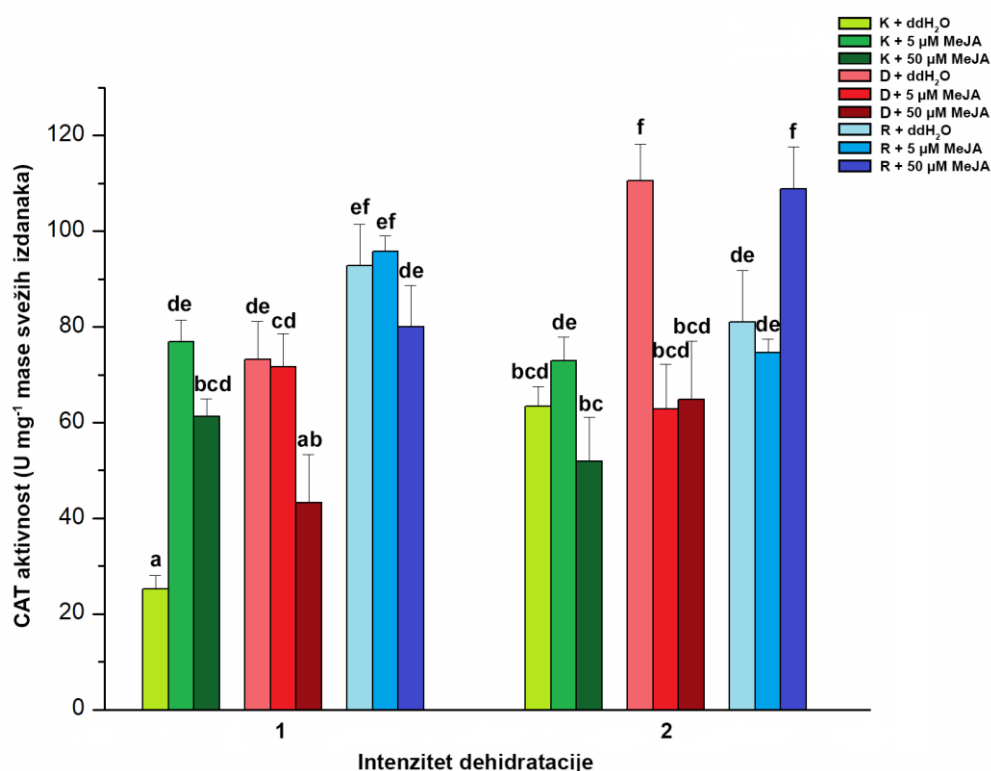
dehidracije (uzrokovan isušivanjem supstrata do 15% vlažnosti). Suprotan uticaj uočen je kod kontrolne grupe biljaka za drugi intenzitet dehidracije (uzrokovan isušivanjem supstrata do 5% vlažnosti) kada je kao elicitor korišćen 50  $\mu\text{M}$  MeJA, u poređenju sa kontrolnim biljkama tretiranih destilovanom vodom. Dehidracija uzrokovana isušivanjem supstrata do 15% vlažnosti, povećava POX aktivnost kod *I. walleriana* prethodno tretiranih destilovanom vodom za 29,71%, u odnosu na kontrolnu grupu biljaka tretiranih destilovanom vodom. Pri istoj vlažnosti supstrata, biljke prethodno tretirane sa 5  $\mu\text{M}$  MeJA, smanjuju POX aktivnost za 12,47% dok biljke prethodno tretirane sa 50  $\mu\text{M}$  MeJA povećavaju POX aktivnost za 11,59%, u odnosu na kontrolnu grupu biljaka tretiranih istim koncentracijama MeJA. Dehidracija uzrokovana isušivanjem supstrata do 5% vlažnosti, značajno je povećala POX aktivnost kod svih tretiranih grupa u poređenju sa kontrolnim biljkama iz istog tretmana. Peroksidazna aktivnost veća je za 168,30, 81,50 i 47,80% puta kod *I. walleriana* tretiranih destilovanom vodom, sa 5 odnosno 50  $\mu\text{M}$ , u poređenju sa kontrolnim grupama biljaka tretiranim istim koncentracijama elicitora MeJA. Rehidracija *I. walleriana* nakon isušivanja supstrata do 15% vlažnosti uticala je na smanjenje POX aktivnosti ispod nivoa kontrolnih vrednosti kod biljaka koje su prethodno tretirane sa destilovanom vodom i obe koncentracije MeJA. Rehidracija nakon isušivanja supstrata do 5% vlažnosti takođe je uticala na značajno opadanje POX aktivnosti u odnosu na grupe biljaka izlagane dehidraciji.



**Grafik 31.** Uticaj folijarne primene MeJA na POX aktivnost u listovima *I. walleriana* pri dehidraciji i rehidraciji. Brojevi na x osi označavaju različite intenzitete dehidratacije uzrokovane isušivanjem supstrata do određenih zapreminskih procentualnih vrednosti: 1 – 15, 2 – 5. Oznake u legendi grafika: K – kontrolna grupa biljaka tretirana destilovanom vodom (ddH<sub>2</sub>O) odnosno MeJA (5 ili 50 μM), D – biljke izlagane dehidraciji tretirane destilovanom vodom (ddH<sub>2</sub>O) odnosno MeJA (5 ili 50 μM), R – rehidratirane biljke tretirane destilovanom vodom (ddH<sub>2</sub>O) odnosno MeJA (5 ili 50 μM). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± standardna greška. Slova ukazuju na statistički značajne razlike na osnovu Fišerovog LSD testa ( $p \leq 0,05$ ) između kontrolnih grupa biljaka, biljaka izlaganih dehidraciji i biljaka podvrgnutih oporavku.

Na **Grafiku 32** prikazane su promene CAT aktivnosti prilikom folijarne primene MeJA pri dehidraciji i rehidraciji *I. walleriana*. Na osnovu rezultata primećeno je da je elicitacija sa 5 i 50 μM MeJA značajno uticala na povećanje CAT aktivnosti kod kontrolne grupe biljaka za prvi intenzitet dehidratacije. Povećanje CAT aktivnosti za 204,82 i 142,88% zabeleženo je u odnosu na kontrolnu grupu biljaka tretiranih destilovanom vodom. Elicitacija sa 5 μM MeJA povećala je CAT aktivnost kontrolne grupe biljaka pri drugom intenzitetu dehidratacije dok elicitacija sa 50 μM MeJA smanjuje CAT aktivnost u poređenju sa kontrolnom grupom biljaka tretiranih destilovanom vodom. U zavisnosti od prethodno primenjenog elicitora, biljke gajene pri vlažnosti supstrata od 15% ispoljile su različit odgovor u CAT aktivnosti. Biljke prethodno tretirane destilovanom vodom povećale su CAT aktivnost za 182% dok su biljke prethodno tretirane sa 5 i 50 μM MeJA smanjile CAT aktivnost za 6,88 odnosno 29,38%, u odnosu na kontrolnu grupu biljaka tretiranih istim koncentracijama elicitora. Pri intenzivnoj dehidraciji (vlažnosti supstrata od 5%), biljke *I. walleriana* prethodno tretirane destilovanom vodom povećale su CAT aktivnost za 74,46%, u poređenju sa kontrolnom grupom biljaka tretiranih destilovanom vodom. Elicitacija sa 5 μM MeJA, smanjila je CAT aktivnost u listovima *I. walleriana* pri intenzivnoj dehidraciji za 13,78%, dok elicitacija sa višom koncentracijom MeJA povećava CAT aktivnost za 24,79%. Rehidracija

biljaka nakon isušivanja supstrata do 15% vlažnosti povećavala je CAT aktivnost kod sve tri tretirane grupe za 26,92, 33,70 i 84,86%. Rehidracija biljaka nakon isušivanja supstrata do 5% vlažnosti smanjila je CAT aktivnost kod biljaka prethodno tretiranih destilovanom vodom za 26,68%, a povećala za 18,61 i 67,97% kod biljaka tretiranih sa 5 i 50  $\mu\text{M}$  MeJA.



**Grafik 32.** Uticaj folijarne primene MeJA na CAT aktivnost u listovima *I. walleriana* pri dehidraciji i rehidraciji. Brojevi na x osi označavaju različite intenzitete dehidracije uzrokovane isušivanjem supstrata do određenih zapreminskih procentualnih vrednosti: 1 – 15, 2 – 5. Oznake u legendi grafika: K – kontrolna grupa biljaka tretirana destilovanom vodom (ddH<sub>2</sub>O) odnosno MeJA (5 ili 50  $\mu\text{M}$ ), D – biljke izlagane dehidraciji tretirane destilovanom vodom (ddH<sub>2</sub>O) odnosno MeJA (5 ili 50  $\mu\text{M}$ ), R – rehidratirane biljke tretirane destilovanom vodom (ddH<sub>2</sub>O) odnosno MeJA (5 ili 50  $\mu\text{M}$ ). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška. Slova ukazuju na statistički značajne razlike na osnovu Fišerovog LSD testa ( $p \leq 0,05$ ) između kontrolnih grupa biljaka, biljaka izlaganih dehidraciji i biljaka podvrgnutih oporavku.

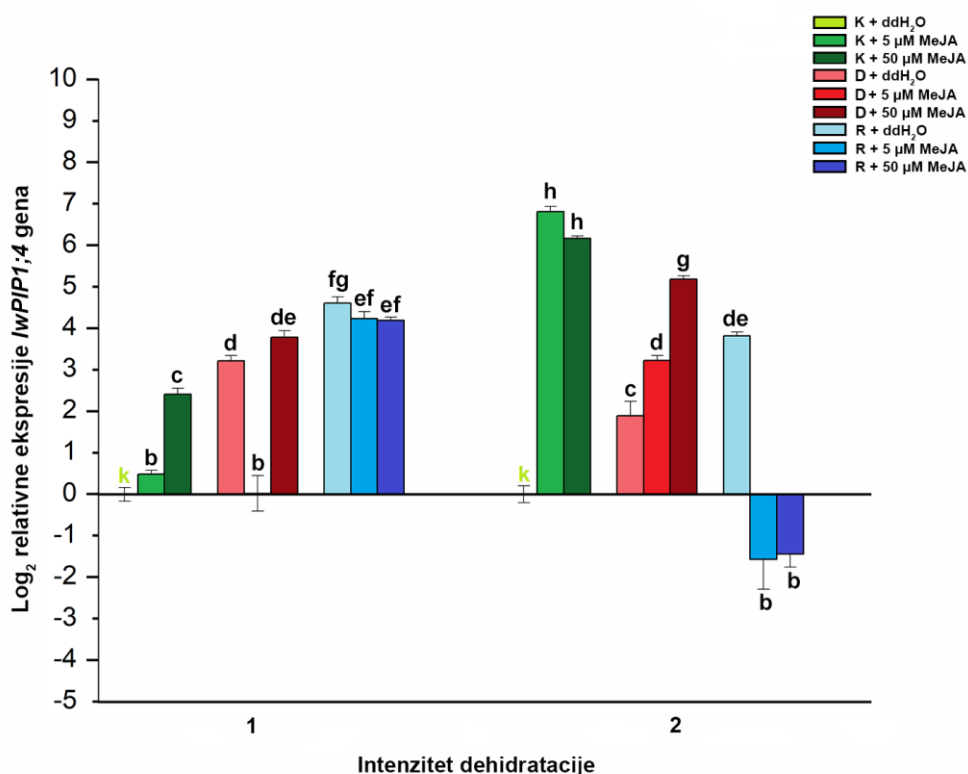
#### 4.4.8. Uticaj folijarne primene MeJA na ekspresiju gena za akvaporine

Na **Graficima 33, 34, 35 i 36** predstavljen je uticaj elicitanje različitim koncentracijama MeJA na ekspresiju gena za akvaporine u listovima *I. walleriana* pri dehidraciji i rehidraciji.

Dobijeni rezultati ukazuju da elicitanje sa MeJA značajno povećava ekspresiju *IwPIPI;4* gena kod obe kontrolne grupe biljaka, s tim što je povećanje najviše izraženo kod druge kontrolne grupe biljaka. Izlaganje biljaka dehidraciji uzrokovanoj isušivanjem supstrata do 15% vlažnosti značajno je povećalo ekspresiju *IwPIPI;4* gena kod biljaka prethodno tretiranih destilovanom vodom i sa 50  $\mu\text{M}$  MeJA. U odnosu na grupe biljaka prethodno tretirane destilovanom vodom, grupe biljaka tretirane sa obe koncentracije MeJA ispoljile su veći stepen ekspresije analiziranog gena pri vlažnosti supstrata od 5% dok je u poređenju sa odgovarajućim kontrolnim grupama biljaka



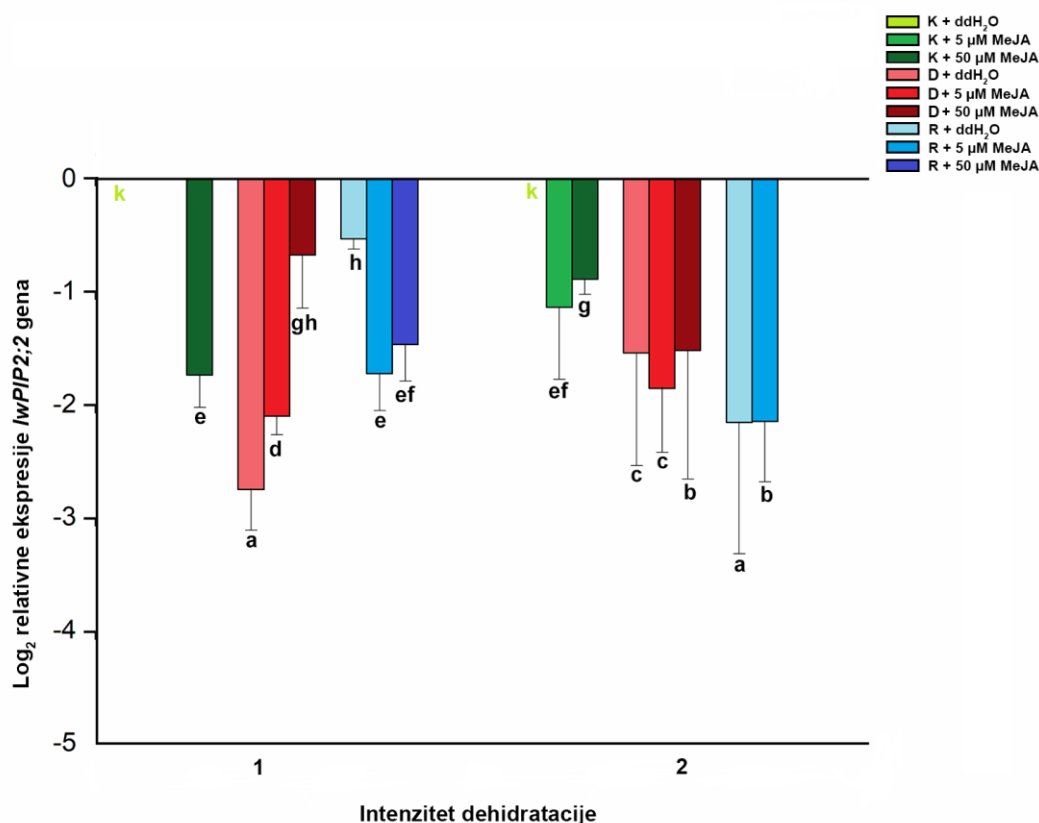
stepen ekspresije *IwPIP1;4* gena bila niža. Rehidracija biljaka nakon isušivanja supstrata do 15% vlažnosti povećala ekspresiju *IwPIP1;4* gena kod svih tretiranih grupa, dok je rehidracija biljaka nakon isušivanja supstrata do 5% vlažnosti povećala ekspresiju *IwPIP1;4* gena samo kod biljaka prethodno tretiranih destilovanom vodom.



**Grafik 33.** Relativna ekspresija *IwPIP1;4* gena. Brojevi na x osi označavaju različite intenzitete dehidracije uzrokovane isušivanjem supstrata do određenih zapreminskih procentualnih vrednosti: 1 – 15, 2 – 5. Oznake u legendi grafika: K – kontrolna grupa biljaka tretirana destilovanom vodom (ddH<sub>2</sub>O) odnosno MeJA (5 ili 50 μM), D – biljke izlagane dehidraciji tretirane destilovanom vodom (ddH<sub>2</sub>O) odnosno MeJA (5 ili 50 μM), R – rehidratirane biljke tretirane destilovanom vodom (ddH<sub>2</sub>O) odnosno MeJA (5 ili 50 μM). Relativna ekspresija gena kvantifikovana qPCR metodom, normalizovana je na gen sa konstitutivnom ekspresijom – aktin i izračunata u odnosu na kalibrator – kontrole tretirane destilovanom vodom obeležene slovom **k**. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± standardna greška dok su statistički značajne razlike između tretmana ( $p < 0,05$ ) obeležene slovima iznad barova.

Uticaj folijarne primene MeJA na relativnu ekspresiju *IwPIP2;2* gena u listovima *I. walleriana* pri dehidraciji i rehidraciji prikazan je na **Grafiku 34**. Uočena je redukovana ekspresija *IwPIP2;2* gena u svim analiziranim uzorcima, sa ispoljenim razlikama u stepenu redukcije. Ekspresija analiziranog gena izostala je u prvoj kontrolnoj grupi biljaka prethodno tretiranih sa 5 μM MeJA, dok je u drugoj kontrolnoj grupi detektovana ekspresija, ali i dalje je bila ispod nivoa ekspresije kod biljaka prethodno tretiranih destilovanom vodom. Izlaganje biljaka dehidraciji uzrokovanoj isušivanjem supstrata do 15% vlažnosti uticalo je na najviši stepen redukcije ekspresije *IwPIP2;2* gena kod biljaka prethodno tretiranih destilovanom vodom, dok je ekspresija bila najviša kod biljaka prethodno tretiranih najvišom koncentracijom MeJA. Pri intenzivnoj dehidraciji, ekspresija *IwPIP2;2* gena je bila niža kod svih tretiranih grupa biljaka u

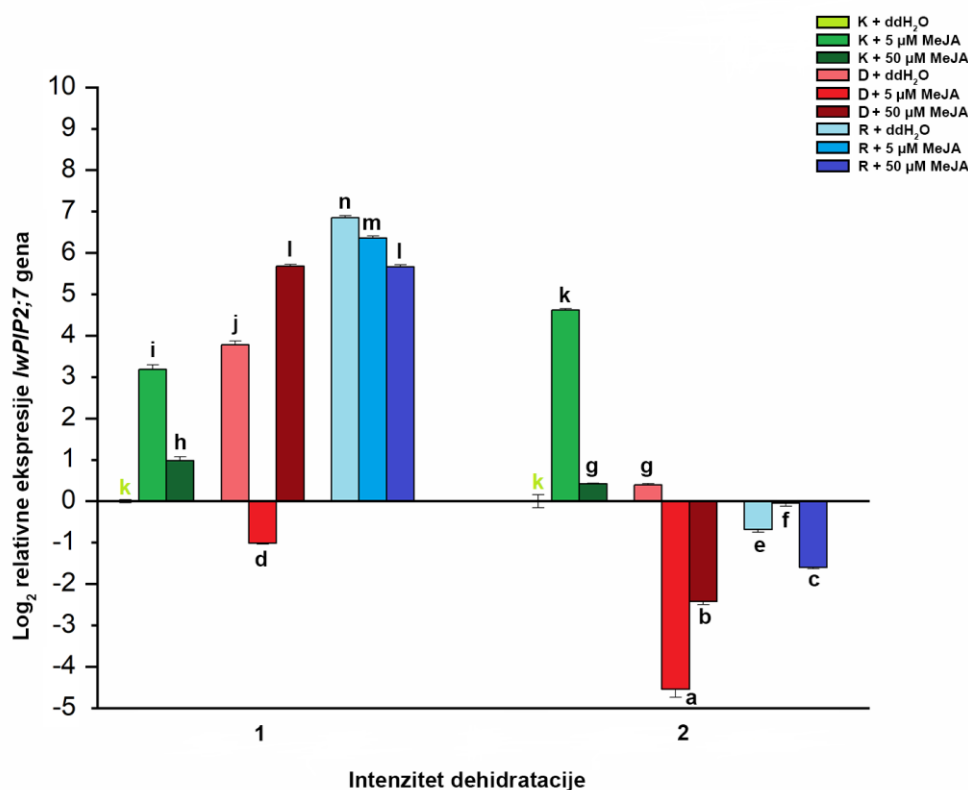
poređenju sa kontrolnim grupama biljaka. Rehidracija biljaka nakon isušivanja supstrata do 15% vlažnosti je povećala ekspresiju *IwPIP2;2* gena kod grupe biljaka prethodno tretiranih destilovanom vodom i nižom koncentracijom MeJA, dok je snizila ekspresiju kod grupe biljaka prethodno tretiranih višom koncentracijom MeJA. Rehidracija biljaka nakon isušivanja supstrata do 5% vlažnosti dodatno je redukovala ekspresiju *IwPIP2;2* gena, koja kod biljaka prethodno tretiranih višom koncentracijom MeJA nije ni detektovana.



**Grafik 34.** Relativna ekspresija *IwPIP2;2* gena. Brojevi na x osi označavaju različite intenzitete dehidracije uzrokovane isušivanjem supstrata do određenih zapreminskih procentualnih vrednosti: 1 – 15, 2 – 5. Oznake u legendi grafika: K – kontrolna grupa biljaka tretirana destilovanom vodom (ddH<sub>2</sub>O) odnosno MeJA (5 ili 50 μM), D – biljke izlagane dehidraciji tretirane destilovanom vodom (ddH<sub>2</sub>O) odnosno MeJA (5 ili 50 μM), R – rehidratirane biljke tretirane destilovanom vodom (ddH<sub>2</sub>O) odnosno MeJA (5 ili 50 μM). Relativna ekspresija gena kvantifikovana qPCR metodom, normalizovana je na gen sa konstitutivnom ekspresijom – aktin i izračunata u odnosu na kalibrator – kontrole tretirane destilovanom vodom obeležene slovom **k**. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± standardna greška dok su statistički značajne razlike između tretmana ( $p < 0,05$ ) obeležene slovima iznad barova.

Na **Grafiku 35** predstavljena je relativna ekspresija *IwPIP2;7* gena za koju je uočeno da je i najdinamičnija u poređenju sa ekspresijom ostalih analiziranih gena za AQP. Elicitacija različitim koncentracijama MeJA povećala je ekspresiju *IwPIP2;7* gena kod kontrolnih grupa biljaka za oba intenziteta dehidracije, sa većim efektom kod primenjene niže koncentracije elicitora. Dehidracija uzrokovana isušivanjem supstrata do 15% vlažnosti povećala je ekspresiju *IwPIP2;7* gena kod biljaka prethodno tretiranih destilovanom vodom i višom koncentracijom MeJA, dok je redukovana ekspresija zabeležena kod biljaka prethodno tretiranih nižom koncentracijom MeJA. Intenzivna dehidracija, odnosno isušivanje supstrata do 5% vlažnosti, značajno je redukovala

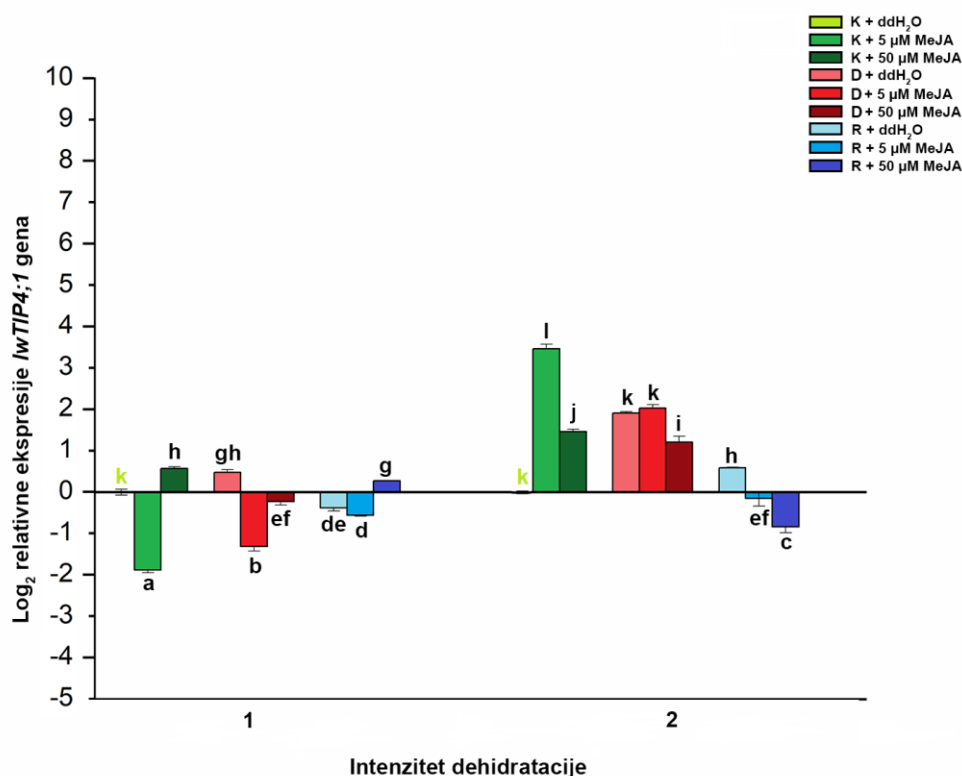
ekspresiju *IwPIP2;7* gena kod biljaka prethodno tretiranih destilovanom vodom u odnosu ekspresiji pri vlažnosti supstrata od 15%, dok je značajan stepen redukcije zabeležen i kod biljaka tretiranih sa obe koncentracije MeJA. Uočeno je da elicitacija sa 5  $\mu\text{M}$  MeJA najviše redukuje ekspresiju analiziranog akvaporinskog gena pri vlažnosti supstrata od 5%. Rehidratacija biljaka nakon isušivanja supstrata do 15% vlažnosti značajno je povećala ekspresiju *IwPIP2;7* gena kod biljaka prethodno tretiranih destilovanom vodom i nižom koncentracijom MeJA dok su neznčajne razlike zabeležene kod biljaka prethodno tretiranih višom koncentracijom MeJA u odnosu na biljke izložene stresu iz istog tretmana. Rehidratacija biljaka nakon isušivanja supstrata do 5% vlažnosti neznatno je redukovala ekspresiju *IwPIP2;7* gena kod biljaka prethodno tretiranih destilovanom vodom dok se ekspresija istog gena povećala kod biljaka tretiranih različitim koncentracijama MeJA.



**Grafik 35.** Relativna ekspresija *IwPIP2;7* gena. Brojevi na x osi označavaju različite intenzitete dehidracije uzrokovane isušivanjem supstrata do određenih zapreminskih procentualnih vrednosti: 1 – 15, 2 – 5. Oznake u legendi grafika: K – kontrolna grupa biljaka tretirana destilovanom vodom (ddH<sub>2</sub>O) odnosno MeJA (5 ili 50  $\mu\text{M}$ ), D – biljke izlagane dehidraciji tretirane destilovanom vodom (ddH<sub>2</sub>O) odnosno MeJA (5 ili 50  $\mu\text{M}$ ), R – rehidratirane biljke tretirane destilovanom vodom (ddH<sub>2</sub>O) odnosno MeJA (5 ili 50  $\mu\text{M}$ ). Relativna ekspresija gena kvantifikovana qPCR metodom, normalizovana je na gen sa konstitutivnom ekspresijom – aktin i izračunata u odnosu na kalibrator – kontrole tretirane destilovanom vodom obeležene slovom **k**. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška dok su statistički značajne razlike između tretmana ( $p < 0,05$ ) obeležene slovima iznad barova.

Ekspresija gena *IwTIP4;1* za tonoplastni akvaporin prikazana je na **Grafiku 36**. Uočeno je da elicitacija sa MeJA povećava ekspresiju ovog gena kod kontrolne grupe biljaka, izuzev kod prve kontrolne grupe tretirane nižom koncentracijom elicitora. Kod biljaka prethodno tretiranih

destilovanom vodom i gajenih na supstratu čija je vlažnost iznosila 15%, ekspresija *IwTIP4;1* gena je bila povećana. Pri istoj vlažnosti supstrata, redukcija ekspresije *IwTIP4;1* gena je zabeležena kod biljaka prethodno tretiranih sa MeJA i to sa najvećim stepenom redukcije kod biljaka tretiranih nižom koncentracijom elicitora. Intenzivna dehidratacija uzrokovana isušivanjem supstrata do 5% vlažnosti dodatno je povećala ekspresiju analiziranog akvaporinskog gena kod biljaka prethodno tretiranih destilovanom vodom, ali i kod biljaka tretiranih sa MeJA, u poređenju sa ekspresijom pri vlažnosti supstrata od 15%. Međutim, ekspresija je i dalje niža u poređenju sa kontrolnim biljkama iz istih tretmana elicitacije. Rehidratacija biljaka nakon isušivanja supstrata do 15% vlažnosti redukovala je ekspresiju *IwTIP4;1* gena kod biljaka prethodno tretiranih destilovanom vodom, dok je povećala ekspresiju kod biljaka tretiranih sa 50  $\mu\text{M}$  MeJA. Rehidratacija biljaka nakon isušivanja supstrata do 5% vlažnosti redukovala je ekspresiju *IwTIP4;1* gena kod svih tretiranih grupa biljaka.



**Grafik 36.** Relativna ekspresija *IwTIP4;1* gena. Brojevi na x osi označavaju različite intenzitete dehidratacije uzrokovane isušivanjem supstrata do određenih zapreminskih procentualnih vrednosti: 1 – 15, 2 – 5. Oznake u legendi grafika: K – kontrolna grupa biljaka tretirana destilovanom vodom (ddH<sub>2</sub>O) odnosno MeJA (5 ili 50  $\mu\text{M}$ ), D – biljke izlagane dehidrataciji tretirane destilovanom vodom (ddH<sub>2</sub>O) odnosno MeJA (5 ili 50  $\mu\text{M}$ ), R – rehidratirane biljke tretirane destilovanom vodom (ddH<sub>2</sub>O) odnosno MeJA (5 ili 50  $\mu\text{M}$ ). Relativna ekspresija gena kvantifikovana qPCR metodom, normalizovana je na gen sa konstitutivnom ekspresijom – aktin i izračunata u odnosu na kalibrator – kontrole tretirane destilovanom vodom obeležene slovom **k**. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška dok su statistički značajne razlike između tretmana ( $p < 0,05$ ) obeležene slovima iznad barova.

## 5. DISKUSIJA

Posmatrano na globalnom nivou suša predstavlja jedan od najzastupljenijih problema u poljoprivredi, hortikulturi i šumarstvu, koji dovodi do redukcije prinosa. Odgovori biljaka na stres suše se mogu ispoljiti na molekularnom, biohemijskom i fiziološkom nivou, što se odražava na procese rastenja i razvića biljaka. Tako, suša u krajnjoj liniji utiče na produktivnost biljaka, što se ogleda u redukciji biomase, kvantitetu i kvalitetu plodova. U cilju ublaživanja efekata suše u komercijalnoj proizvodnji biljaka, primenjuju se različite tehnike u čijoj osnovi leže kontinuirana naučna istraživanja. Kako je suša konstantno aktuelan problem, pre svega zbog povećanog globalnog zagrevanja planete Zemlje, istraživanja u oblasti fiziologije stresa biljaka su kretala u različitim pravcima, radi rešavanja ovog problema. Tako, zbog ublaživanja i prevazilaženja efekata suše u poljoprivredi se primenjuju otporni genotipovi, koji su dobijeni selekcijom. Takođe primenom genetičkih transformacija dobijen je veliki broj genetički modifikovanih biljaka – GMO (eng. *Genetically Modified Organism*) sa povećanom tolerancijom prema suši. Za dobijanje GMO biljaka korišćene su različite strategije poput povećanja ekspresije regulatornih gena, osmoprotektanata, antioksidativnih komponenti i drugih specifičnih metabolita, pri čemu su postignuti zavidni rezultati u ovom polju biotehnologije. Međutim, samo mali broj transgenih biljaka tolerantnih prema suši se danas nalazi u komercijalnoj proizvodnji. U njih spadaju **Monsanto's DroughtGard** transgeni kukuruz (Castiglioni i sar., 2008; Nemali i sar., 2015), **PT Perkebunan Nusantara XI's NXI-4T** transgena linija šećerne trske (Marshall, 2014) i **Verdeca's HB4** transgena soja (Waltz, 2014). Razlozi za nisku komercijalnu primenu transgenih biljaka tolerantnih prema suši su mnogobrojni, od etičkih, zdravstvenih do komercijalnih. Naime, radi ublažavanja ili sprečavanja negativnih efekata suše mnogi uzgajivači primenjuju različite tehnike navodnjavanja, poput parcijalnog isušivanja korenova - PRD (eng. *Partial Root Drying*) i regulisanog deficita navodnjavanja - RDI (eng. *Regulated Deficit Irrigation*) (Stikić i sar., 2014; Consoli i sar., 2017). Jedna od lako primenjivih i najisplativijih tehnika sa tendencijom široke primene je elicitacija, odnosno primena različitih predtretmana u cilju rešavanja problema suše. Tako, egzogena primena salicilne kiseline, same ili u kombinaciji sa drugim jedinjenjima može predstavljati dobro rešenje za povećanje tolerantnosti biljaka (Noreen i sar., 2017; Antonić i sar., 2016, 2020). U istu svrhu, pored salicilne kiseline, veoma je česta primena apscisinske kiseline (Gai i sar., 2020), jasmonata (Anjum i sar., 2016; Xiong i sar., 2020), brasinosteroida (Khamsuk i sar., 2018), poliamina (Mohammadi i sar., 2018), vodonik peroksida (Sun i sar., 2016), azot monoksida (Prabhu i sar., 2018), askorbata (Noman i sar., 2015) i neproteinskih aminokiselina poput GABA (Yong i sar., 2017). Takođe, bakterije koje poboljšavaju rasteenje biljaka, tzv. PGP bakterija (eng. *Plant Growth Promoting bacteria*), mogu uticati na povećanje tolerancije biljaka prema suši (Chen i sar., 2017).

U istraživanjima u okviru ove doktorske disertacije ustanovljeni su osnovni efekti različitih intenziteta dehidracije i rehidracije na morfološke, fiziološke, biohemijske i molekularne odgovore *I. walleriana*. Takođe, utvđeni su i efekti elicitacije MeJA u prevazilaženju negativnih posledica nastalih dehidracijom na prethodno navedenim nivoima organizacije.

### 5.1. Uticaj dehidracije i rehidracije na morfološke karakteristike *I. walleriana*

Isušivanje supstrata negativno je uticalo na parametre rastenja biljaka *I. walleriana* koji su analizirani u ovoj doktorskoj disertaciji. Sa porastom intenziteta dehidracije masa svežih izdanaka, a posledično i masa suvih izdanaka *I. walleriana*, snižene su u skladu sa predikcijama na osnovu literaturnih podataka. Opšte je poznato da dehidracija utiče na redukciju rastenja biljaka pre svega zbog inhibicije deobe, izduživanja i diferencijacije ćelija, koje su nastale posledično zbog narušavanja osnovnih bioloških procesa u organizmu. Ovakvi podaci zabeleženi su kod brojnih biljnih vrsta uključujući *Petunia ×hybrida* (Blanusa i sar., 2009; Zarghami Moghaddam i sar., 2014), *Rosa hybrida* (Harp i sar., 2015), *Chrysanthemum morifolium* (Lei i sar., 2015), *V. faba* (Siddiqui i

sar., 2015), *Abelmoschus esculentus* (Altaf i sar., 2015) i *Sorghum bicolor* (Nxele i sar., 2017). Takođe, u okviru roda *Impatiens* zabeleženi su negativni efekti dehidracije na rastenje i razviće *I. balsamina* (Fengyin i sar., 2014; Zhang i sar., 2014b) i *I. walleriana* (Chyliński i sar., 2007; Blanus i sar., 2009; Antonić i sar., 2016, 2020). Ukupna površina listova *I. walleriana* pri dehidraciji smanjena je u skladu sa sniženjem mase svežih izdanaka. Rezultati ukazuju da je dehidracija značajno uticala na smanjenje ukupne površine listova *I. walleriana*, što je zabeleženo i kod *P. hybrida* (Zarghami Moghaddam i sar., 2014) i *R. hybrida* (Shi i sar., 2019). Smanjenje površine listova je strategija koja sprečava preterani gubitak vode iz tkiva tokom dehidracije. Manja površina listova znači i smanjeno odavanje vode putem stomaterne transpiracije. Takođe, da bi izbegle ili ublažile efekte dehidracije mnoge biljke u potpunosti odbacuju listove ili smanjuju transpiracionu površinu na drugi način, npr. uvijanjem listova (Fang i Xiong, 2015).

## 5.2. Promene u endogenoj koncentraciji ABA i ekspresiji ABA metaboličkih gena pri dehidraciji i rehidraciji

Sa porastom intenziteta dehidracije, endogeni sadržaj ABA u listovima *I. walleriana* je takođe bio povišen. Povećanje koncentracije ABA je očekivano s obzirom na ulogu ovog fitohormona u procesu otvaranja i zatvaranja stoma i regulaciji transpiracije pri dehidraciji (Kholova i sar., 2010; Tombesi i sar., 2015). Najnovija istraživanja beleže povećanje koncentracije ABA pri dehidraciji kod *Aristotelia chilensis* (González-Villagra i sar., 2018, 2019), *Arundo donax* (Haworth i sar., 2018), *O. sativa* (Haider i sar., 2018) i *Coffea canephora* (Silva i sar., 2018). Primećena je korelacija između koncentracije ABA i ekspresije ABA metaboličkih gena uključenih u sintezu (*IwNCED4* i *IwAAO2*) i katabolizam (*IwABA8ox3* iz *CYP707A* familije) ovog fitohormona. Povećana ekspresija svih analiziranih gena odgovornih za ABA metabolizam detektovana je u listovima *I. walleriana*, a slični rezultati prethodno su opisani kod mnogih biljnih vrsta. Povećana ekspresija gena za biosintezu ABA, *NCED* i *TAO* (*AAO* familija), detektovana je kod *Solanum lycopersicum* pri dehidraciji (Milosavljević i sar., 2012). Slični rezultati zabeleženi su i kod *O. sativa*, a odnose se na povećanu ekspresiju *NCED3* gena prilikom izlaganja biljaka dehidraciji (Cai i sar., 2015). Isti autori su analizirali i ekspresiju tri gena za katabolizam i primetili su povećanu ekspresiju gena *ABA8ox3* (*CYP707A* familija). Proces rehidracije je uticao na sniženje ekspresije *NCED3* gena dok je ekspresija *ABA8ox3* gena i dalje bila stimulirana. Odnos ekspresije gena za sintezu i katabolizam ABA uticao je na opadanje endogenog sadržaja ABA kod pirinča nakon rehidracije (Cai i sar., 2015). U istraživanju sa *Pisum sativum* primećeno je da „brzo indukovana suša“ postignuta vađenjem celih biljaka iz supstrata na 48h, ne utiče na ekspresiju *PsAAO3* gena. Nasuprot, progresivna suša indukovana izostavljanjem navodnjavanja biljaka u trajanju od 14 dana uticala je na povećanje ekspresije ovog gena (Zdunek-Zastocka i Sobczak, 2013). Sa druge strane, povećana ekspresija *NCED2* i *NCED3* gena u *P. sativum* bila je detektovana pri oba prethodno pomenuta tretmana suše, sa razlikama u stepenu ekspresije u zavisnosti od biljnog organa. Skorašnja istraživanja o efektima suše, odnosno dehidracije na ekspresiju gena odgovornih za metabolizam ABA kod *Pinus sylvestris* i *Picea abies* ukazuju da je endogena koncentracija ABA regulisana na posttranskripcionom nivou (Pashkovskiy i sar., 2019). Autori su zaključili da koncentracija ABA u korenu i iglicama nije determinisana ekspresijom gena za biosintezu ABA. Povećana ekspresija kataboličkog gena iz *CYP707A* familije u listovima *I. walleriana* pri dehidraciji svakako je posledica povećane ekspresije gena za biosintezu ABA, *IwNCED4* i *IwAAO2*, odnosno pozitivne povratne sprege. Proces rehidracije nije uticao na opadanje koncentracije ABA do kontrolnih vrednosti *I. walleriana*, ali pretpostavka je da bi vremenom i daljim zalivanjem biljka to svakako bio ishod. Slični rezultati opisani su u kasnim osamdesetim godinama prošlog veka (Dörffling i sar., 1979), a kasnije i kod *V. vinifera* (Lovisololo i sar., 2008). Povećana koncentracija ABA tokom rehidracije je okarakterisana kao „kasni efekat“ ABA na provodljivost stoma i stopu transpiracije u biljkama. Naime, ABA sintetisana pri dehidraciji, može da kontroliše nivo otvorenosti stoma i transpiraciju i u ranim fazama

rehidracije, sve do momenta dok njena koncentracija ne počne da opada u listovima. Odnos između ekspresije ABA metaboličkih gena tokom faze rehidracije može da bude razlog nepromenjene koncentracije ABA u listovima *I. walleriana* kod biljaka izlaganih dehidraciji i oporavljenih biljaka. Može se očekivati da će ekspresija kataboličkog gena *IwABA8ox3* posle nekog vremena dostići kontrolne vrednosti, ali i da aktivnost nekog drugog gena iz *CYP707A* ima dominantnu ulogu u katabolizmu ABA. Takođe, ABA može biti inaktivirana konjugacijom sa šećerima i formiranjem ABA glikozilnih estara. Pored uloge u regulisanju transpiracije pri dehidraciji, ABA može da reguliše aktivnost mnogih gena povezanih sa tolerancijom biljaka prema dehidraciji, poput gena za akvaporine, fenolna jedinjenja i antioksidativne komponente.

### 5.3. Vodni potencijal izdanaka *I. walleriana* i koncentracija prolina pri dehidraciji i rehidraciji

Redukovanje sadržaja vode u supstratu dovodi do opadanja vodnog potencijala u ćelijama, odnosno tkivima biljaka. Da bi se voda kretala u smeru supstrat→koren→stablo→list→atmosfera, potrebno je da postoji razlika u vodnim potencijalima između ovih delova. Voda se kreće difuzijom iz mesta sa višim ka mestu sa nižim vodnim potencijalom i stoga pokretačka sila za transport upravo zavisi od količine vode u podlozi. Suša može da utiče na opadanje hidrauličke provodljivosti tkiva, što rezultira padom vodnog potencijala, i u krajnjoj liniji dovodi do zatvaranja stoma. Hidraulička provodljivost je obično u korelaciji sa građom i strukturom ksilemskih elemenata, kao i sa aktivnošću akvaporina u specifičnom tkivu, odnosno organu (Harayama i sar., 2019). Takođe, utvrđeno je u da u uslovima suše ABA može da inhibira aktivnosti akvaporina, koji se nalaze oko provodnih sudova, što utiče na hidrauličku provodljivost i opadanje vodnog potencijala (Shatil-Cohen i sar., 2011; Sade i sar., 2015). Opadanje vodnog potencijala izdanaka zabeleženo je kod *I. walleriana* izloženih različitim intenzitetima dehidracije. Postepeno povećanje intenziteta dehidracije kod *I. walleriana*, vodilo je ka opadanju vodnog potencijala u tkivima i turgidnosti ćelija. Pri dehidraciji dolazi do opadanja vodnog potencijala kod *Fragaria × ananassa* (Blanke i Cooke, 2004), *Hordeum vulgare* (Zhang i sar., 2015), *Gossypium hirsutum* (Luo i sar., 2016), *Chromolaena odorata* (Naidoo i Naidoo, 2018), različitim genotipovima roda *Prunus* (Bielsa Pérez i sar., 2016), višegodišnjim travama (Kørup i sar., 2018) i mnogim drugim biljnim vrstama. Biljke su tokom evolucije razvile mehanizme tolerancije prema različitim tipovima stresa, u koje spadaju, između ostalog, i mehanizmi koji obezbeđuju veće zadržavanje vode u tkivima prilikom dehidracije. Da bi omogućile usvajanje i kretanje vode kroz organizam mnoge biljne vrste akumuliraju specifične metabolite koji menjaju osmoski potencijal i tako doprinose promeni i vodnog potencijala u ćelijama, a čije su vrednosti niže od vodnog potencijala supstrata. Na taj način postiže se gradijent u vodnom potencijalu između supstrata i korena koji obezbeđuje usvajanje vode od strane biljke. Ovakve supstance nazivaju se kompatibilni sastojci ili osmoprotektanti (Bray, 1997). U osmoprotektante se ubrajaju jedinjenja različitog hemijskog sastava poput aminokiselina, šećera, alkoholnih šećera, organskih kiselina i jona. Aminokiselina prolina se često smatra indikatorom stresa jer je kod većine biljaka povećana akumulacija ove aminokiseline povezana sa odgovorima biljaka na različite tipove abiotičkog stresa (Kaur i Asthir, 2015). Povećanje akumulacije endogenog prolina pri dehidraciji zabeleženo je kod *H. vulgare* (Bandurska i sar., 2017), *S. bicolor* (Nxele i sar., 2017), *Lens culinaris* (Dash, 2018), *O. sativa* (Kumar i sar., 2017a), *Z. mays* (Anjum i sar., 2017), *Vatairea macrocarpa* (Vieirai i sar., 2017) i mnogim drugim biljnim vrstama. U istraživanjima u okviru ove doktorske dierstacije zabeležen je pad koncentracije endogenog prolina pri dehidraciji kod *I. walleriana*. Ovakvi rezultati ukazuju da prolina u ovom slučaju nema ulogu osmoprotektanta pri dehidraciji i da se ta funkcija može pripisati nekim drugim jedinjenjima. Ulogu osmoprotektanata pri dehidraciji mogu imati i neke druge amino kiseline poput asparagina, alanina, glutamina, ornitina i mnogih drugih (Rai, 2002).



#### **5.4. Koncentracije fotosintetičkih pigmenata u listovima *I. walleriana* pri dehidraciji i rehidraciji**

Kako je fotosinteza zavisna od fotosintetičkih pigmenata analizirane su koncentracije glavnih i pomoćnih fotosintetičkih pigmenata, odnosno hlorofila i karotenoida. Smanjenje koncentracije hlorofila, kao posledica narušene biosinteze usled nedostatka vode u tkivima, zabeleženo je kod *T. aestivum* (Ram i sar., 2017), *Matricaria chamomilla* (Salehi i sar., 2016), *Medicago sativa* (Molor i sar., 2017), *Arachis hypogaea* (Shivakrishna i sar., 2018), *Origanum majorana* (Farsi i sar., 2017) i mnogih drugih biljnih vrsta. Takođe, smanjenje koncentracije karotenoida u biljkama izloženim dehidraciji zabeleženo je u velikom broju istraživanja opisanih od strane različitih autora (Čelik i sar., 2017; Naeem i sar., 2017). Međutim, s obzirom da karotenoidi imaju i fotoprotektivnu odnosno antioksidativnu ulogu u biljkama, povećanje njihove koncentracije pri stresu nije neočekivano. Izlaganje biljaka *Vatairea macrocarpa* dehidraciji uticalo je na povećanje koncentracije karotenoida u ćelijama (Vieira i sar., 2017). Slični rezultati opisani su prethodno i za *Populus cathayana* (Xiao i sar., 2008) i *Helianthus annuus* (Ghobadi i sar., 2013). U istraživanju u okviru ove doktorske disertacije zapažen je sličan trend u promeni koncentracija hlorofila i karotenoida u listovima *I. walleriana* pri dehidraciji i rehidraciji. Povećanje koncentracije ukupne količine hlorofila i karotenoida kod biljaka *I. walleriana* bilo je primetno pri oba indukovana intenziteta dehidracije, odnosno pri 15 i vlažnosti supstrata od 5%. Povećanje koncentracije karotenoida se objašnjava njihovom ulogom u antioksidativnom odbrambenom sistemu biljaka gde imaju ulogu pre svega u zaštiti fotosintetičkog aparata od oštećenja uzrokovanih akumulacijom ROS. Takođe, različiti produkti oksidacije karotenoida od strane ROS su veoma bitni signalni molekuli u odgovorima biljaka na stres (Havaux, 2014). Sa druge strane, povećanje koncentracije hlorofila pri dehidraciji je neuobičajena pojava. Postoje publikacije koje se odnose na povećanje koncentracije hlorofila u osmotskom, odnosno primenom stresa vodnog deficita indukovano polietilen glikolom kod trave *Bouteloua gracilis* (García-Valenzuela i sar., 2005). Poznato je da hloroplasti imaju ključnu ulogu u fiziologiji biljaka zbog različitih metaboličkih procesa koji se odigravaju u kompleksima membrana. Pored uloge u fotosintezi, u hloroplastima se odvija i sinteza amino kiselina, masnih kiselina i različitih produkata sekundarnog metabolizma. Objašnjenje povišene koncentracije hlorofila u uslovima *I. walleriana* tokom dehidracije može da leži u nekim drugim mehanizmima u kojima učestvuju hloroplasti, a koji isključuju proces fotosinteze. Takođe, povećanje koncentracije hlorofila može uticati na povećanje intenziteta fotosinteze, a da istovremeno ne utiče na povećanje biomase. Resursi se mogu koristiti u biosintezi različitih komponenti, poput osmoprotektanata. Takođe, bitno je napomenuti da su listovi *I. walleriana* pri dehidraciji imali tamniju boju u odnosu na kontrolnu grupu biljaka, što ide u prilog većoj koncentraciji hlorofila u palisadnom tkivu. S obzirom da je rastenje *I. walleriana* bilo redukovano pri dehidraciji, može se zaključiti da povećanje koncentracije glavnih fotosintetičkih pigmenata utiče na neke fiziološke mehanizme biljaka, ali da svakako nije dovoljno da se premosti uticaj dehidracije na prinos, odnosno rastenje biljaka.

#### **5.5. Koncentracija ukupnih polifenola, flavonola i antioksidativni kapacitet u listovima *I. walleriana* pri dehidraciji i rehidraciji**

Polifenoli predstavljaju najveću grupu sekundarnih metabolita sa mnogobrojnim ulogama u rastenju i razviću biljaka, koje uključuju i odgovore na abiotičke i biotičke stresogene faktore (Sharma i sar., 2019). Polifenolna jedinjenja su uključena u procese poput klijanja semena, ćelijske deobe, usvajanje nutrijenata, razvoj polena, signalne kaskade i interakcije sa spoljašnom sredinom. Kao antioksidansi, polifenoli su veoma značajni u uklanjanju ROS formi i sprečavanju oštećenja makromolekula i membrana (Sharma i sar., 2019). Povećana akumulacija polifenola pri dehidraciji zabeležena je kod mnogih biljnih vrsta, a skorašnja istraživanja ukazuju na povećanje akumulacije fenolnih jedinjenja kod *T. aestivum* (Ma i sar., 2014b), tri vrste *Achillea* (Gharibi i sar.,

2016), *Tymus vulgaris* (Khalil i sar., 2018), *Achilea pachycephala* (Gharibi i sar., 2019) i *H. vulgare* (Kowalczewski i sar., 2020). Povećanje koncentracije ukupnih polifenola i flavonola (podgrupa flavonoida) u listovima *I. walleriana* pri dehidrataciji ukazuje na pozitivnu regulaciju biosinteze ovih jedinjenja i njihovu ulogu u neutralisanju negativnih uticaja dehidratacije manifestovanih oksidativnim stresom. Poznato je da dehidratacija pozitivno reguliše mnoge gene biosintetskog puta polifenolnih komponenti u cilju povećanja njihove koncentracije tokom stresnog perioda (Sharma i sar., 2019).

Antioksidativni kapacitet sekundarnih metabolita je meren preko stepena redukcije DPPH radikala, koji se često koristi kao brz, jednostavan i pouzdan metod za detekciju antioksidativne aktivnosti sekundarnih metabolita u različitim biološkim uzorcima (Kedare i sar., 2011). Sekundarni metaboliti kao antioksidansi reaguju sa radikalskim formama i sprečavaju procese oksidacije makromolekula. Povećana aktivnost antioksidanasa pri dehidrataciji detektovana je u listovima *I. walleriana* kao i kod nekoliko drvenastih biljnih vrsta u Srbiji (Štajner i sar., 2011), *Saccharum officinarum* (Abbas i sar., 2014), *Achillea sp.* (Gharibi i sar., 2016), *Silybum marinum* (Estaji i sar., 2020) i mnogih drugih. Rezultati antioksidativnog kapaciteta sekundarnih metabolita pri dehidrataciji prikazani u ovoj doktorskoj disertaciji su u korelaciji sa povećanom koncentracijom ukupnih polifenola, flavonola i karotenoida u listovima *I. walleriana*. Rezultati ukazuju da *I. walleriana* koristi antioksidativne osobine navedenih jedinjenja kao odbrambeni mehanizam usled povećane koncentracije ROS pri dehidrataciji tkiva.

## **5.6. Uticaj dehidratacije i rehidratacije na koncentraciju vodonik peroksida i stepen lipidne peroksidacije u listovima *I. walleriana***

Suša kao primarni stresogeni faktor uzrokuje i sekundarni oksidativni stres u biljnim ćelijama. Oksidativni stres nastaje kao posledica povećane produkcije ROS u različitim procesima koji se odigravaju u ćelijskim strukturama. ROS kroz procese oksidacija narušavaju membranske strukture, inaktiviraju enzime, utičući na funkcionalnost različitih fizioloških i metaboličkih procesa. U cilju evaluacije oksidativnog stresa merena je koncentracija  $H_2O_2$  u listovima *I. walleriana*. Povišena koncentracija  $H_2O_2$  u stresnim uslovima se smatra indikatorom stepena oksidativnog stresa u biljkama. Zabeležen je porast  $H_2O_2$  u listovima *I. walleriana* pri dehidrataciji, a slični rezultati opisani su i kod *L. culinaris* (Molla i sar., 2014), *Cicer arietinum* (Awasthi i sar., 2017), *Amaranthus tricolor* (Sarker i Oba., 2018) i *Chenopodium quinoa* (Iqbal i sar., 2018). Vodonik peroksid je neradikalska ROS forma koja se sintetiše u svim delovima ćelije, uključujući hloroplaste, peroksizome, mitohondrije, plazma membrane i apoplast (Noctor i sar., 2018). U uobičajenim, ali i stresnim okolnostima  $H_2O_2$  u ćeliji ima ulogu signalnog molekula utičući na ekspresiju različitih gena povezanih sa odgovorima biljaka na stres (Slesak i sar., 2007). Takođe, biljne ćelije su za razliku od životinjskih tolerantnije na visoke koncentracije  $H_2O_2$  i često elicitacija sa  $H_2O_2$  povećava otpornost biljaka na različite tipove stresa (Wang i sar., 2014; Terzi i sar., 2014; Hossain i sar., 2015; Farooq i sar., 2017). Toksičnost  $H_2O_2$  za ćelije ogleda se u njegovoj mogućnosti formiranja hidroksil radikala, koji predstavlja najreaktivniji i najtoksičniji radikalski oblik kiseonika. Kao proizvod Haber-Weissove i Fentonove reakcije nastaje  $OH^\cdot$  od  $H_2O_2$  i stoga je kontrola ovih procesa ključna za održavanje optimalnih koncentracija  $OH^\cdot$  u biljnim ćelijama (Demidchik, 2015). Kod nekih vrsta poput epifite *Guzmania monostachia*, zabeležen je pad koncentracije  $H_2O_2$  pri dehidrataciji (Carvalho i sar., 2017). Razlog za to je prisustvo CAM metabolizma koji omogućava akumulaciju malata i smanjenje fotorespiracije kao izvora  $H_2O_2$ . Pored toga zabeležena je i jako visoka aktivnost glutation reduktaze u uslovima vodnog deficita kod ove epifite.

Jedan od najčešće praćenih procesa u kome ROS učestvuju je peroksidacija lipida membrane. Lipidnom peroksidacijom narušava se integritet i funkcionalnost bioloških membrana, a samim tim i

procesu koji se odvijaju na njima. Produkti lipidne peroksidacije obuhvataju različite intermedijere i krajnje komponente među kojima je i MDA. Koncentracija MDA u različitim stresnim uslovima je često pominjan i ispitivan parametar. Povišena koncentracija MDA zabeležena je kod biljaka *I. walleriana* izlaganih dehidraciji pri vlažnosti supstrata od 15%. Isti rezultati prethodno su opisani i kod *T. aestivum* (Yang i Deng., 2015), *A. thaliana* (Chen i sar., 2016), *V. unguiculata* (Mafakheri i sar., 2016), *Festuca arundinacea* (Bi i sar., 2016) i *Achilea sp.* (Gharibi i sar., 2016), *Eucalyptus globulus* (Correia i sar., 2018). Međutim, zabeleženi su i slučajevi u kojima se koncentracija MDA nije menjala pri dehidraciji ili je čak opadala (Fu i Huang, 2001; Gharibi i sar., 2016). U ovoj doktorskoj disertaciji takođe je pokazano da se koncentracija MDA u ćelijama nije menjala izlaganjem biljaka *I. walleriana* intenzivnoj dehidraciji pri vlažnosti supstrata od 5%. Razlog za to može biti povećana aktivnost antioksidativnog odbrambenog sistema čije komponente, kako enzimske tako i neenzimske, uklanjaju ROS forme i njihove produkte, sprečavajući na taj način da dođe do ćelijske smrti. Komponente antioksidativnog odbrambenog sistema biljaka, u zavisnosti od genotipa i uzroka njihove indukcije, funkcionišu na način koji u datom momentu organizmu pruža maksimalnu zaštitu. Njihova aktivnost može biti povećana, ali takođe i smanjena ili čak nepromenjena u stresnim uslovima. Ukoliko neka komponenta antioksidativnog sistema zaštite smanjuje svoju aktivnost, aktivnost neke druge komponente se povećava, kompenzujući na taj način nedostatak prve aktivnosti. Kod nekih biljaka u stresnim uslovima je dominantnija aktivnost neenzimskih antioksidativnih komponenti dok se kod drugih to pripisuje enzimskim komponentama. U svakom slučaju, funkcionisanje komponenti antioksidativne zaštite je kompleksno i dinamično i zavisi od uticaja velikog broja faktora.

### **5.7. Uticaj dehidracije i rehidracije na aktivnost antioksidativnih enzima u listovima *I. walleriana***

Sa porastom stepena oksidativnog stresa menjala se i aktivnost antioksidativnih enzima u biljakama *I. walleriana* izlaganim različitim intenzitetima dehidracije. Antioksidativni enzimi su veoma često analizirani parametri pri različitim stresnim uslovima koji uključuju kako abiotički tako i biotički stres. U većini slučajeva, sa porastom koncentracije ROS formi u ćelijama raste aktivnost enzima koji ih uklanjaju s ciljem uspostavljanja homeostaze u organizmu. Međutim, postoje slučajevi u kojima se aktivnost nekih enzima ne menja ili čak opada sa povećanjem koncentracije ROS u ćelijama. Antioksidativni enzimi analizirani u ovoj disertaciji su: SOD, POX i CAT. Najveći porast aktivnosti SOD enzima zabeležen je pri vlažnosti supstrata od 15% kod *I. walleriana*. Povećanje aktivnosti SOD pri dehidraciji zabeleženo je takođe i kod *Glycyrrhiza glabra* (Hosseini i sar., 2018), *Cerasus humilis* (Ren i sar., 2016), *Oudneya africana* (Talbi i sar., 2015), *O. sativa* (Lum i sar., 2014) kao i kod mnogih drugih biljnih vrsta. Sa druge strane pri intenzivnoj dehidraciji (5% vlažnost supstrata) primećen je pad SOD aktivnosti kod *I. walleriana*. Varijabilnost odgovora SOD enzima na dehidraciju tkiva mnogo puta je dokumentovan i pored povećanja uključuje i opadanje ili nepromenjenost aktivnosti pomenutog enzima. Kod vrste *Kentucky bluegrass* u zavisnosti od organa, aktivnost SOD ostaje nepromenjena ili opada pri dehidraciji (Bian i Jiang., 2009). Različiti obrasci SOD aktivnosti zabeleženi su i kod kultivara *T. aestivum* (Sheoran i sar., 2015), *H. vulgare* (Harb i sar., 2015), *F. arundinacea* (Bi i sar. 2016), *S. bicolor* (Guo i sar., 2018) i mnogih drugih biljnih vrsta. Takođe, različite izoforme SOD enzima u biljkama su eksprimirane i detektovane pri različitim oblicima stresa. Kod *T. aestivum*, Mn-SOD izoforma ima najznačajniju ulogu u uklanjanju superoksid radikala pri dehidraciji (Huseynova i sar., 2014), dok je kod *Saccharum spp.* Fe-SOD izoforma u hloroplastima snažno eksprimirana pri dehidraciji, ukazujući na njen značaj u hloroplastnoj redoks ravnoteži (Sales i sar., 2015). Kod *I. walleriana* detektovane su tri izoforme (Mn-SOD i dve Cu/Zn-SOD) u svim tretmanima, sa izraženijom relativnom ekspresijom Cu/Zn-SOD izoforme pri vlažnosti supstrata od 15%. Na osnovu svega izloženog može se zaključiti da izlaganje biljaka stresu može da dovede do promene u aktivnosti postojećih izoformi enzima, kao i redukcije i sinteze novih izoformi.

Balans aktivnosti između SOD, POX i CAT enzima je fundamentalan za uklanjanje viška ROS u biljnim tkivima izloženim dejstvu stresogenih faktora. Rezultati ove doktorske disertacije pokazuju da kada SOD aktivnost raste pri 15% vlažnosti supstrata raste i aktivnost CAT, koja uklanja produkovani  $H_2O_2$ . Pri intenzivnoj dehidraciji SOD aktivnost opada, ali raste aktivnost POX u biljkama *I. walleriana* gajenim *ex vitro*. Peroksidaze i katalaze uklanjaju višak  $H_2O_2$ , s tim što postoje razlike u afinitetu i načinu delovanja ova dva enzima. Peroksidaze imaju veći afinitet prema  $H_2O_2$  uklanjajući ga iz različitih ćelijskih delova, koristeći različite elektron donore poput askorbata i glutationa (Ozyigit i sar., 2016). Detektovane su četiri različite POX izoforme u listovima *I. walleriana*, s tim što je izoforma D bila specifična samo biljke koje nisu bile izložene stresu, ukazujući da dehidracija negativno utiče na aktivnost izoforme D. Različite POX izoforme takođe su detektovane kod *I. walleriana* pri izlaganju dehidraciji indukovanoj polietilen glikolom *in vitro* (Antonić i sar., 2016) kao i kod *Trifolium sp.* pri dehidraciji u *ex vitro* uslovima (Vaseva i sar., 2012). Katalaza se smatra energetski vrlo efikasnim enzimom, ne samo zbog katalitičkih osobina, već i zbog toga što je jedini antioksidativni enzim koji ne proizvodi nove ROS forme. Katalaza pokazuje bifunkcionalnost u zavisnosti od koncentracije  $H_2O_2$ . Pri koncentracijama  $H_2O_2$  nižim od 1  $\mu M$  katalaza ima peroksidativnu aktivnost, odnosno zahteva donore elektrona za redukciju  $H_2O_2$ , dok pri višim koncentracijama supstrata katalaza vrši brzu reakciju razgradnje vodonik peroksida na vodu i kiseonik (Mhamdi i sar., 2010). Razlog zašto je prisutna veća peroksidazna aktivnost pri dehidraciji kod *I. walleriana* leži upravo u razlikama u afinitetu ovih enzima za  $H_2O_2$ . Povećanje peroksidazne aktivnosti uočeno je tek kad je koncentracija  $H_2O_2$  znatno povećana, odnosno pri intenzivnoj dehidraciji.

### 5.8. Karakteristike AQP proteina identifikovanih u transkriptomu *I. walleriana*

S obzirom na ulogu AQP u transportu vode i drugih molekula kroz ćelije, sprovedene su mnogobrojne analize njihove strukture i funkcije u različitim biljnim vrstama. Filogenetske analize ukazuju da AQP iz *I. walleriana* pripadaju PIP1, PIP2 i TIP4 podgrupama, dok su analize proteinskih sekvenci dale uvid u molekularnu strukturu ovih proteina što je u skladu sa prethodno opisanim strukturama AQP u drugim biljnim vrstama (Chaumont i sar., 2000; Dong i sar., 2007; Yue i sar., 2014; Sun i sar., 2017; Kumar i sar., 2020). Proteinska izoelektrična tačka AQP iz transkriptoma *I. walleriana* je u korelaciji sa njihovom pretpostavljenom unutarćelijskom lokalizacijom. Proteini poreklom iz citoplazme ili vakuole kao što je IwTIP4;1 imaju nižu izoelektričnu tačku u odnosu na plazmamembranske proteine poput IwPIP1;4, IwPIP2;2 i IwPIP2;7. Analizirani indeks stabilnosti ukazuje na stabilnu strukturu i konformaciju AQP kod *I. walleriana*. Svi analizirani AQP iz *I. walleriana* sadrže dualne NPA motive smeštene naspramno na dve strane membrane. Šest transmembranskih regiona detektovano je kod IwPIP2;2, IwPIP2;7 i IwTIP4;1, dok IwPIP1;4 sadrži pet transmembranskih regiona zbog parcijalne proteinske sekvence. Takođe, jedan LCR region detektovan je u akvaporinu IwTIP4;1. LCR regioni su regioni sa malom aminokiselinskom raznovrsnošću i generalno su slabo proučeni (Kumar i sar., 2017b). Iako su zastupljeni u eukariotskim proteinima, istraživanja njihove funkcije su i dalje malobrojna (Toll-Riera i sar., 2012; Kumar i sar., 2017b; Kumari i sar., 2018). Ne postoji dovoljno informacija o prisustvu i ulozi LCR regiona u biljkama, ali je opisana njihova uloga u uzrokovanju određenih humanih bolesti (Kumari i sar., 2018). Naime, nekontrolisana ekspanzija LCR regiona može da vodi ka njihovoj samoagregaciji i produkciji amiloidnih fibrila koji uzrokuju dijabetes tipa II, reumatoidni artritis i nekoliko neurodegenerativnih oboljenja kao što su Alchajmerova bolest, Parkinsonova bolest, spinocerebralna ataksija i Huntingtonova bolest (Michelitsch i Weissman, 2000; Gunawardena i Goldstein, 2005; Kumari i sar., 2018).

Dobijeni 3D modeli AQP monomera sa porama tj. kanalima za protok vode su slični skorašnjim istraživanjima autora Kumar i sar., (2020) dok stereohemijske karakteristike AQP ukazuju da se mali broj aminokiselina nalazi u energetski nedozvoljenim regionima. Ovakvi podaci

su u skladu sa mnogobrojnim prethodno publikovanim istraživanjima o stereochemijskim karakteristikama različitih proteina. Stereochemijske osobine krucina iz *Jatropha curcas* dobijene Ramačandran analizom ukazuju da se 96,30% aminokiselinskih ostataka nalazi u energetski dozvoljenim regionima i to 84,0% u najviše favorizovanim, 12,3% u dodatno favorizovanim, 1,9% u generičkim i 1,9% u nedozvoljenim regionima (Srivastava i sar., 2012). Skorašnja analiza DREB transkripcionih faktora (DREB1A, DREB1B i DREB1C) iz pirinča, ukazuje da se 99, 98,40 i 98,60% aminokiselinskih ostataka nalazi u energetski dozvoljenim regionima (Donde i sar., 2019). Ramačandran dijagrami za lipoksigenazu i hidroperoksid liazu iz *A. hypogaea*, kao i za hidroperoksid liazu iz *G. max* ukazuju da se 77,6, 65,7 i 82,4% aminokiselina nalazi u najviše favorizovanim regionima. Procenti aminokiselinskih ostataka u nedozvoljenim regionima za pomenuta tri enzima iznose 1,1, 5,7 i 1,2% (Preeti i sar., 2019). Stereochemijska analiza proteina Xa21 iz pirinča pomoću HHpred softvera ukazuje da se 99,2% aminokiselina nalazi u energetski povoljnim regionima (78,9% u najviše favorizovanim, 18,4% u dodatno favorizovanim, 1,9% u generičkim i 0,8% u nedozvoljenim regionima). Analizom istog proteina u PHYRE2 softveru, 4% aminokiselina manje se detektuje u najviše favorizovanim regionima (Mubassir i sar., 2020). Slični rezultati opisani su i za citokinin oksidazu/dehidrogenazu 2 – CKX2 iz pirinča (Gouda i sar., 2020). Enzim ureaza iz pirinča koji katalizuje reakciju razgradnje uree do amonijaka i ugljen dioksida, sadrži 83,6% aminokiselina u najviše favorizovanim regionima, 15,4% u dodatno favorizovanim, 0,8% u generičkim i 0,1% u nedozvoljenim regionim, što je pokazano analizom u PROCHECK softveru (Kumar i sar., 2018). Takođe, transkripcioni faktor DREB1 iz pšenice sadrži 83,7% aminokiselina u najviše favorizovanim regionima, 12,2% u dodatno favorizovanim i 4,1% u nedozvoljenim regionima, ukazujući na stabilnu konformaciju koja obezbeđuje biološku funkciju (Kumar i sar., 2016). Dodatne informacije o aminokiselinskom sastavu AQP iz *I. walleriana* obezbedila je i analiza indeksa hidrofobnosti/hidrofilnosti (Kyte i Doolittle, 1982), dok su dobijene strukture tetramera, odnosno holoproteina u skladu sa prethodno opisanim strukturama AQP iz čaja i duvana (Yue i sar., 2014; Sun i sar., 2017). Otvaranje i zatvaranje akvaporinskog kanala zavisi i od posttranslacionih modifikacija kao što su fosforilacija/defosforilacija, od uticaja pH vrednosti, katjona, hormonalnog statusa i koncentracije ROS (Pou i sar., 2016; Kailan i sar., 2018). Abiotički stresogeni faktori mogu uticati na sve navedene parametre i na taj način menjati aktivnost AQP (Salehi-Lisar i Bakhshayeshan-Agdam, 2016; Pou i sar., 2016; Kapilan i sar., 2018).

### 5.8.1. Ekspresija gena za AQP pri dehidraciji i rehidraciji u listovima *I. walleriana*

Analize ekspresije gena za akvaporine u mnogim biljnim vrstama ukazuju na veoma bitnu ulogu ovih proteina pri dehidraciji tj. u usklađivanju transporta vode shodno fiziološkom stanju biljnog organizma (Shekoofa i Sinclair, 2018; Avila i sar., 2020; Iwuala i sar., 2020). Dehidracija utiče na promene u ekspresiji gena za AQP *I. walleriana*, a stepen promene zavisi od intenziteta stresa i tipa AQP. U zavisnosti od intenziteta stresa primećeno je i povećanje i opadanje ekspresije gena za AQP u listovima *I. walleriana*, a najveći uticaj ispoljen je na ekspresiju *IwPIP2;7* gena.

Pri vlažnosti supstrata od 15% ekspresija gena *IwPIP2;7* je snažno redukovana dok je proces rehidracije imao suprotan uticaj, odnosno povećavao je ekspresiju ovog AQP. Sniženje ekspresije *IwPIP2;7* može biti objašnjeno kao doprinos smanjenju protoka, a samim tim i odavanja vode u atmosferu putem transpiracije. Sa druge strane, povišena ekspresija gena *IwPIP2;7* tokom procesa rehidracije doprinosi vraćanju homeostaze u ćelijama nakon perioda stresa. Uticaj intenzivne dehidracije pri vlažnosti supstrata od 5% takođe smanjuje ekspresiju gena *IwPIP2;7* doprinoseći inhibiciji transpiracionog gubitka vode iz listova dok rehidracija povećava ekspresiju *IwPIP2;7* gena u listovima *I. walleriana*. U prethodnim istraživanjima, pokazano je da je ekspresija gena *AtPIP2;7* u korenovima i izdancima *A. thaliana* redukovana stresom izazvanim solima (Boursiac i sar., 2005; Pou i sar., 2016), odnosno sušom u listovima (Alexandersson i sar., 2005). Sa druge strane, povišena ekspresija *PIP2;7* gena iz *S. lycopersicum* u transgenim *A. thaliana* i *S.*

*lycopersicum* doprinela je povećanju provodljivosti vode kroz listove i stopi preživljavanja u uobičajenim uslovima, kao i pri dehidraciji (Li i sar., 2016). Ekspresija gena *PvPIP2;7* kod *P. vulgaris* pri dehidraciji je zavisna od kultivara, sa većom stopom redukcije ekspresije u Tiber kultivaru tolerantnijem prema suši (Zupin i sar., 2017). Autori Hu i sar. (2017) ukazali su da je ekspresija *MaPIP2;7* gena značajno povećana nakon izlaganja biljaka banane osmotskom, stresu izazvanom solima i niskim temperaturama. Takođe je pokazano da, povećana ekspresija *MaPIP2;7* gena doprinosi povećanju tolerancije biljaka banane na stres izazvan solima, sušom i niskim temperaturama (Xu i sar., 2020).

Gen za akvaporin *IwPIP2;2* ispoljavao je povećanje ekspresije samo kod biljaka *I. walleriana* oporavljenih nakon stresa. Shodno tome, obrazac ekspresije *IwPIP2;2* gena tokom rehidracije može biti povezan sa procesom reaklimatizacije biljaka nakon izlaganja stresu. Pokazano je da je ekspresija *PIP2;2* gena takođe bila povišena u korenovima i listovima kod biljaka tri vrste kafe pri dehidraciji, ali i procesu rehidracije (Santos i Mazzafera, 2013). U korenovima *A. thaliana* *PIP2;2* gen je jedna od najčešće eksprimiranih izoformi AQP i pokazano je da mutanti *pip2;2* ispoljavaju narušenu hidrauličnu provodljivost korena, bez obzira na visoku ekspresiju homologa *PIP2;3* sa kojim *PIP2;2* deli više od 96% sekvenci (Javot i sar., 2003). S obzirom na to, može se pretpostaviti da su geni *IwPIP2;2* i *IwPIP2;7*, bez obzira na visok stepen homologije sekvenci, evoluirali sa nepreklapanjem funkcija u različitim tkivima. Očekuje se da će buduća istraživanja ekspresije *IwPIP2;2* i *IwPIP2;7* gena u korenovima, dati jasniji uvid u funkcije ovih AQP u različitim tkivima *I. walleriana* pri dehidraciji. Geni za akvaporine *IwPIP1;4* i *IwTIP4;1* ispoljavali su nisku ekspresiju kako u kontrolnim, tako i u biljkama izlaganim dehidraciji i rehidraciji. Najveći stepen ekspresije *IwPIP1;4* gena detektovan je u listovima biljaka oporavljenih od umerene dehidracije, izlaganih intenzivnoj dehidraciji i oporavljenih od intenzivne dehidracije. Blagi porast ekspresije gena *IwPIP1;4* tokom intenzivne dehidracije može biti značajan za održavanje homeostaze u ćelijama listova *I. walleriana*. Porast ekspresije gena *IwPIP1;4*, zajedno sa *IwPIP2;2* i *IwPIP2;7* tokom rehidracije biljaka, može doprineti reaklimatizaciji nakon stresnog perioda. Slični rezultati ekspresije *PIP1;4* gena prethodno su opisani kod tri vrste roda *Pyrus* (Paudel i sar., 2019). Naime, suša tokom letnjih meseci pozitivno reguliše ekspresiju *PIP1;4* gena kod svih vrsta, i objašnjava se kao doprinos poboljšanom dopremanju vode do ćelija koje trpe stres. Obrazac ekspresije *IwTIP4;1* gena ukazuje na minimalni doprinos *IwTIP4;1* konzervaciji vode pri vlažnosti supstrata od 15%, dok tokom rehidracije tonoplastna izoforma AQP ima sličnu ulogu kao i prethodno analizirani *I. walleriana* AQP. U istraživanju promene ekspresije *HvTIP4;1* gena kod *H. vulgare* zabeležen je porast u ekspresiji u listovima pri dehidraciji dok je proces rehidracije restaurirao ekspresiju *HvTIP4;1* do kontrolnih vrednosti (Kurowska i sar., 2019). Sa druge strane, kod vrste *C. arabica* redukovana je ekspresija *CaTIP4;1* gena u korenovima pri dehidraciji (Miniussi i sar., 2015). Zanimljivo je da je ekspresija *PvTIP4;1* gena pri dehidraciji ispoljavala različit trend u zavisnosti od kultivara *P. vulgaris*, sa većim stepenom redukcije kod kultivara tolerantnijeg prema suši (Zupin i sar., 2017). S obzirom da *IwTIP4;1* ima veći prečnik pore u odnosu na ostale akvaporine *I. walleriana*, može se takođe pretpostaviti i transport nekih molekula većih od molekula vode pomoću tonoplastnog AQP. Sumarno, povećana ili smanjena ekspresija gena za AQP u listovima *I. walleriana* pri dehidraciji ukazuje na važnu ulogu ovih proteina u održavanju fiziološke homeostaze putem usklađivanja transporta vode kroz tkiva.

Redukovano rastenje *I. walleriana* pri dehidraciji direktna je posledica smanjenog transporta vode kroz ćelije, a verovatno je i posledica smanjene ekspresije određenih AQP gena i aktivnosti AQP. Od svih analiziranih gena, najviše je redukovana ekspresija *IwPIP2;7* gena u listovima *I. walleriana* pri dehidraciji. Povećana ekspresija svih AQP gena tokom rehidracije uticala je na poboljšan protok vode kroz ćelije, a samim tim i na poboljšano rastenje biljaka. Rehidrirane biljke su morfološki bile sličnije kontrolnim biljkama nego biljkama koje su trpele

stress. Uticaj rehidracije na masu svežih i suvih izdanaka, ukupnu površinu listova i vodni potencijal izdanaka, prethodno su opisani u poglavlju 4.2.1.

Različiti obrasci ekspresije gena za akvaporine zabeleženi su kod brojnih biljnih vrsta pri dehidraciji. Kod *A. thaliana* zabeležen je i pad i porast ekspresije analiziranih gena za akvaporine (Alexandersson i sar., 2005). Autori Vandeleur i sar. (2009), ukazali su na povišenu ekspresiju *VvPIP1;1* gena u korenovima jednog kultivara vinove loze, dok je ekspresija istog gena u istom tkivu drugog kultivara bila nepromenjena pri dehidraciji. Sa druge strane, nisu zabeležene promene u ekspresiji *VvPIP2;2* gena kod oba kultivara pri dehidraciji. Povećana ekspresija gena *OsPIP1;2* i *OsPIP2;1* zabeležena je u listovima *O. sativa* pri dehidraciji (Yooyongwech i sar., 2013). Shodno prethodno pomenutoj redukciji ekspresije gena *PvPIP2;7* i *PvTIP4;1*, dehidracija je takođe redukovala i ekspresiju gena *PvPIP1;2* i *PvTIP1;1* u listovima *P. vulgaris*, dok je rehidracija imala suprotan uticaj (Zupin i sar., 2017). Različiti obrasci ekspresije AQP gena zabeleženi su u korenovima i listovima *Z. mays* i *S. bicolor* (Hasan i sar., 2017), kao i za osam AQP gena kod tri genotipa *Morus spp.* pri dehidraciji (Reddy i sar., 2017). Najnovija istraživanja ukazuju na bitnu ulogu AQP pri dehidraciji kod dva kultivara *Fragaria x ananassa* (Merlaen i sar., 2019), *Populus deltoids* (Muries i sar., 2019) i *Pennisetum glaucum* (Iwuala i sar., 2020).

## **5.9. Uticaj folijarne primene MeJA na rastenje i razviće *I. walleriana* pri dehidraciji i rehidraciji**

### **5.9.1. Uticaj folijarne primene MeJA na morfološke parametre *I. walleriana* pri dehidraciji i rehidraciji**

Folijarna primena MeJA u koncentraciji od 5 i 50  $\mu\text{M}$  uticala je na povećanje mase svežih izdanaka, ukupne površine listova i mase suvih izdanaka kod kontrolne grupe biljaka. Obe koncentracije elicitora uticale su na povećanje mase svežih i suvih izdanaka kontrolne grupe biljaka za drugi intenzitet dehidracije pri vlažnosti supstrata od 5%, s tim što je niža koncentracija MeJA ispoljavala veći uticaj. Niža koncentracija MeJA uticala je takođe na blagi porast ukupne površine listova kod kontrolne grupe biljaka za oba intenziteta dehidracije. Pri vlažnosti supstrata od 15% najveći uticaj na povećanje mase svežih izdanaka, ukupne površine listova kao i mase suvih izdanaka ispoljavala je 50  $\mu\text{M}$  koncentracija MeJA. Pri intenzivnoj dehidraciji pri vlažnosti supstrata od 5% veći uticaj na povećanje ukupne površine listova je ispoljavala niža koncentracija MeJA, dok je masa suvih izdanaka i dalje bila najveća kod biljaka tretiranih višom koncentracijom elicitora. Tokom procesa rehidracije, zabeležen je veći stepen oporavka biljaka prethodno tretiranih destilovanom vodom, u odnosu na biljke tretirane različitim koncentracijama MeJA. Uticaj elicitoracije MeJA na povećanje sveže i suve mase izdanaka i korenova pri različitim tretmanima stresa izazvanog solima zabeležen je i kod *B. napus* (Ahmadi i sar., 2018). Slični rezultati zabeleženi su i pri izlaganju *B. napus*, *B. campestris* i *B. juncea* suši indukovanoj sa 15% polietilen glikolom uz egzogeno primenu 0,5 mM MeJA. Elicitoracija MeJA povećavala je svežu masu biljaka pri dehidraciji, dok je suva masa bila povećana samo kod *B. juncea* (Alam i sar., 2014). Potapanje biljaka pšenice u rastvor 0,1  $\mu\text{M}$  MeJA uticalo je na povećanje sveže mase, dužine korena i izdanaka, prilikom izlaganja biljaka suši indukovanoj različitim koncentracijama manitola, a pozitivan uticaj zabeležen je takođe i kod nestresiranih biljaka (Allagulova i sar., 2020). Slični rezultati za različite parametre rasteња opisani su kod pet kultivara pšenice pri egzogeno primeni MeJA sedam dana nakon indukovanja suše (Anjum i sar., 2016). Folijarna primena MeJA u koncentraciji od 20  $\mu\text{M}$  uticala je na povećanje dužine, mase svežih i suvih izdanaka i korenova *G. max* pri dehidraciji (Mohamed i sar., 2017). Sa druge strane, folijarna primena 50  $\mu\text{M}$  MeJA uticala je na redukciju visine biljka, površine listova, prečnika izdanaka, multiplikaciju izdanaka itd. kako pri dehidraciji, tako i kod nestresiranih biljaka *G. max* (Anjum i sar., 2011b). Na osnovu svega navedenog može se zaključiti da uticaj MeJA na rastenje i razviće biljaka zavisi od genotipa,



primenjene koncentracije, ontogenetske faze i interakcije sa drugim biljnim hormonima. Takođe, destruktivni uticaj MeJA na rastenje i razviće posledica je stresogenog efekta ovog regulatora rastenja, dok je stimulacija rastenja i razvića rezultat indukovanja signalnih puteva povezanih sa odbranom biljaka od stresa. Bolji oporavak biljaka prethodno tretiranih destilovanom vodom može se objasniti uticajem MeJA na odloženi oporavak biljaka zbog pojačane percepcije stresogenog efekta. Metil jasmonat u kombinaciji sa sušom, pomaže biljkama u neutralisanju uticaja stresa, ali nakon zalivanja biljaka moguć je i inhibitorski uticaj samog elicitora. Pretpostavlja se da bi duže zalivanje biljaka u potpunosti neutralisalo efekte stresa, kako kod biljaka tretiranih destilovanom vodom tako i kod biljaka tretiranih sa MeJA.

### 5.9.2. Uticaj folijarne primene MeJA na provodljivost stoma i ekspresiju ABA metaboličkih gena u listovima *I. walleriana* pri dehidraciji i rehidraciji

Opšte je poznato da je uloga zatvaranja stoma pri dehidraciji sprečavanje prekomernog odavanja vode putem transpiracije. Biljke smanjuju provodljivost stoma pri dehidraciji, obezbeđujući na taj način veće zadržavanje vode u tkivima i veću turgidnost ćelija. Ovakvi rezultati zabeleženi su kod različitih kultivara *V. vinifera* (Tombesi i sar., 2015; Bota i sar., 2016), *Cicer arietinum* (Pang i sar., 2016), *O. sativa* (Ouyang i sar., 201; Wang i sar., 2018), *T. aestivum* (Ouyang i sar., 2017), *Z. mays* (Gleason i sar., 2017) i mnogih drugih biljnih vrsta. Povećanje koncentracije ABA pri dehidraciji utiče na zatvaranje stoma regulacijom turgora u ćelijama zatvaračicama i sadržaja jona u njima.

Elicitacija *I. walleriana* različitim koncentracijama MeJA aktivira signalne puteve povezane sa odgovorom biljaka na stres pri čemu je rezultat smanjena provodljivost stoma kod kontrolne grupe biljaka tretiranih MeJA, u odnosu na kontrolnu grupu biljaka tretiranu destilovanom vodom, sa najvećim ispoljenim efektom prilikom primene 50  $\mu\text{M}$  MeJA. Dobijeni rezultati ukazuju da elicitacija sa MeJA može da utiče na smanjenje transpiracije i kod kontrolne grupe biljaka, a takođe verovatno i na razmenu gasova. S obzirom na to, može se pretpostaviti i da se proces fotosinteze redukuje kod kontrolne grupe biljaka tretiranih MeJA. Međutim, to nije pravilo jer pored toga što MeJA može da redukuje razmenu gasova, takođe može i da utiče na povećanje WUE, što je opisano kod pšenice (Ma i sar., 2014b). Na osnovu toga, može se objasniti pozitivan uticaj MeJA na parametre rastenja kod kontrolne grupe biljaka *I. walleriana* (**Poglavlje 4.4.1.**). Pri dehidraciji pri vlažnosti supstrata od 15% najveći stepen redukcije provodljivosti stoma zabeležen je kod biljaka tretiranih sa 5  $\mu\text{M}$  MeJA, s tim što razlike nisu bile statistički značajne u odnosu na biljke tretirane destilovanom vodom. Neznatno veću provodljivost stoma imale su biljke tretirane višom koncentracijom MeJA pri vlažnosti supstrata od 15% dok je pri intenzivnoj dehidraciji provodljivost stoma bila niža kod biljaka tretiranih MeJA u odnosu na biljke tretirane destilovanom vodom. Uticaj MeJA na redukovanje provodljivosti stoma pri dehidraciji opisan je takođe kod *T. aestivum* (Ma i sar., 2014b) i *H. vulgare* (Pazirandeh i sar., 2015), dok je kod *B. oleracea* zabeleženo povećanje provodljivosti stoma pri dehidraciji kod biljaka tretiranih MeJA u odnosu na kontrolnu grupu biljaka (Wu i sar., 2012). U zavisnosti od genotipa, oba tipa odgovora mogu se posmatrati kroz adaptaciju biljaka na nedostatak vode u podlozi. Dodatno redukovanje provodljivosti stoma primenom MeJA redukuje proces transpiracije i odavanja vode u atmosferu pri dehidraciji, a može takođe da utiče i na povećanje WUE. Sa druge strane, povećanje provodljivosti stoma pod uticajem MeJA pri dehidraciji, može da pospeši proces fotosinteze, razmenu gasova i akumulaciju asimilata, a samim tim i prinos pri stresnim uslovima. Folijarna primena MeJA kod *Beta vulgaris* uticala je na poboljšanje intenziteta fotosinteze, snižavanje intracelularne koncentracije  $\text{CO}_2$  koja je povećana pri dehidraciji zbog nepotpunog zatvaranja stoma, kao i pospešivanja WUE, bez efekta na provodljivost stoma i stopu transpiracije (Fugate i sar., 2018). Takođe, MeJA nije uticao na promene provodljivosti stoma kod kontrolne grupe biljaka.

Karakteristično za ove biljke je da redukcija provodljivosti stoma nije ograničavajući faktor za fotosintezu, kao ni narušavanje fotosistema II (Fugate i sar., 2018).

Na osnovu analize ekspresije gena uočeno je da elicitacija sa MeJA povećava ekspresiju ABA metaboličkih gena (*IwNCED4*, *IwAAO2* i *IwABA8ox3*) kod kontrolne grupe biljaka *I. walleriana* za oba intenziteta dehidratacije. Najveća ekspresija uočena je kod kataboličkog gena *IwABA8ox3*, i to kod kontrolne grupe biljaka prilikom intenzivne dehidratacije pri vlažnosti supstrata od 5%. Ovi rezultati ukazuju da je pri uobičajenim uslovima favorizovan katabolizam apscisinske kiseline u odnosu na biosintezu ovog fitohormona. Pri dehidrataciji pri vlažnosti supstrata od 15% u listovima biljaka prethodno tretiranih destilovanom vodom i višom koncentracijom MeJA ekspresija *IwNCED4* i *IwAAO2* gena se povećala, dok je kod biljaka prethodno tretiranih nižom koncentracijom MeJA ekspresija navedenih gena bila redukovana u poređenju sa kontrolnim biljkama tretiranim istim elicitorima. Pri vlažnosti supstrata od 5% ekspresija *IwNCED4* gena se značajno povećala samo kod biljaka tretiranih višom koncentracijom MeJA u odnosu na kontrolnu grupu biljaka dok se ekspresija *IwAAO2* gena povećala u svim tretiranim grupama sa najvećim stepenom promene kod biljaka tretiranih višom koncentracijom MeJA. Ovakvi rezultati idu u prilog prethodno opisanim rezultatima koji se tiču promena u ekspresiji ABA metaboličkih gena u poglavlju 4.2.2.1. Prvi intenzitet dehidratacije (15% vlažnost supstrata) redukovao je ekspresiju *IwABA8ox3* gena u listovima biljaka prethodno tretiranih destilovanom vodom i nižom koncentracijom MeJA. Razlog za povećanu ekspresiju *IwABA8ox3* gena kod biljaka tretiranih višom koncentracijom MeJA pri istoj količini vlažnosti supstrata je povećana ekspresija i biosintetskih gena, odnosno pozitivna povratna sprega. Isto objašnjenje može se dati i za povećanu ekspresiju *IwABA8ox3* gena pri vlažnosti supstrata od 5% kod svih tretiranih grupa. Na osnovu dobijenih rezultata uočeno je da je elicitacija višom koncentracijom MeJA najviše uticala na favorizovanje biosinteze ABA pri vlažnosti supstrata od 15% jer je ekspresija biosintetskih gena bila veća u odnosu na katabolički gen. Sa druge strane, pri intenzivnoj dehidrataciji sa porastom ekspresije ABA biosintetskih gena značajno je rasla i ekspresija kataboličkog gena kod biljaka tretiranih višom koncentracijom MeJA. Opisani rezultati ukazuju na moguće isključivanje zastupljenosti hormona ABA i jasmonata u zavisnosti od stresa i da pri intenzivnoj dehidrataciji jasmonati imaju dominantnu ulogu u odgovorima biljaka *I. walleriana* prema dehidrataciji. Slično se može zaključiti i za biljke prethodno tretirane destilovanom vodom, s tim što je stepen promene bio znatno manji. Sa druge strane, biljke prethodno tretirane nižom koncentracijom MeJA povećavale su ekspresiju *IwNCED4* i *IwAAO2* gena samo pri vlažnosti supstrata od 5%, dok je u isto vreme ekspresija *IwABA8ox3* gena bila niža. Ovakvi rezultati ukazuju na zavisnost odgovora od primenjene koncentracije elicitora i intenziteta stresa. Takođe, u ovom slučaju, moguće je da je koncentracija jasmonata bila veća na početku stresnog perioda, a da je akumulacija ABA preovladala pri intenzivnijoj dehidrataciji. Proces rehidratacije nakon intenzivne dehidratacije je značajno redukovao ekspresiju ABA metaboličkih gena kod biljaka tretiranih MeJA, ukazujući da pri uobičajenim uslovima biljke nemaju potrebu da sintetišu ABA. Sa druge strane rehidratacija biljaka izlaganih isušivanju supstrata do 5%, a prethodno tretiranih destilovanom vodom, uticala je na povećanje ekspresije svih ABA metaboličkih gena. Ovakav rezultat može da ide u prilog smanjenoj ABA koncentraciji u listovima, s obzirom da je značajno povećana i ekspresija kataboličkog gena *IwABA8ox3*, kao rezultat pozitivne povratne sprege. Sličan obrazac ekspresije može se uočiti kod biljaka rehidriranih nakon umerene dehidratacije. Sa porastom ekspresije gena za biosintezu, povećavala se i ekspresija gena odgovornog za katabolizam ABA. Ovi rezultati mogu da idu u prilog sniženoj koncentraciji ABA u listovima nakon rehidratacije dok je ABA takođe mogla da se inaktivira i konjugacijom sa šećerima i formiranjem ABA glikozilnih estara.

### 5.9.3. Uticaj folijarne primene MeJA na vodni potencijal izdanaka i koncentraciju prolina u listovima *I. walleriana* pri dehidraciji i rehidraciji

Folijarna primena MeJA uticala je na snižavanje vodnog potencijala i povećanje koncentracije amino kiseline prolina kako kod kontrolnih tako i kod biljaka izlaganih dehidraciji, sa ispoljenim razlikama u zavisnosti od starosti biljaka *I. walleriana* i stepena stresa. Kod biljaka iz prve kontrolne grupe pri vlažnosti supstrata od 15%, niža koncentracija MeJA uticala je smanjenje vodnog potencijala izdanaka dok je viša koncentracija MeJA uticala na povećanje akumulacije prolina u odnosu na biljke tretirane destilovanom vodom. Biljke iz druge kontrolne grupe, pri 5% vlažnosti supstrata, tretirane nižom koncentracijom MeJA značajno su povećale koncentraciju prolina, dok su biljke tretirane višom koncentracijom elicitora imale niži vodni potencijal izdanaka, s tim što su dobijene vrednosti malo veće u odnosu na biljke iz prve kontrolne grupe. Pri dehidraciji uzrokovanoj isušivanjem supstrata do 15% vlažnosti kod biljaka tretiranih nižom koncentracijom MeJA utvrđen je najniži vodni potencijal izdanaka, a takođe, u isto vreme, određena je i najviša koncentracija prolina. Nasuprot tome, pri intenzivnoj dehidraciji uzrokovanoj isušivanjem supstrata do 5% vlažnosti biljke tretirane višom koncentracijom MeJA imaju najniži vodni potencijal i visoku koncentraciju prolina u listovima. Ovakvi rezultati ukazuju na zavisnost efekta elicitora od intenziteta stresa. Uticaj MeJA na snižavanje vodnog potencijala izdanaka može se objasniti uticajem na akumulaciju osmoprotektanata. Na primer, kod kamilice je folijarna primena MeJA uticala na povećanje ukupnog sadržaja šećera pri dehidraciji (Sadaghiani i sar., 2019), a slični rezultati opisani su i kod *V. unguiculata* (Sadeghipour, 2018), *O. majorana* (Farsi i sar., 2020) i *Citrus* kultivara (Xiong i sar., 2020). Akumulacija šećera i drugih osmoprotektivnih jedinjenja, može da smanji vodni potencijal u ćelijama biljaka, sprečavajući na taj način gubitak vode i narušavanje integriteta membrana pri dehidraciji. Kod vrste *B. vulgaris* folijarna primena MeJA uticala je na povećanje koncentracije prolina pri dehidraciji, kao i na povećanje relativnog sadržaja vode u ćelijama (Fugate i sar., 2018), ukazujući da akumulacija osmoprotektanata utiče na sprečavanje gubitka vode iz ćelija biljaka pri dehidraciji. Pozitivni efekti MeJA na povećanje koncentracije prolina pri dehidraciji opisani su i kod *H. vulgare* (Pazirandeh i sar., 2015), *V. unguiculata* (Sadeghipour, 2018), *Citrus* kultivara (Xiong i sar., 2020) i mnogih drugih bljnih vrsta.

### 5.9.4. Uticaj folijarne primene MeJA na koncentraciju fotosintetičkih pigmenata u listovima *I. walleriana* pri dehidraciji i rehidraciji

Folijarna primena MeJA uticala je na promene u koncentraciji fotosintetičkih pigmenata u listovima *I. walleriana* pri dehidraciji i rehidraciji. Kod kontrolne grupe biljaka za prvi intenzitet dehidracije pri vlažnosti supstrata od 15%, obe primenjene koncentracije MeJA su uticale na smanjenje koncentracije ukupnog hlorofila i ukupnih karotenoida, ali su sa druge strane uticale na povećanje odnosa hlorofila a/b. Kod kontrolne grupe biljaka za drugi intenzitet dehidracije pri vlažnosti supstrata od 5% obe koncentracije MeJA su uticale na blagi porast ukupnog hlorofila i ukupnih karotenoida u listovima *I. walleriana*, ali je odnos hlorofila a/b bio niži u odnosu na kontrolnu grupu biljaka tretiranu destilovanom vodom. Pri vlažnosti supstrata od 15% koncentracija ukupnog hlorofila i ukupnih karotenoida u listovima biljaka prethodno tretiranih MeJA bila je znatno niža u poređenju sa koncentracijom hlorofila u listovima *I. walleriana* tretiranih destilovanom vodom. Sa druge strane, pri istoj količini vlažnosti supstrata, odnos hlorofila a/b se povećao u listovima biljaka prethodno tretiranih MeJA i to najviše posle primene niže koncentracije MeJA. Pri vlažnosti supstrata od 5% koncentracija hlorofila se povećala u svim tretiranim grupama u poređenju sa kontrolnim biljakama, s tim što je najveća koncentracija hlorofila izmerena kod biljaka tretiranih višom koncentracijom MeJA. Najveći odnos hlorofila a/b uočen je kod biljaka tretiranih nižom koncentracijom MeJA pri vlažnosti supstrata od 5%, iako je ukupna koncentracija hlorofila kod ovih biljaka bila najniža. Uticaj elicitacije MeJA na ukupne karotenoide zapažen je pri intenzivnoj dehidraciji, pri čemu je najveća koncentracija pomoćnih fotosintetičkih pigmenata

zabeležena takođe kod biljaka prethodno tretiranih sa 50  $\mu\text{M}$  MeJA. Na osnovu navedenog, zapaža se da je niža koncentracija MeJA najviše uticala na povećanje odnosa hlorofila a/b pri dehidraciji, dok je viša koncentracija MeJA uzrokovala povećanje ukupne količine hlorofila i karotenoida u listovima *I. walleriana* pri intenzivnoj dehidraciji. Uticaj elicitacije MeJA na povećanje koncentracije fotosintetičkih pigmenata pri dehidraciji opisan je kod i kod *B. oleracea* (Wu i sar., 2012), *G. max* (Mohamed i Latif, 2017) i *P. vulgaris* (Mohi-Ud-Din i sar., 2021). Sa druge strane, kod slatkog krompira je opisan suprotan uticaj, odnosno smanjenje koncentracije ukupnog hlorofila i ukupnih karotenoida pri dehidraciji kod biljaka tretiranih MeJA u odnosu na netretiranu kontrolu (Yoshida i sar., 2020). Razlog povećanja akumulacije hlorofila pri dehidraciji pod uticajem jasmonata može biti posredovan povećanom akumulacijom citokinina. U skladu sa ovim autori Hassanein i sar. (2009) opisali su povećanje endogenog sadržaja citokinina pri dehidraciji kod soje prilikom folijarne primene 100  $\mu\text{M}$  MeJA. Nasuprot ovome, Ananieva i sar. (2004) opisali su smanjenje endogenog sadržaja citokinina, koncentracije hlorofila kao i ubranu senescenciju kod *Cucurbita pepo* prilikom egzogene primene MeJA kod biljaka gajenih u uobičajenim uslovima. Poznato je da fitohormoni citokinini imaju veoma važnu ulogu u razvoju hloroplasta i biosintezi hlorofila (Cortleven i sar., 2016).

#### **5.9.5. Uticaj folijarne primene MeJA na koncentraciju ukupnih polifenola, flavonola i DPPH aktivnost u listovima *I. walleriana* pri dehidraciji i rehidraciji**

Koncentracija ukupnih polifenola, flavonola i antioksidativni kapacitet biljaka menjao se pod uticajem folijarne primene MeJA kod kontrolnih *I. walleriana* kao i kod biljaka izlaganih dehidraciji sa uočenim razlikama u zavisnosti od intenziteta dehidracije i primenjene koncentracije elicitora. Povećana koncentracija ukupnih polifenola, flavonola i antioksidativni kapacitet zabeležen je pri vlažnosti supstrata od 15% kod kontrolne grupe biljaka posle primene 50  $\mu\text{M}$  MeJA, ukazujući na aktivaciju signalnih puteva povezanih sa stresom. Kod kontrolne grupe biljaka pri vlažnosti supstrata od 5%, promene u sadržaju navedenih komponenti su bile manje izražene i to sa blagim povećanjem ukupnih polifenola kod biljaka tretiranih sa 5  $\mu\text{M}$  MeJA, i redukovanim antioksidativnim kapacitetom. Suprotan uticaj na promene istih parametara je uočen posle primene 50  $\mu\text{M}$  MeJA. Pri oba indukovana intenziteta dehidracije koncentracija ukupnih polifenola bila je veća kod biljaka tretiranih destilovanom vodom u odnosu na biljke tretirane sa MeJA, što je slično trendu akumulacije MDA i  $\text{H}_2\text{O}_2$  u listovima *I. walleriana* (**Poglavlje 4.4.6**). Ovi rezultati nedvosmisleno ukazuju na uticaj elicitacije MeJA na prevenciju produkcije ROS formi i produkata oštećenja uzrokovanih ROS formama, što rezultuje i smanjenom akumulacijom fenolnih komponenti. Takođe, najveći uticaj na smanjenje koncentracije flavonola pri oba intenziteta dehidracije ispoljila je viša koncentracija MeJA. Antioksidativni kapacitet sekundarnih metabolita meren redukcijom DPPH radikala ukazao je na to da biljke povećavaju antioksidativni kapacitet pri dehidraciji i to sa najviše zabeleženim vrednostima kod biljaka prethodno tretiranih sa 5  $\mu\text{M}$  MeJA i to pri oba indukovana intenziteta dehidracije. Biljke prethodno tretirane destilovanom vodom i sa 50  $\mu\text{M}$  MeJA povećavaju antioksidativni kapacitet samo pri intenzivnoj dehidraciji.

Povećanje sadržaja flavonoida i fenolnih komponenti pod uticajem MeJA, zabeleženo je i kod dva kultivara soje pri dehidraciji u odnosu na netretirane biljke (Mohamed i Latif., 2017). Tolerantniji kultivar soje imao je manju koncentraciju navedenih komponenti u izdancima u odnosu na osetljiviji kultivar. Folijarna primena 50  $\mu\text{M}$  MeJA kod *Mentha*  $\times$  *piperita* uticala je na povećanje koncentracije ukupnih polifenola i flavonoida, kako kod kontrolne grupe biljaka tako i kod biljaka izlaganih umerenom i izraženom vodnom deficitu (Gholamreza i sar., 2019). Dodavanje MeJA u ćelijske kulture soje uticalo je na povećanje koncentracije ukupnih fenolnih jedinjenja, flavonoida i izoflavona, što je takođe uticalo na povećanje ekspresije gena uključenih u biosintetski put fenolnih komponenti (Jeong i sar., 2018). Kod medicinski značajne biljne vrste *Dracocephalum kotschy* elicitacija primenom 0,5 mM MeJA smanjivala je ukupni sadržaj polifenola i

antioksidativni kapacitet biljaka pri dehidraciji (Shirani Bidabadi i Sharifi, 2021). Kod ovih biljaka koncentracije MDA i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> su takođe bile snižene u poređenju sa netretiranim biljkama izlaganim dehidraciji. Razlog za smanjenu koncentraciju MDA i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kao i fenolnih komponenti i antioksidativnog kapaciteta, autori objašnjavaju direktnim neutralisanjem ROS formi od strane MeJA, pa stoga biljke i nemaju potrebu za biosintezom fenolnih jedinjenja i aktiviranjem antioksidativnog sistema odbrane.

#### **5.9.6. Uticaj folijarne primene MeJA na koncentraciju vodonik peroksida i malondialdehida u listovima *I. walleriana* pri dehidraciji i rehidraciji**

Izlaganje *I. walleriana* dehidraciji značajno je povećavalo stepen lipidne peroksidacije u listovima, odnosno koncentraciju H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i MDA. Primećeno je da je stepen povećanja koncentracije navedenih pokazatelja oksidativnog stresa najveći u listovima biljaka prethodno tretiranih destilovanom vodom, a potom izlaganih dehidraciji. U poređenju sa koncentracijom H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i MDA u listovima biljaka prethodno tretiranih različitim koncentracijama MeJA, a potom izlaganih dehidraciji, primećuju se značajne razlike. Naime, biljke tretirane sa MeJA imale su značajno nižu koncentraciju H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i MDA u listovima u odnosu na biljke kod kojih je umesto elicitora korišćena destilovana voda, ukazujući na ulogu MeJA u neutralisanju negativnih uticaja dehidracije putem uklanjanja proizvoda oksidativnog stresa. Pri vlažnosti supstrata od 15% najveći uticaj na smanjenje koncentracije H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i MDA pokazao je tretman elicitorije sa 50 µM MeJA. Pri vlažnosti supstrata od 5% niža koncentracija MeJA bila je efikasnija u neutralisanju proizvoda oksidativnog stresa u odnosu na kontrolnu grupu biljaka. U okviru oba intenziteta dehidracije, nisu ispoljene značajne razlike između niže i više primenjene koncentracije elicitora. Uticaj egzogene primene MeJA na sniženje koncentracije H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i MDA pri dehidraciji tkiva opisan je takođe kod *G. max* (Anjum i sar., 2011b), *B. oleracea* (Wu i sar., 2012), *B. napus* (Ahmadi i sar., 2018), *Brassica sp.* (Alam i sar., 2014), *V. unguiculata* (Sadeghipour, 2018), *T. aestivum* (Allagulova i sar., 2020), *Citrus* kultivara (Xiong i sar., 2020), *P. vulgaris* (Mohi-Ud-Din i sar., 2021) i mnogih drugih biljnih vrsta. Sa druge strane, zabeleženi su i negativni efekti MeJA na pokazatelje oksidativnog stresa pri dehidraciji. Naime, kod medicinski značajne biljne vrste *Verbascum sinuatum*, primena MeJA pri dehidraciji uticala je na povećanje koncentracije MDA i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i aktivnost peroksidaza (Karamian i sar., 2020). Slični rezultati opisani su nedavno i kod vrste *V. nuducuale* (Ghasemolu i sar., 2019) kod koje je sa porastom koncentracija MDA i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> rasla i koncentracija fenolnih jedinjenja. Proces rehidracije značajno je uticao na smanjenje koncentracije MDA i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kod biljaka *I. walleriana* prethodno tretiranih destilovanom vodom dok su kod biljaka tretiranih sa MeJA uočene oscilacije u promeni analiziranih parametara. Rehidracija biljaka prethodno tretiranih višom koncentracijom MeJA dovela je do porasta koncentracije MDA i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u listovima biljaka u odnosu na dehidratirane biljke *I. walleriana*, ukazujući na negativan uticaj MeJA nakon prestanka dejstva stresogenog faktora. Promene u koncentraciji MDA i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kod rehidratiranih biljaka tretiranih nižom koncentracijom MeJA bile su umerenije i uglavnom su podrazumevale blagi pad ili blagi porast u zavisnosti od prethodnog intenziteta stresa.

#### **5.9.7. Uticaj folijarne primene MeJA na aktivnost antioksidativnih enzima u listovima *I. walleriana* pri dehidraciji i rehidraciji**

Na osnovu analize aktivnosti antioksidativnih enzima u listovima *I. walleriana*, uočen je sličan trend kao i kod koncentracija MDA i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> prilikom dehidracije. Pri vlažnosti supstrata od 15% SOD, kao i POX i CAT aktivnost bile su najveće kod *I. walleriana* biljaka prethodno tretiranih destilovanom vodom, kod kojih su i koncentracije MDA i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> takođe bile najveće. Kod biljaka prethodno tretiranih sa različitim koncentracijama MeJA aktivnosti analiziranih enzima su bile niže, kao i koncentracije MDA i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Primećuje se da 50 µM MeJA najviše utiče na smanjenje CAT aktivnost pri vlažnosti supstrata od 15%, dok značajne razlike u SOD i POX aktivnostima u odnosu

na primenjenu koncentraciju elicitora nisu zabeležene. Pri vlažnosti supstrata od 5% zabeležen je porast SOD aktivnosti kod svih tretiranih grupa i to sa najvećim porastom kod biljaka tretiranih sa 50  $\mu\text{M}$  MeJA. Aktivnosti POX i CAT su i dalje bile najveće kod biljaka tretiranih destilovanom vodom kod kojih su i pri intenzivnoj dehidraciji koncentracije MDA i  $\text{H}_2\text{O}_2$  takođe bile najveće. Međutim, veoma je važno primetiti da je pri intenzivnoj dehidraciji, POX aktivnost bila povećana kod svih tretiranih grupa u odnosu na kontrolnu grupu biljaka, na osnovu čega se može zaključiti da ovi enzimi igraju glavnu ulogu u eliminisanju  $\text{H}_2\text{O}_2$  pri intenzivnoj dehidraciji, kako kod biljaka tretiranih destilovanom vodom tako i kod biljaka tretiranih sa MeJA. Sa druge strane, CAT aktivnost je pri intenzivnoj dehidraciji bila najveća kod biljaka tretiranih destilovanom vodom, dok su kod biljaka tretiranih MeJA promene bile daleko umerenije u odnosu na kontrolnu grupu biljaka iz istih tretmana elicitacije. Na osnovu navedenog, može se zaključiti da primena MeJA smanjuje samu proizvodnju ROS kao i proizvode oštećenja ROS formi što se reflektuje i na promene aktivnosti enzima antioksidativnog odbrambenog sistema pri dehidraciji.

Proces rehidracije neutrališe povećanu POX aktivnost pri dehidraciji dok je uticaj rehidracije na SOD i CAT aktivnost dinamičniji. Zabeležena je povećana CAT aktivnost kod biljaka rehidriranih nakon isušivanja supstrata do 15% vlažnosti, kao i kod biljaka tretiranih sa MeJA, a rehidriranih nakon isušivanja supstrata do 5% vlažnosti. Povećanje SOD aktivnosti zabeleženo je kod biljaka rehidriranih nakon isušivanja supstrata do 15% vlažnosti, a prethodno tretiranih sa 50  $\mu\text{M}$  MeJA, s tim što su vrednosti aktivnosti enzima i dalje bile ispod nivoa kontrolnih vrednosti. Sa druge strane, rehidracija nakon isušivanja supstrata do 5% vlažnosti uticala je na povećanje SOD aktivnosti kod biljaka tretiranih destilovanom vodom i nižom koncentracijom elicitora. Ovakvi rezultati ukazuju na mogući negativni uticaj MeJA tokom rane faze rehidracije biljaka, sve do momenta dok se biljke u potpunosti ne reaktiviraju kako na fiziološkom tako i na biohemijskom nivou.

Uticaj elicitacije MeJA na aktivnost antioksidativnih enzima dokumentovan je takođe kod mnogih biljnih vrsta. Kod soje, folijarna primena MeJA u koncentraciji od 50  $\mu\text{M}$  povećava aktivnost SOD, POX i CAT pri dehidraciji, što je praćeno smanjenjem lipidne peroksidacije (Anjum i sar., 2011b). Takođe, kod kupusa, primena MeJA i koronatina, funkcionalnog analoga MeJA, utiče na povećanje aktivnosti antioksidativnih enzima pri dehidraciji, a smanjuje koncentracije MDA i  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Wu i sar., 2012). Kod ječma, folijarna primena 100  $\mu\text{M}$  MeJA utiče na porast POX i APX aktivnosti pri dehidraciji odnosno smanjenje CAT aktivnosti. Kod ovih biljaka su i koncentracije MDA i  $\text{H}_2\text{O}_2$  pod uticajem MeJA pri dehidraciji bile povećane, čime se objašnjava i povećana aktivnost antioksidativnih enzima (Pazirandeh i sar., 2013). Primena jasmonske kiseline kod *Pennisetum glaucum* pri dehidraciji indukovanoj polietilen glikolom *in vitro*, uticala je na povećanje aktivnosti antioksidativnih enzima (SOD, APX i CAT) i smanjenje koncentracija MDA i  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Awan i sar., 2021). Kod biljaka *P. vulgaris* tretiranih MeJA zabeležen je porast SOD aktivnosti pri dehidraciji dok je CAT aktivnost bila nepromenjena, a POX aktivnost neznatno povećana u odnosu na netretirane biljke izlagane suši (Mohi-Ud-Din i sar., 2021). Sa druge strane, zabeležen je porast aktivnosti APX, DHAR i MDHAR enzima, kao i blago povećanje GR enzima pod uticajem MeJA u odnosu na netretirane biljke izlagane suši, ukazujući na značaj askorbat-glutationskog ciklusa u eliminaciji ROS formi. Ključni enzim askorbat-glutationskog ciklusa koji učestvuje u uklanjanju  $\text{H}_2\text{O}_2$  je APX, a prisutan je u citoplazmi, hloroplastima, mitohondrijima i peroksizomima. Askorbat peroksidaza razlaže  $\text{H}_2\text{O}_2$  do vode i kiseonika oksidacijom askorbata kao kofaktora. U zavisnosti od genotipa, tipa stresa i primenjenog elicitora, dominantnu ulogu u eliminaciji ROS imaju različite enzimske i neenzimske komponente antioksidativnog sistema odbrane.

### 5.9.8. Uticaj folijarne primene MeJA na ekspresiju gena za AQP u listovima *I. walleriana* pri dehidrataciji i rehidrataciji

Na osnovu analize ekspresije gena za AQP u listovima *I. walleriana* pri dehidrataciji i rehidrataciji, uočeno je da prethodna elicitacija sa MeJA uticala na promene u ekspresiji gena za AQP u zavisnosti od koncentracije primenjenog elicitora i intenziteta stresa.

Folijarna primena MeJA je povećala ekspresiju *IwPIP1;4* gena, kako kod kontrolne grupe *I. walleriana* tako i kod biljaka izlaganih stresu. Najveći porast ekspresije pometug gena uočen je kod kontrolne grupe biljaka za intenzivnu dehidrataciju pri vlažnosti supstrata od 5%, pri čemu nisu uočene značajne razlike u ekspresiji između biljaka tretiranih različitim koncentracijama elicitora. Prilikom ispitivanja obe vlažnosti supstrata, pokazano je da je najveći uticaj na povećanje ekspresije *IwPIP1;4* gena imao 50  $\mu$ M MeJA. Takođe, pri intenzivnoj dehidrataciji, ekspresija *IwPIP1;4* gena kod biljaka tretiranih MeJA u različitim koncentracijama, bila je znatno veća u odnosu na biljke tretirane destilovanom vodom. Ovakvi rezultati ekspresije *IwPIP1;4* gena pri dehidrataciji mogu se objasniti boljim protokom vode kroz ćelije u cilju održanja homeostaze i turgidnosti pri stresnim uslovima. Rehidratacija je dodatno povećala ekspresiju *IwPIP1;4* gena kod biljaka izlaganih prvom intenzitetu dehidratacije tj. pri vlažnosti supstrata od 15%. Suprotno ovome, rehidratacija biljaka nakon intenzivne dehidratacije povećala je ekspresiju *IwPIP1;4* gena samo kod biljaka prethodno tretiranih destilovanom vodom, a takođe je uticala i na smanjenje prethodno povećane ekspresije kod biljaka tretiranih MeJA. Smanjenje ekspresije *IwPIP1;4* gena nakon rehidratacije od intenzivne dehidratacije ukazuje na to da od intenziteta stresa zavisi proces oporavka biljaka. Naime, moguće je da nakon zalivanja biljaka do optimalne količine vlažnosti supstrata, prisutna koncentracija MeJA u listovima biljaka prethodno tretiranih ovim elicitorom, ispoljava inhibitorni uticaj na ekspresiju akvaporina kod *I. walleriana*.

Ekspresija *IwPIP2;2* gena bila je znatno niža u poređenju sa ostalim genima za akvaporine, kako kod kontrolnih tako i kod biljaka izlaganih dehidrataciji i rehidrataciji. Najveći stepen redukcije ekspresije *IwPIP2;2* gena uočava se kod biljaka prethodno tretiranih destilovanom vodom pri vlažnosti supstrata od 15% dok su vrednosti kod biljaka prethodno tretiranih MeJA nešto više pri istoj količini vlažnosti supstrata. Dobijeni rezultati ukazuju na minoran doprinos elicitacije sa MeJA na potencijalno poboljšani transport vode kroz ćelije pri dehidrataciji, u odnosu na biljke tretirane destilovanom vodom. Pri vlažnosti supstrata od 5% ekspresija *IwPIP2;2* gena se malo povećala kod biljaka prethodno tretiranih destilovanom vodom i nižom koncentracijom MeJA dok je viša koncentracija elicitora uticala na blago sniženje ekspresije. Rehidratacija je ispoljila suprotan uticaj u odnosu na dehidrataciju. Naime, rehidratacija je povećala ekspresiju *IwPIP2;2* gena kod biljaka koje su imale smanjenu ekspresiju gena pri dehidrataciji, a snizila je ekspresiju kod biljaka koje su pri dehidrataciji imale povećanu ekspresiju *IwPIP2;2* gena. Veoma je važno napomenuti da kod biljaka prethodno tretiranih višom koncentracijom MeJA ekspresija *IwPIP2;2* gena uopšte nije bila uočena pri rehidrataciji nakon isušivanja supstrata do 5% vlažnosti.

Najdinamičnije promene pod uticajem elicitacije MeJA zabeležene su analizom ekspresije *IwPIP2;7* gena. Folijarna primena niže koncentracije MeJA najviše je uticala na povećanje ekspresije analiziranog gena kod kontrolne grupe biljaka dok je pri oba intenziteta dehidratacije ispoljavala najveći uticaj na sniženje ekspresije pomenutog gena. Povećanje ekspresije *IwPIP2;7* gena kod kontrolne grupe biljaka pod uticajem MeJA doprinelo je boljem transportu vode kroz ćelije u uobičajenim uslovima, dok se sniženje ekspresije gena pri dehidrataciji može objasniti kao doprinos zadržavanju i čuvanju vode u ćelijama kao i smanjenju odavanja vode u atmosferu putem transpiracije. Takođe, pri intenzivnoj dehidrataciji, ekspresija *IwPIP2;7* gena bila je znatno snižena, kako kod biljaka prethodno tretiranih destilovanom vodom tako i kod biljaka tretiranih višom koncentracijom MeJA u poređenju sa ekspresijom istog gena pri vlažnosti supstrata od 15%. Rehidratacija nakon isušivanja supstrata do 15% vlažnosti je uticala na povećanje ekspresije



*IwPIP2;7* gena kod svih tretiranih grupa, ukazujući na značaj transporta vode pri reaklimatizaciji biljaka. Sa druge strane, rehidracija nakon isušivanja supstrata do 5% vlažnosti uticala je na povećanje ekspresije kod biljaka prethodno tretiranih sa MeJA, dok je kod biljaka tretiranih destilovanom vodom ekspresija bila blago snižena.

Umeren obrazac promene ekspresije uočen je kod tonoplastnog AQP, *IwTIP4;1*. Primećeno je da je elicitacija sa MeJA uticala na povećanje ekspresije *IwTIP4;1* gena kod kontrolne grupe biljaka za drugi intenzitet dehidracije (5% vlažnost supstrata), slično uticaju na ekspresiju *IwPIP2;7* gena, s tim što je stepen ekspresije *IwTIP4;1* gena manji. Pri dehidraciji uzrokovanoj isušivanjem supstrata do 15% vlažnosti, elicitacija sa MeJA je uticala na sniženje ekspresije *IwTIP4;1* gena, sa većim uticajem prilikom primene niže koncentracije elicitora, što se podudara i sa ekspresijom *IwPIP2;7* gena, a delimično i sa ekspresijom *IwPIP1;4* gena. Opisani rezultati ukazuju da ekspresija pomenutih gena može biti odgovorna za zadržavanje vode u ćelijama i sprečavanje njenog odavanja u atmosferu. Sa porastom intenziteta stresa, ekspresija *IwTIP4;1* gena se povećavala u svim tretiranim grupama, sa najviše ispoljenim promenama kod biljaka prethodno tretiranih nižom koncentracijom elicitora. Prikazani rezultati ukazuju da porast intenziteta stresa utiče i na potrebu za boljim protokom vode ka vakuoli sa ciljem održavanja turgidnosti ćelija. Rehidracija biljaka nakon umerene dehidracije je uticala na blagi porast ekspresije *IwTIP4;1* gena kod biljaka tretiranih sa MeJA, dok je kod biljaka tretiranih destilovanom vodom ekspresija bila neznatno redukovana. Rehidracija nakon intenzivne dehidracije snizila je ekspresiju *IwTIP4;1* gena u svim tretiranim grupama.

Primena MeJA pri uobičajenim uslovima, uticala je i na promenu ekspresije šest AQP gena iz *PIP1* i *PIP2* podgrupe u korenovima *P. vulgaris*, a u zavisnosti od koncentracije elicitora zabeleženo je smanjenje, povećanje, kao i neporomenjena ekspresija analiziranih gena (Sanchez Romera i sar., 2014). U promotorima *TIP* gena kod ječma, identifikovani su *cis* regulatorni elementi za MeJA indukovanu ekspresiju gena i pokazano je da tretman sa MeJA povećava ekspresiju četiri *TIP* gena (Kurowska i sar., 2020b). Kod dva kultivara vrste *Setaria italica* analizirana je ekspresija pet gena (*SiPIP1;2*, *SiPIP3;1*, *SiSIP1;1*, *SiNIP1;2*, i *SiTIP2;2*) tokom dehidracije indukovane polietilen glikolom, visokom temperaturom i salinitetom, kao i primenom regulatora rastenja – apscisinske kiseline, MeJA i salicilne kiseline (Singh i sar., 2019). Tokom dehidracije, ekspresija *SiPIP3;1*, *SiSIP1;1*, i *SiTIP2;2* gena bila je indukovana kod oba kultivara, dok je ekspresija *SiPIP1;2* gena prvo bila povećana samo na početku (1h nakon stresa) i to kod tolerantnog kultivara, a potom i redukovana nakon 12 i 24h dehidracije. Ekspresija *SiNIP1;2* gena je bila redukovana tokom svih tačaka dehidracije kod oba kultivara. Pod uticajem MeJA ekspresija svih gena bila je povećana kod tolerantnog kultivara dok je kod osetljivog kultivara MeJA uticao na povećanje ekspresije svih analiziranih gena izuzev *SiPIP1;1*. Pri povećanom salinitetu uticaj folijarne primene MeJA kod *Citrus sinensis* uticao je na povećanje ekspresije AQP gena *PIP1;1*, *PIP2;3* i *TIP4;1* (Mahmoud i sar., 2021).

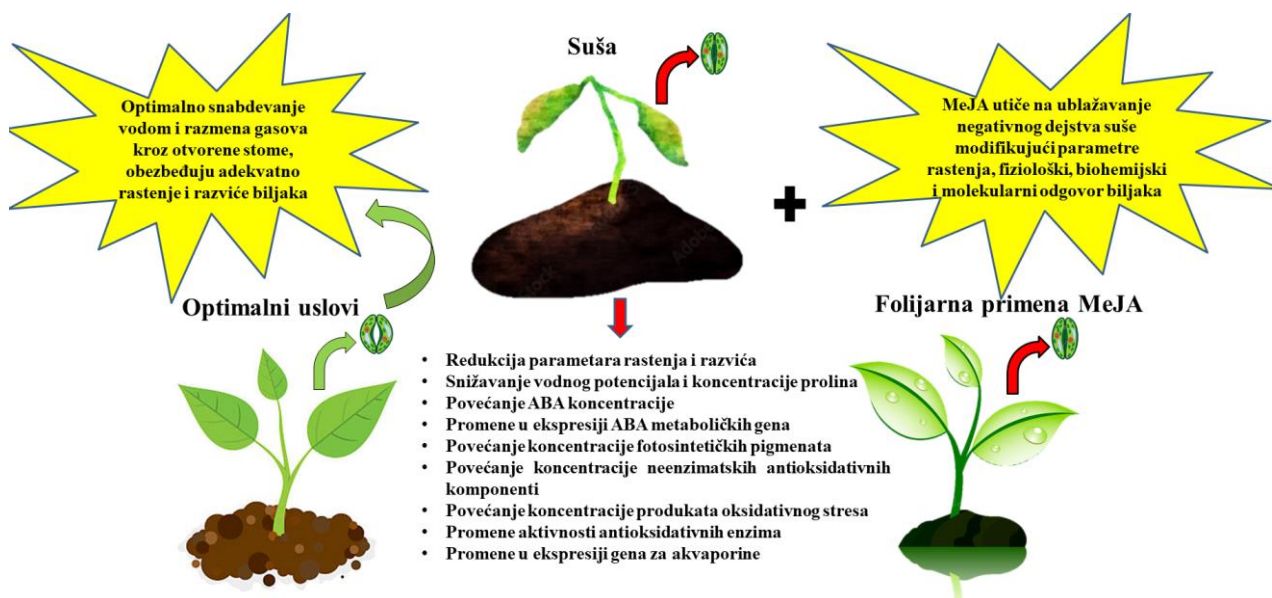
## 6. ZAKLJUČCI

Na osnovu predstavljenih rezultata u ovoj doktorskoj disertaciji izvode se sledeći zaključci:

- Dehidracija je negativno uticala na rastenje i razviće redukujući masu svežih izdanaka, ukupnu površinu listova kao i masu suvih izdanaka *I. walleriana* dok je rehidracija neutralisala negativne efekte stresogenog faktora.
- Dehidracija je povećala koncentraciju ABA u listovima *I. walleriana*, praćenu povećanjem ekspresije ABA biosintetskih gena *IwNCED4* i *IwAAO2* kao i promenama ekspresije ABA kataboličkog gena *IwABA8ox3*.
- Dehidracija je značajno snizila vodni potencijal i koncentraciju endogenog prolina u izdancima *I. walleriana* dok je proces rehidracije restaurirao navedene parametre.
- Povišene koncentracije fotosintetičkih pigmenata, hlorofila i karotenoida u listovima *I. walleriana* pri dehidraciji objašnjene su kao doprinos adaptivnom odgovoru biljaka na stres, prvenstveno ulogom karotenoida u antioksidativnom odbrambenom sistemu biljaka.
- Povišene koncentracije fenolnih komponenti, flavonola i antioksidativnog kapaciteta biljaka pri dehidraciji, ukazale su na njihov značaj u neutralisanju uticaja oksidativnog stresa manifestovanog povećanjem MDA i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u listovima *I. walleriana*.
- Povećane aktivnosti antioksidativnih enzima SOD, POX i CAT ukazale su na sinhronizovanu interakciju antioksidativnih komponenti u cilju neutralisanja produkovanih ROS pri dehidraciji.
- Karakteristike transportera za vodu – AQP, opisane su prvi put kod *I. walleriana* i dat je detaljan uvid u stereoheimijske osobine i molekularnu strukturu proteina.
- Filogenetske analize potvrdile su pripadnost *I. walleriana* AQP PIP1, PIP2 i TIP4 podgrupama; analizirane molekularne strukture AQP ukazale su na postojanje četiri monomera u okviru holoproteina sa različitim dužinama kanala i indeksom h/h; analizirane stereoheimijske osobine ukazale su na stabilne konformacije proteina. Na osnovu navedenog, zaključuje se da analizirani AQP iz transkriptoma *I. walleriana* imaju tipičnu strukturu članova MIP proteinske familije i da su na osnovu njihovih karakteristika podobni za analize ekspresije gena u različitim eksperimentalnim uslovima.
- Ekspresija akvaporinskih gena *IwPIP1;4*, *IwPIP2;2*, *IwPIP2;7* i *IwTIP4;1* pri dehidraciji ukazala je na njihov značaj u prilagođavanju transporta vode shodno fiziološkom stanju organizma.
- Redukcija ekspresije gena *IwPIP2;7* pri dehidraciji mogla je potencijalno da utiče na smanjenje odavanja vode putem transpiracije dok je povećanje ekspresije ostalih AQP gena pri dehidraciji i/ili rehidraciji moglo da utiče na održavanje homeostaze u ćelijama i procesu reaklimatizacije tokom oporavka.
- Elicitacija sa MeJA uticala je na povećanje mase svežih izdanaka, ukupne površine listova i mase suvih izdanaka kako kod kontrolnih tako i kod biljaka *I. walleriana* izlaganih dehidraciji.
- Uticaj folijarnog tretmana MeJA na redukciju provodljivosti stoma pri dehidraciji bio je najveći pri primeni niže koncentracije elicitora, dok je kod kontrolne grupe biljaka veći uticaj na sniženje provodljivosti stoma ispoljavala viša koncentracija MeJA.
- Ekspresija ABA metaboličkih gena najviše je bila indukovana sa primenom 50 μM MeJA pri oba intenziteta dehidracije.

- Najveći uticaj na povećanje koncentracije ukupnih hlorofila i karotenoida zapažen je pri intenzivnoj dehidraciji kod biljaka tretiranih višom koncentracijom elicitora, dok je za obe koncentracije elicitora uočen pozitivan uticaj na povećanje odnosa hlorofila a/b pri dehidraciji.
- MeJA je uticao na sniženje koncentracije H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i MDA pri dehidraciji, kao i na sniženje koncentracije ukupnih polifenola i flavonola u listovima *I. walleriana*.
- Folijarna primena MeJA smanjivala je aktivnost antioksidativnih enzima (SOD, POX i CAT) pri vlažnosti supstrata od 15%, dok je pri intenzivnoj dehidraciji značajno uticala na povećanje SOD i POX aktivnosti u odnosu na kontrolnu grupu biljaka. Međutim, pri oba intenziteta dehidracije POX i CAT aktivnosti su i dalje bile niže kod biljaka tretiranih MeJA u odnosu na grupe biljaka tretirane destilovanom vodom.
- Ekspresija *IwPIP1;4* gena bila je najveća prilikom elicitacije biljaka višom koncentracijom MeJA u kombinaciji sa intenzivnom dehidracijom u odnosu na grupu biljaka tretiranih destilovanom vodom.
- Ekspresija *IwPIP2;2* gena bila je najniža kod biljaka tretiranih destilovanom vodom pri vlažnosti supstrata od 15%, dok se pri intenzivnoj dehidraciji najniža ekspresija uočila kod biljaka tretiranih višom koncentracijom MeJA.
- Elicitacija nižom koncentracijom MeJA najviše je uticala na sniženje ekspresije *IwPIP2;7* gena pri oba intenziteta dehidracije ukazujući na značaj u smanjenju odavanja vode iz biljaka putem transpiracije.
- Pod uticajem niže koncentracije MeJA ekspresija *IwTIP4;1* gena bila je najniža pri izlaganju biljaka umerenom intenzitetu dehidracije dok je intenzivna dehidracija uticala na porast ekspresije gena za ovaj tonoplastni akvaporin.

Ilustrativni prikaz zaključaka predstavljen je na **Slici 42**.



**Slika 42.** Efekti suše i folijarne primene MeJA na rastenje i razviće *I. walleriana*. Slika predstavlja izvorni doprinos autora, Đurić Marije.

## 7. LITERATURA

Abbas, S. R., Ahmad, S. D., Sabir, S. M. & Shah, A. H. (2014). Detection of drought tolerant sugarcane genotypes (*Saccharum officinarum*) using lipid peroxidation, antioxidant activity, glycine-betaine and proline contents. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 14(1), 233-243.

Abascal, F., Irisarri, I. & Zardoya, R. (2014). Diversity and evolution of membrane intrinsic proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1840(5), 1468-1481.

Abbasi, A. R., Sarvestani, R., Mohammadi, B. & Baghery, A. (2014). Drought stress-induced changes at physiological and biochemical levels in some common vetch (*Vicia sativa* L.) genotypes. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 16(3), 505-516.

Abdelaal, K. A. (2015). Effect of salicylic acid and abscisic acid on morpho-physiological and anatomical characters of faba bean plants (*Vicia faba* L.) under drought stress. *Journal of Plant Production*, 6(11), 1771-1788.

Abdelgawad, Z. A., Khalafaallah, A. A. & Abdallah, M. M. (2014). Impact of methyl jasmonate on antioxidant activity and some biochemical aspects of maize plant grown under water stress condition. *Agricultural Sciences*, 5(12), 1077.

Aebi, H. (1984). Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*, 105, 121-126.

Afzal, Z., Howton, T., Sun, Y. & Mukhtar, M. (2016). The roles of aquaporins in plant stress responses. *Journal of Developmental Biology*, 4(1), 9.

Agati, G., Matteini, P., Goti, A. & Tattini, M. (2007). Chloroplast-located flavonoids can scavenge singlet oxygen. *New Phytologist*, 174(1), 77-89.

Agre, P. E. T. E. R., Preston, G. M., Smith, B. L., Jung, J. S., Raina, S. U. R. A. B. H. I., Moon, C. H. U. L. S. O., ... & Nielsen, S. B. R. E. N. (1993). Aquaporin CHIP: the archetypal molecular water channel. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 265(4), F463-F476.

Ahmadi, F. I., Karimi, K. & Struik, P. C. (2018). Effect of exogenous application of methyl jasmonate on physiological and biochemical characteristics of *Brassica napus* L. cv. Talaye under salinity stress. *South African Journal of Botany*, 115, 5-11.

Alam, M. M., Nahar, K., Hasanuzzaman, M. & Fujita, M. (2014). Exogenous jasmonic acid modulates the physiology, antioxidant defense and glyoxalase systems in imparting drought stress tolerance in different *Brassica* species. *Plant Biotechnology Reports*, 8(3), 279-293.

Alavi-Samani, S. M., Kachouei, M. A. & Pirbalouti, A. G. (2015). Growth, yield, chemical composition, and antioxidant activity of essential oils from two thyme species under foliar application of jasmonic acid and water deficit conditions. *Horticulture, Environment, and Biotechnology*, 56(4), 411-420.

Alexandersson, E., Fraysse, L., Sjövall-Larsen, S., Gustavsson, S., Fellert, M., Karlsson, M., ... & Kjellbom, P. (2005). Whole gene family expression and drought stress regulation of aquaporins. *Plant Molecular Biology*, 59(3), 469-484.

Allagulova, C., Avalbaev, A., Fedorova, K. & Shakirova, F. (2020). Methyl jasmonate alleviates water stress-induced damages by promoting dehydrins accumulation in wheat plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 155, 676-682.

- Altaf, R., Hussain, K., Maryam, U., Nawaz, K. & Siddiqi, E. H. (2015). Effect of different levels of drought on growth, morphology and photosynthetic pigments of lady finger (*Abelmoschus esculentus*). *World Journal of Agricultural Science*, 11, 198-201.
- Ananieva, K., Malbeck, J., Kamínek, M. & Van Staden, J. (2004). Methyl jasmonate down-regulates endogenous cytokinin levels in cotyledons of *Cucurbita pepo* (zucchini) seedlings. *Physiologia Plantarum*, 122(4), 496-503.
- Anjum, S. A., Xie, X. Y., Wang, L. C., Saleem, M. F., Man, C. & Lei, W. (2011a). Morphological, physiological and biochemical responses of plants to drought stress. *African Journal of Agricultural Research*, 6(9), 2026-2032.
- Anjum, S. A., Wang, L., Farooq, M., Khan, I. & Xue, L. (2011b). Methyl jasmonate-induced alteration in lipid peroxidation, antioxidative defence system and yield in soybean under drought. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 197(4), 296-301.
- Anjum, S. A., Tanveer, M., Hussain, S., Tung, S. A., Samad, R. A., Wang, L., ... & Shahzad, B. (2016). Exogenously applied methyl jasmonate improves the drought tolerance in wheat imposed at early and late developmental stages. *Acta Physiologiae Plantarum*, 38(1), 25.
- Anjum, S. A., Ashraf, U., Zohaib, A., Tanveer, M., Naeem, M., Ali, I., ... & Nazir, U. (2017a). Growth and development responses of crop plants under drought stress: a review. *Zemdirbyste*, 104(3), 267-276.
- Anjum, S. A., Ashraf, U., Tanveer, M., Khan, I., Hussain, S., Shahzad, B., Zohaib, A., Abbas, F., Saleem, M. F., Ali, I. & Wang, L. C., (2017b). Drought induced changes in growth, osmolyte accumulation and antioxidant metabolism of three maize hybrids. *Frontiers in Plant Science*, 8.
- Antonić, D., Milošević, S., Cingel, A., Lojić, M., Trifunović-Momčilov, M., Petrić, M., Subotić, A. & Simonović, A. (2016). Effects of exogenous salicylic acid on *Impatiens walleriana* L. grown *in vitro* under polyethylene glycol-imposed drought. *South African Journal of Botany*, 105, 226-233.
- Antonić, D. D., Subotić, A. R., Dragičević, M. B., Pantelić, D., Milošević, S. M., Simonović, A. D. & Momčilović, I. (2020). Effects of exogenous salicylic acid on drought response and characterization of dehydrins in *Impatiens walleriana*. *Plants*, 9(11), 1589.
- Arasimowicz-Jelonek, M. & Floryszak-Wieczorek, J. (2011). Understanding the fate of peroxynitrite in plant cells—from physiology to pathophysiology. *Phytochemistry*, 72(8), 681-688.
- Asch, F. 2000. Laboratory manual on determination of abscisic acid by indirect enzyme linked immuno sorbent assay (ELISA). The Royal Veterinary and Agricultural University Department of Agricultural Sciences Laboratory for Agrohydrology and Bioclimatology Agrovej 10, DK-2640 Taastrup, Denmark.
- Ashraf, R., Sultana, B., Iqbal, M. & Mushtaq, M. (2016). Variation in biochemical and antioxidant attributes of *Raphanus sativus* in response to foliar application of plant leaf extracts as plant growth regulator. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 14(1), 1-8.
- Asthir, B. (2015). Protective mechanisms of heat tolerance in crop plants. *Journal of Plant Interactions*, 10(1), 202-210.
- Avila, R. T., Cardoso, A. A., de Almeida, W. L., Costa, L. C., Machado, K. L., Barbosa, M. L., ... & DaMatta, F. M. (2020). Coffee plants respond to drought and elevated [CO<sub>2</sub>] through changes in

stomatal function, plant hydraulic conductance, and aquaporin expression. *Environmental and Experimental Botany*, 177, 104148.

Awad, J., Stotz, H. U., Fekete, A., Krischke, M., Engert, C., Havaux, M., ... & Mueller, M. J. (2015). 2-cysteine peroxiredoxins and thylakoid ascorbate peroxidase create a water-water cycle that is essential to protect the photosynthetic apparatus under high light stress conditions. *Plant Physiology*, 167(4), 1592-1603.

Awan, S. A., Khan, I., Rizwan, M., Zhang, X., Brestic, M., Khan, A., ... & Huang, L. (2021). Exogenous abscisic acid and jasmonic acid restrain polyethylene glycol-induced drought by improving the growth and antioxidative enzyme activities in pearl millet. *Physiologia Plantarum*, 172(2), 809-819.

Awasthi, R., Gaur, P., Turner, N. C., Vadez, V., Siddique, K. H. & Nayyar, H. (2017). Effects of individual and combined heat and drought stress during seed filling on the oxidative metabolism and yield of chickpea (*Cicer arietinum*) genotypes differing in heat and drought tolerance. *Crop and Pasture Science*, 68(9), 823-841.

Baenas, N., García-Viguera, C. & Moreno, D. A. (2014). Elicitation: a tool for enriching the bioactive composition of foods. *Molecules*, 19, 13541-13563.

Bandurska, H., Niedziela, J., Pietrowska-Borek, M., Nuc, K., Chadzinikolau, T. & Radzikowska, D. (2017). Regulation of proline biosynthesis and resistance to drought stress in two barley (*Hordeum vulgare* L.) genotypes of different origin. *Plant Physiology and Biochemistry*, 118, 427-437.

Barry, S. (1995). Vernal pools on California's annual grasslands. *Rangelands Archives*, 17(5), 173-175.

Bartomeus, I., Vila, M. & Steffan-Dewenter, I. (2010). Combined effects of *Impatiens glandulifera* invasion and landscape structure on native plant pollination. *Journal of Ecology*, 98(2), 440-450.

Basu, S., Ramegowda, V., Kumar, A. & Pereira, A. (2016). Plant adaptation to drought stress. *F1000Research*, 5, 1554.

Batool, S., Uslu, V. V., Rajab, H., Ahmad, N., Waadt, R., Geiger, D., Malagoli, M., Xiang, C.-B., Hedrich, R., Rennenberg, H., Herschbach, C., Hell, R. & Wirtz M. (2018). Sulfate is incorporated into cysteine to trigger ABA production and stomatal closure, *The Plant Cell*, 30 (12), 2973-2987,

Bauwe, H., Hagemann, M. & Fernie, A. R. (2010). Photorespiration: players, partners and origin. *Trends in Plant Science*, 15(6), 330-336.

Beauchamp, C. & Fridovich, I. (1971). Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, 44(1), 276-287.

Bertoni, M., Kiefer, F., Biasini, M., Bordoli, L. & Schwede, T. (2017). Modeling protein quaternary structure of homo- and hetero-oligomers beyond binary interactions by homology. *Scientific Reports*, 7(1), 1-15.

Beyer W. F. & Fridovich I. (1987): Assaying for superoxide dismutase activity: some large consequences of minor changes in conditions. *Analytical Biochemistry* 161(2), 559-566.

Bi, A., Fan, J., Hu, Z., Wang, G., Amombo, E., Fu, J. & Hu, T. (2016). Differential acclimation of enzymatic antioxidant metabolism and photosystem II photochemistry in tall fescue under drought and heat and the combined stresses. *Frontiers in Plant Science*, 7, 453.



- Bian, S. & Jiang, Y. (2009). Reactive oxygen species, antioxidant enzyme activities and gene expression patterns in leaves and roots of *Kentucky bluegrass* in response to drought stress and recovery. *Scientia Horticulturae*, 120(2), 264-270.
- Bielsa Pérez, B., Leida, C. & Rubio Cabetas, M., 2016. Physiological characterization of drought stress response and expression of two transcription factors and two LEA genes in three *Prunus* genotypes. *Scientia Horticulturae*, 2016, 213, 260-269.
- Bienert, S., Waterhouse, A., de Beer, T. A., Tauriello, G., Studer, G., Bordoli, L. & Schwede, T. (2017). The SWISS-MODEL Repository — new features and functionality. *Nucleic Acids research*, 45(D1), D313-D319.
- Blanke, M. M. & Cooke, D. T. (2004). Effects of flooding and drought on stomatal activity, transpiration, photosynthesis, water potential and water channel activity in strawberry stolons and leaves. *Plant Growth Regulation*, 42(2), 153-160.
- Blanusa, T., Vysini, E. & Cameron, R. W. (2009). Growth and flowering of *Petunia* and *Impatiens*: Effects of competition and reduced water content within a container. *HortScience*, 44(5), 1302-1307.
- Bota, J., Tomás, M., Flexas, J., Medrano, H. & Escalona, J. M. (2016). Differences among grapevine cultivars in their stomatal behavior and water use efficiency under progressive water stress. *Agricultural Water Management*, 164, 91-99.
- Boursiac, Y., Chen, S., Luu, D. T., Sorieul, M., van den Dries, N. & Maurel, C. (2005). Early effects of salinity on water transport in *Arabidopsis* roots. Molecular and cellular features of aquaporin expression. *Plant Physiology*, 139(2), 790-805.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
- Bramley, H., Turner, D. W., Tyerman, S. D. & Turner, N. C. (2007). Water flow in the roots of crop species: the influence of root structure, aquaporin activity, and waterlogging. *Advances in Agronomy*, 96, 133-196.
- Bray, E.A. (1997). Plant responses to water deficit. *Trends in Plant Science*, 2(2), 48-54.
- Briat, J. F. (2010). Arsenic tolerance in plants: “Pas de deux” between phytochelatin synthesis and ABCC vacuolar transporters. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(49), 20853-20854.
- Bueso, E., Alejandro, S., Carbonell, P., Perez-Amador, M. A., Fayos, J., Bellés, J. M., ... & Serrano, R. (2007). The lithium tolerance of the *Arabidopsis cat2* mutant reveals a cross-talk between oxidative stress and ethylene. *The Plant Journal*, 52(6), 1052-1065.
- Cai, S., Jiang, G., Ye, N., Chu, Z., Xu, X., Zhang, J. & Zhu, G. (2015). A key ABA catabolic gene, *OsABA8ox3*, is involved in drought stress resistance in rice. *PLoS One*, 10(2), e0116646.
- Caris, P. L., Geuten, K. P., Janssens, S. B. & Smets, E. F. (2006). Floral development in three species of *Impatiens* (Balsaminaceae). *American Journal of Botany*, 93(1), 1-14.
- Carvalho, V., Abreu, M. E., Mercier, H. & Nievola, C. C. (2017). Adjustments in CAM and enzymatic scavenging of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in juvenile plants of the epiphytic bromeliad *Guzmania monostachia* as affected by drought and rewatering. *Plant Physiology and Biochemistry*, 113, 32-39.

- Castiglioni, P., Warner, D., Bensen, R. J., Anstrom, D. C., Harrison, J., Stoecker, M. & Navarro, S. (2008). Bacterial RNA chaperones confer abiotic stress tolerance in plants and improved grain yield in maize under water-limited conditions. *Plant Physiology* 147(2), 446-455.
- Çelik, Ö., Ayan, A. & Atak, Ç. (2017). Enzymatic and non-enzymatic comparison of two different industrial tomato (*Solanum lycopersicum*) varieties against drought stress. *Botanical Studies*, 58(1), 32.
- Cerovic, Z. G., Masdoumier, G., Ghozlen, N. B. & Latouche, G. (2012). A new optical leaf-clip meter for simultaneous non-destructive assessment of leaf chlorophyll and epidermal flavonoids. *Physiologia Plantarum*, 146(3), 251-260.
- Chakraborty, N. & Acharya, K. (2016). Ex vivo analyses of formulated bio-elicitors from a phytopathogen in the improvement of innate immunity in host. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 49(17-18), 485-505.
- Chaumont, F., Barrieu, F., Jung, R. & Chrispeels, M. J. (2000). Plasma membrane intrinsic proteins from maize cluster in two sequence subgroups with differential aquaporin activity. *Plant Physiology*, 122(4), 1025-1034.
- Chaumont, F., Moshelion, M. & Daniels, M. J. (2005). Regulation of plant aquaporin activity. *Biology of the Cell*, 97(10), 749-764.
- Chen, Y. E., Liu, W. J., Su, Y. Q., Cui, J. M., Zhang, Z. W., Yuan, M., ... & Yuan, S. (2016). Different response of photosystem II to short and long-term drought stress in *Arabidopsis thaliana*. *Physiologia Plantarum*, 158(2), 225-235.
- Chen, C., Xin, K., Liu, H., Cheng, J., Shen, X., Wang, Y. & Zhang, L. (2017). *Pantoea alhagi*, a novel endophytic bacterium with ability to improve growth and drought tolerance in wheat. *Scientific Reports*, 7, 41564.
- Chen, K., Li, G. J., Bressan, R. A., Song, C. P., Zhu, J. K. & Zhao, Y. (2020). Abscisic acid dynamics, signaling, and functions in plants. *Journal of Integrative Plant Biology*, 62(1), 25-54.
- Choi, W. G. & Roberts, D. M. (2007). Arabidopsis NIP2; 1, a major intrinsic protein transporter of lactic acid induced by anoxic stress. *Journal of Biological Chemistry*, 282(33), 24209-24218.
- Christmann, A. & Grill, E. (2018). Peptide signal alerts plants to drought. *Nature*, 556, 178-179.
- Chyliński, W. K., Łukaszewska, A. J. & Kutnik, K. (2007). Drought response of two bedding plants. *Acta Physiologiae Plantarum*, 29(5), 399.
- Ciacka, K., Tymiński, M., Gniazdowska, A. & Krasuska, U. (2020). Carbonylation of proteins—an element of plant ageing. *Planta*, 252(1), 1-13.
- Ciscar, J. C. (2012). The impacts of climate change in Europe (the PESETA research project). *Climatic Change*, 112(1), 1-6.
- Consoli, S., Stagno, F., Vanella, D., Boaga, J., Cassiani, G. & Roccuzzo, G., (2017). Partial root-zone drying irrigation in orange orchards: Effects on water use and crop production characteristics. *European Journal of Agronomy*, 82, 190-202.

- Correia, B., Hancock, R. D., Amaral, J., Gomez-Cadenas, A., Valledor, L. & Pinto, G. C., (2018). Combined drought and heat activates protective responses in *Eucalyptus globulus* that are not activated when subjected to drought or heat stress alone. *Frontiers in Plant Science*, 9, 819.
- Corpas, F. J. & Barroso, J. B. (2017). Lead-induced stress, which triggers the production of nitric oxide (NO) and superoxide anion (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) in *Arabidopsis* peroxisomes, affects catalase activity. *Nitric Oxide*, 68, 103-110.
- Cortleven, A., Marg, I., Yamburenko, M. V., Schlicke, H., Hill, K., Grimm, B., ... & Schmölling, T. (2016). Cytokinin regulates the etioplast-chloroplast transition through the two-component signaling system and activation of chloroplast-related genes. *Plant Physiology*, 172(1), 464-478.
- Čuda, J., Skálová, H., Janovský, Z. & Pyšek, P. (2015). Competition among native and invasive *Impatiens* species: the roles of environmental factors, population density and life stage. *AoB Plants*, 7, plv033.
- Dai, J. & Mumper, R. J. (2010). Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*, 15(10), 7313-7352.
- Dash, A., (2018). Comparative study of relative water, chlorophyll and proline content in drought tolerant and susceptible genotypes of lentil (*Lens culinaris* Medik.). *Research Journal of Agricultural Sciences*, 8(5), 1081-1086.
- Dastborhan, S. & Ghassemi-Golezani, K. (2015). Influence of seed priming and water stress on selected physiological traits of borage. *Folia Horticulturae*, 27(2), 151-159.
- Delorme-Hinoux, V., Bangash, S. A., Meyer, A. J. & Reichheld, J. P. (2016). Nuclear thiol redox systems in plants. *Plant Science*, 243, 84-95.
- Del Río, L. A. & López-Huertas, E. (2016). ROS generation in peroxisomes and its role in cell signaling. *Plant and Cell Physiology*, 57(7), 1364-1376.
- Demidchik, V. (2015). Mechanisms of oxidative stress in plants: from classical chemistry to cell biology. *Environmental and Experimental Botany*, 109, 212-228.
- Denker, B. M., Smith, B. L., Kuhajda, F. P. & Agre, P. (1988). Identification, purification, and partial characterization of a novel Mr 28,000 integral membrane protein from erythrocytes and renal tubules. *Journal of Biological Chemistry*, 263(30), 15634-15642.
- de Ollas, C., Hernando, B., Arbona, V. & Gómez-Cadenas, A. (2013). Jasmonic acid transient accumulation is needed for abscisic acid increase in citrus roots under drought stress conditions. *Physiologia Plantarum*, 147(3), 296-306.
- Dias, M. C., Pinto, D. C., Freitas, H., Santos, C. & Silva, A. M. (2020). The antioxidant system in *Olea europaea* to enhanced UV-B radiation also depends on flavonoids and secoiridoids. *Phytochemistry*, 170, 112199.
- Dietz, K. J., Jacob, S., Oelze, M. L., Laxa, M., Tognetti, V., de Miranda, S. M. N., ... & Finkemeier, I. (2006). The function of peroxiredoxins in plant organelle redox metabolism. *Journal of Experimental Botany*, 57(8), 1697-1709.
- Donde, R., Gupta, M. K., Gouda, G., Kumar, J., Vadde, R., Sahoo, K. K., ... & Behera, L. (2019). Computational characterization of structural and functional roles of DREB1A, DREB1B and DREB1C in enhancing cold tolerance in rice plant. *Amino Acids*, 51(5), 839-853.

- Dong, Y., Yang, C., Zhang, D. & Wang, Y. (2007). Cloning and sequence analysis of gene encoding plasma aquaporin of *Tamarix albiflorum*. *Frontiers of Forestry in China*, 2(2), 217-221.
- Dörffling, K., Tietz, D., Streich, J., Ludewig, M. Studies on the role of abscisic acid in stomatal movements. In: *Plant Growth Substances 1979, Proceedings of the 10th International Conference on Plant Growth Substances, Madison, WI, USA, 22–26 July 1979*; Skoog, F., Ed.; Springer: Berlin, Germany, 1979; pp. 274-285.
- Dos Santos, C. V. & Rey, P. (2006). Plant thioredoxins are key actors in the oxidative stress response. *Trends in Plant Science*, 11(7), 329-334.
- Dröge-Laser, W., Snoek, B. L., Snel, B. & Weiste, C. (2018). The *Arabidopsis* bZIP transcription factor family — an update. *Current Opinion in Plant Biology*, 45, 36-49.
- Dvorak, P., Krasnylenko, Y., Zeiner, A., Samaj, J. & Takac, T. (2020). Signaling toward ROS-scavenging enzymes in plants. *Frontiers in Plant Science*, 11, 2178.
- Đurić, M., Subotić, A., Prokić, Lj., Trifunović-Momčilov, M., Cingel, A., Vujičić, M., & Milošević, S. (2020). Morpho-physiological and molecular evaluation of drought and recovery in *Impatiens walleriana* grown *ex vitro*. *Plants*, 9(11), 1559.
- Đurić, M. J., Subotić, A. R., Prokić, Lj. T., Trifunović-Momčilov, M. M., Cingel, A. D., Dragičević, M. B., Simonović, A. D., & Milošević, S. M. (2021). Molecular characterization and expression of four aquaporin genes in *Impatiens walleriana* during drought stress and recovery. *Plants*, 10(1), 154.
- Erlejman, A. G., Verstraeten, S. V., Fraga, C. G. & Oteiza, P. I. (2004). The interaction of flavonoids with membranes: potential determinant of flavonoid antioxidant effects. *Free Radical Research*, 38(12), 1311-1320.
- Ernst, L., Goodger, J. Q., Alvarez, S., Marsh, E. L., Berla, B., Lockhart, E., ... & Schachtman, D. P. (2010). Sulphate as a xylem-borne chemical signal precedes the expression of ABA biosynthetic genes in maize roots. *Journal of Experimental Botany*, 61(12), 3395-3405.
- Estaji, A. & Niknam, F. (2020). Foliar salicylic acid spraying effect' on growth, seed oil content, and physiology of drought-stressed *Silybum marianum* L. plant. *Agricultural Water Management*, 234, 106116.
- Fang, Y. & Xiong, L. (2015). General mechanisms of drought response and their application in drought resistance improvement in plants. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 72(4), 673-689.
- Farooq, M., Wahid, A., Kobayashi, N. S. M. A., Fujita, D. B. S. M. A. & Basra, S. M. A. (2009). Plant drought stress: effects, mechanisms and management. *Sustainable Agriculture*, 153-188.
- Farooq, M., Nawaz, A., Chaudhary, M. A. M. & Rehman, A. (2017). Foliage-applied sodium nitroprusside and hydrogen peroxide improves resistance against terminal drought in bread wheat. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 203(6), 473-482.
- Farsi, M., Abdollahi, F., Salehi, A. & Ghasemi, S. (2017). Study of physiological characteristics of marjoram (*Origanum majorana*), as a medicinal plant in response to zinc levels under drought stress conditions. *Environmental Stresses in Crop Sciences*, 10(4), 559-570.

- Farsi, M., Abdollahi, F., Salehi, A. & Ghasemi, S. (2020). Effect of methyl jasmonate on growth and essential oil content of marjoram (*Origanum majorana* L.) under drought stress conditions. *Journal of Plant Research (Iranian Journal of Biology)*, 33(3), 674-688.
- Fathi, A. & Tari, D. B. (2016). Effect of drought stress and its mechanism in plants. *International Journal of Life Sciences*, 10(1), 1-6.
- Fengyin, Z., Fangliang, L. & Ying, T. (2014). Effects of PEG imposed drought stress on the seed germination and seedling growth of *Impatiens balsamina*. *Journal of South China Normal University (Natural Science Edition)*, 2, 021.
- Fischer, E. (2004). Balsaminaceae. In *Flowering Plants· Dicotyledons* (pp. 20-25). Springer Berlin Heidelberg.
- Fortin, M. G., Zelechowska, M. & Verma, D. P. S. (1985). Specific targeting of membrane nodulins to the bacteroid-enclosing compartment in soybean nodules. *The EMBO Journal*, 4(12), 3041-3046.
- Friedman, M. (2004). Applications of the ninhydrin reaction for analysis of amino acids, peptides, and proteins to agricultural and biomedical sciences. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(3), 385-406.
- Fu J. & Huang B. (2001). Involvement of antioxidants and lipid peroxidation in the adaptation of two cool-season grasses to localized drought stress. *Environmental and Experimental Botany*, 45, 105-114.
- Fugate, K. K., Lafta, A. M., Eide, J. D., Li, G., Lulai, E. C., Olson, L. L., ... & Finger, F. L. (2018). Methyl jasmonate alleviates drought stress in young sugar beet (*Beta vulgaris* L.) plants. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 204(6), 566-576.
- Gai, Z., Wang, Y., Ding, Y., Qian, W., Qiu, C., Xie, H., ... & Ding, Z. (2020). Exogenous abscisic acid induces the lipid and flavonoid metabolism of tea plants under drought stress. *Scientific Reports*, 10(1), 1-13.
- Gambetta, G. A., Knipfer, T., Fricke, W. & McElrone, A. J. (2017). Aquaporins and root water uptake. In: *Plant aquaporins* (pp. 133-153). Springer, Cham.
- García-Valenzuela, X., García-Moya, E., Rascón-Cruz, Q., Herrera-Estrella, L. & Aguado-Santacruz, G. A. (2005). Chlorophyll accumulation is enhanced by osmotic stress in graminaceous chlorophyll cells. *Journal of Plant Physiology*, 162(6), 650-661.
- Gasic, K., Hernandez, A. & Korban, S. S. (2004). RNA extraction from different apple tissues rich in polyphenols and polysaccharides for cDNA library construction. *Plant Molecular Biology Reporter*, 22(4), 437-438.
- Gerbeau, P., Güçlü, J., Ripoche, P. & Maurel, C. (1999). Aquaporin Nt-TIPa can account for the high permeability of tobacco cell vacuolar membrane to small neutral solutes. *The Plant Journal*, 18(6), 577-587.
- Gharibi, S., Tabatabaei, B.E.S., Saeidi, G. & Goli, S.A.H. (2016). Effect of drought stress on total phenolic, lipid peroxidation, and antioxidant activity of *Achillea* species. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 178(4), 796-809.

- Gharibi, S., Tabatabaei, B. E. S., Saeidi, G., Talebi, M. & Matkowski, A. (2019). The effect of drought stress on polyphenolic compounds and expression of flavonoid biosynthesis related genes in *Achillea pachycephala* Rech. f. *Phytochemistry*, 162, 90-98.
- Ghasemlou, F., Amiri, H., Karamian, R. & Mirzaie-asl, A. (2019). Alleviation of the effects of on drought stress *Verbascum nudicuale* by methyl jasmonate and titanium dioxide nanoparticles. *Iranian Journal of Plant Physiology*, 9(4), 2911-2920.
- Ghassemi-Golezani, K. & Farhangi-Abriz, S. (2018). Foliar sprays of salicylic acid and jasmonic acid stimulate H<sup>+</sup>-ATPase activity of tonoplast, nutrient uptake and salt tolerance of soybean. *Ecotoxicology and Environmental Eafety*, 166, 18-25.
- Ghobadi, M., Taherabadi, S., Ghobadi, M. E., Mohammadi, G. R. & Jalali-Honarmand, S. (2013). Antioxidant capacity, photosynthetic characteristics and water relations of sunflower (*Helianthus annuus* L.) cultivars in response to drought stress. *Industrial Crops and Products*, 50, 29-38.
- Gholamreza, A. B. D. I., Shokrpour, M., Karami, L. & Salami, S. A. (2019). Prolonged water deficit stress and methyl jasmonate-mediated changes in metabolite profile, flavonoid concentrations and antioxidant activity in peppermint (*Mentha × piperita* L.). *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 47(1), 70-80.
- Ghorbel, M., Brini, F., Sharma, A. & Landi, M. (2021). Role of jasmonic acid in plants: the molecular point of view. *Plant Cell Reports*, 40(8), 1471-1494.
- Gill, S. S. & Tuteja, N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48(12), 909-930.
- Gill, S. S., Anjum, N. A., Gill, R., Yadav, S., Hasanuzzaman, M., Fujita, M., ... & Tuteja, N. (2015). Superoxide dismutase—mentor of abiotic stress tolerance in crop plants. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(14), 10375-10394.
- Gleason, S. M., Wiggans, D. R., Bliss, C. A., Comas, L. H., Cooper, M., DeJonge, K. C., Young, J. S. & Zhang, H. (2017). Coordinated decline in photosynthesis and hydraulic conductance during drought stress in *Zea mays*. *Flora*, 227, 1-9.
- Gogoi, R., Hareesh, V. S. & Adamowski, W. (2017). *Impatiens zironiana* (Balsaminaceae), a new species from Arunachal Pradesh, northeastern India. *Webbia*, 72(1), 83-86.
- González, L., & González-Vilar, M. (2001). Determination of relative water content. In Handbook of plant ecophysiology techniques (pp. 207-212). Springer, Dordrecht.
- González-Villagra, J., Rodrigues-Salvador, A., Nunes-Nesi, A., Cohen, J. D. & Reyes-Díaz, M. M. (2018). Age-related mechanism and its relationship with secondary metabolism and abscisic acid in *Aristotelia chilensis* plants subjected to drought stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, 124, 136-145.
- GonzálezVillagra, J., Cohen, J. D. & Reyes-Díaz, M. M. (2019). Abscisic acid is involved in phenolic compounds biosynthesis, mainly anthocyanins, in leaves of *Aristotelia chilensis* plants (Mol.) subjected to drought stress. *Physiologia Plantarum*, 165(4), 855-866.
- Goodarzian Ghahfarokhi, M., Mansurifar, S., Taghizadeh-Mehrjardi, R., Saeidi, M., Jamshidi, A. M. & Ghasemi, E. (2015). Effects of drought stress and rewatering on antioxidant systems and relative water content in different growth stages of maize (*Zea mays* L.) hybrids. *Archives of Agronomy and Soil Science*, 61(4), 493-506.

- Goodger, J. Q. & Schachtman, D. P. (2010). Re-examining the role of ABA as the primary long-distance signal produced by water-stressed roots. *Plant Signaling & Behavior*, 5(10), 1298-1301.
- Gouda, G., Gupta, M. K., Donde, R., Kumar, J., Vadde, R., Mohapatra, T. & Behera, L. (2020). Computational approach towards understanding structural and functional role of cytokinin oxidase/dehydrogenase 2 (CKX2) in enhancing grain yield in rice plant. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 38(4), 1158-1167.
- Granlund, I., Storm, P., Schubert, M., García-Cerdán, J. G., Funk, C. & Schröder, W. P. (2009). The TL29 protein is lumen located, associated with PSII and not an ascorbate peroxidase. *Plant Cell Physiol.*, 50, 1898-1910.
- Grey-Wilson, C. (1980). *Hydrocera triflora*, its floral morphology and relationship with *Impatiens*: Studies in Balsaminaceae: V. Kew Bulletin, 213-219.
- Grondin, A., Rodrigues, O., Verdoucq, L., Merlot, S., Leonhardt, N. & Maurel, C. (2015). Aquaporins contribute to ABA-triggered stomatal closure through OST1-mediated phosphorylation. *The Plant Cell*, 27(7), 1945-1954.
- Grondin, A., Mauleon, R., Vadez, V. & Henry, A. (2016). Root aquaporins contribute to whole plant water fluxes under drought stress in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant, Cell & Environment*, 39(2), 347-365.
- Gunawardena, S. & Goldstein, L. S. (2005). Polyglutamine diseases and transport problems: deadly traffic jams on neuronal highways. *Archives of Neurology*, 62(1), 46-51.
- Guo, Y.Y., Tian, S.S., Liu, S.S., Wang, W.Q. & Sui, N. (2018). Energy dissipation and antioxidant enzyme system protect photosystem II of sweet sorghum under drought stress. *Photosynthetica*, 56, 861-872.
- Gupta, A. B. & Sankararamakrishnan, R. (2009). Genome-wide analysis of major intrinsic proteins in the tree plant *Populus trichocarpa*: characterization of XIP subfamily of aquaporins from evolutionary perspective. *BMC Plant Biology*, 9(1), 134.
- Gupta, D. K., Palma, J. M. & Corpas, F. J. (Eds.). (2015). *Reactive oxygen species and oxidative damage in plants under stress* (pp. 1-22). Heidelberg, Germany: Springer.
- Haider, I., Andreo-Jimenez, B., Bruno, M., Bimbo, A., Floková, K., Abuauf, H., ... & Bouwmeester, H. J. (2018). The interaction of strigolactones with abscisic acid during the drought response in rice. *Journal of Experimental Botany*, 69(9), 2403-2414.
- Haider, F. & Ullah, N. (2019). Antioxidant and antimicrobial activity of *Impatiens walleriana* local to Malaysia. *Moroccan Journal of Chemistry*, 7(3), 548-553.
- Han, G. Z. (2017). Evolution of jasmonate biosynthesis and signaling mechanisms. *Journal of Experimental Botany*, 68(6), 1323-1331.
- Hanachi, P., Salehizadeh, S., Ramezani, R. & Zarringhalami, R. (2020). Comparison of antioxidant and anti-bacterial activities of *Ocimum basilicum* and *Impatiens walleriana* and their anticancer properties on SKOV-3 cancer cell line. *Food Science and Technology*, 17(106), 95-107.
- Hanba, Y. T., Shibasaka, M., Hayashi, Y., Hayakawa, T., Kasamo, K., Terashima, I. & Katsuhara, M. (2004). Overexpression of the barley aquaporin HvPIP2;1 increases internal CO<sub>2</sub> conductance



- and CO<sub>2</sub> assimilation in the leaves of transgenic rice plants. *Plant and Cell Physiology*, 45(5), 521-529.
- Harb, A., Krishnan, A., Ambavaram, M. M. & Pereira, A. (2010). Molecular and physiological analysis of drought stress in *Arabidopsis* reveals early responses leading to acclimation in plant growth. *Plant Physiology*, 154, 1254-1271.
- Harb, A., Awad, D. & Samarah, N. (2015). Gene expression and activity of antioxidant enzymes in barley (*Hordeum vulgare* L.) under controlled severe drought. *Journal of Plant Interactions*, 10(1), 109-116.
- Hareesh, V. S., Sreekumar, V. B., Dantas, K. J. & Sujanalal, P. (2015). *Impatiens sahyadrica* sp. nov (Balsaminaceae)-a new species from southern Western Ghats, India. *Phytotaxa*, 207(3), 291-296.
- Harp, D. A., Kay, K., Zlesak, D. C. & George, S. (2015). The effect of root size on drought stress tolerance and landscape plant performance. *Texas Journal of Agriculture and Natural Resources*, 28, 82-88.
- Harayama, H., Kitao, M., Agathokleous, E., & Ishida, A. (2019). Effects of major vein blockage and aquaporin inhibition on leaf hydraulics and stomatal conductance. *Proceedings of the Royal Society B*, 286(1904), 20190799.
- Hasan, S. A., Rabei, S. H., Nada, R. M. & Abogadallah, G. M. (2017). Water use efficiency in the drought-stressed sorghum and maize in relation to expression of aquaporin genes. *Biologia Plantarum*, 61(1), 127-137.
- Hassanein, R. A., Hassanein, A. A., El-din, A. B., Salama, M. & Hashem, H. A. (2009). Role of jasmonic acid and abscisic acid treatments in alleviating the adverse effects of drought stress and regulating trypsin inhibitor production in soybean plant. *Aust J Basic Appl Sci*, 3(2), 904-919.
- Havaux, M. (2014). Carotenoid oxidation products as stress signals in plants. *The Plant Journal*, 79(4), 597-606.
- Haworth, M., Marino, G., Cosentino, S. L., Brunetti, C., De Carlo, A., Avola, G., ... & Centritto, M. (2018). Increased free abscisic acid during drought enhances stomatal sensitivity and modifies stomatal behaviour in fast growing giant reed (*Arundo donax* L.). *Environmental and Experimental Botany*, 147, 116-124.
- Heath, R. L. & Packer, L. (1968). Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 125(1), 189-198.
- Henry, A., Cal, A. J., Batoto, T. C., Torres, R. O. & Serraj, R. (2012). Root attributes affecting water uptake of rice (*Oryza sativa*) under drought. *Journal of Experimental Botany*, 63(13), 4751-4763.
- Hossain, M. A., Munemasa, S., Uraji, M., Nakamura, Y., Mori, I. C. & Murata, Y. (2011). Involvement of endogenous abscisic acid in methyl jasmonate-induced stomatal closure in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 156(1), 430-438.
- Hossain, M. A., Bhattacharjee, S., Armin, S. M., Qian, P., Xin, W., Li, H. Y., Burritt, D. J., Fujita, M. & Tran, L. S. P. (2015). Hydrogen peroxide priming modulates abiotic oxidative stress tolerance: insights from ROS detoxification and scavenging. *Frontiers in Plant Science*, 6, 420.

- Hosseini, M. S., Samsampour, D., Ebrahimi, M., Abadía, J. & Khanahmadi, M. (2018). Effect of drought stress on growth parameters, osmolyte contents, antioxidant enzymes and glycyrrhizin synthesis in licorice (*Glycyrrhiza glabra* L.) grown in the field. *Phytochemistry*, 156, 124-134.
- Hu, W., Ding, Z., Tie, W., Yan, Y., Liu, Y., Wu, C., ... & Jin, Z. (2017). Comparative physiological and transcriptomic analyses provide integrated insight into osmotic, cold, and salt stress tolerance mechanisms in banana. *Scientific Reports*, 7(1), 1-12.
- Huseynova, I. M., Aliyeva, D. R. & Aliyev, J. A. (2014). Subcellular localization and responses of superoxide dismutase isoforms in local wheat varieties subjected to continuous soil drought. *Plant Physiology and Biochemistry*, 81, 54-60.
- Ikegami, K., Okamoto, M., Seo, M. & Koshiba, T. (2009). Activation of abscisic acid biosynthesis in the leaves of *Arabidopsis thaliana* in response to water deficit. *Journal of Plant Research*, 122(2), 235-243.
- Irani, S., Majidi, M. M., Mirlohi, A., Zargar, M. & Karami, M. (2015). Assessment of drought tolerance in sainfoin: physiological and drought tolerance indices. *Agronomy Journal*, 107(5), 1771-1781.
- Iqbal, H., Yaning, C., Waqas, M., Shareef, M. & Raza, S.T. (2018). Differential response of quinoa genotypes to drought and foliage-applied H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in relation to oxidative damage, osmotic adjustment and antioxidant capacity. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 164, 344-354.
- Iwuala, E., Odjegba, V., Sharma, V. & Alam, A. (2020). Drought stress modulates expression of aquaporin gene and photosynthetic efficiency in *Pennisetum glaucum* (L.) R. Br. genotypes. *Current Plant Biology*, 21, 100131.
- The IUCN, 15 March 2018. Red List of Threatened Species. Version 2017-3. [www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org)
- Jahn, T. P., Møller, A. L., Zeuthen, T., Holm, L. M., Klærke, D. A., Mohsin, B., ... & Schjoerring, J. K. (2004). Aquaporin homologues in plants and mammals transport ammonia. *FEBS Letters*, 574(1-3), 31-36.
- Janssens, S. B., Knox, E. B., Huysmans, S., Smets, E. F. & Merckx, V. S. (2009). Rapid radiation of *Impatiens* (Balsaminaceae) during Pliocene and Pleistocene: result of a global climate change. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 52(3), 806-824.
- Javot, H., Lauvergeat, V., Santoni, V., Martin-Laurent, F., Güçlü, J., Vinh, J., ... & Maurel, C. (2003). Role of a single aquaporin isoform in root water uptake. *The Plant Cell*, 15(2), 509-522.
- Jeong, Y. J., An, C. H., Park, S. C., Pyun, J. W., Lee, J., Kim, S. W., ... & Kim, C. Y. (2018). Methyl jasmonate increases isoflavone production in soybean cell cultures by activating structural genes involved in isoflavonoid biosynthesis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(16), 4099-4105.
- Jia, J., Liang, Y., Gou, T., Hu, Y., Zhu, Y., Huo, H., ... & Gong, H. (2020a). The expression response of plasma membrane aquaporins to salt stress in tomato plants. *Environmental and Experimental Botany*, 178, 104190.
- Jia, H., Wang, L., Li, J., Sun, P., Lu, M. & Hu, J. (2020b). Comparative metabolomics analysis reveals different metabolic responses to drought in tolerant and susceptible poplar species. *Physiologia Plantarum*, 168(3), 531-546.

- Kadioglu, A. & Terzi, R. (2007). A dehydration avoidance mechanism: leaf rolling. *The Botanical Review*, 73(4), 290-302.
- Kaldenhoff, R. & Fischer, M. (2006). Functional aquaporin diversity in plants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1758(8), 1134-1141.
- Kannan, N. D. & Kul, G. (2011). Drought induced changes in physiological, biochemical and phytochemical properties of *Withania somnifera* Dun. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(16), 3929-3935.
- Kapoor, D., Singh, S., Kumar, V., Romero, R., Prasad, R. & Singh, J. (2019). Antioxidant enzymes regulation in plants in reference to reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS). *Plant Gene*, 19, 100182.
- Kapoor, D., Bhardwaj, S., Landi, M., Sharma, A., Ramakrishnan, M. & Sharma, A. (2020). The impact of drought in plant metabolism: how to exploit tolerance mechanisms to increase crop production. *Applied Sciences*, 10(16), 5692.
- Kapilan, R., Vaziri, M. & Zwiazek, J. J. (2018). Regulation of aquaporins in plants under stress. *Biological Research*, 51(1), 4.
- Karamian, R., Ghasemlou, F. & Amiri, H. (2020). Physiological evaluation of drought stress tolerance and recovery in *Verbascum sinuatum* plants treated with methyl jasmonate, salicylic acid and titanium dioxide nanoparticles. *Plant Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*, 154(3), 277-287.
- Karatoprak, G. Ş., Paşayeva, L., Şafak, E. K., Göger, F., Tugay, O. & Koşar, M. (2019). Chemical composition and anti-inflammatory activity of *Kitaibelia balansae* Boiss. *Farmacologia*, 67(6), 1054-1059.
- Kataya, A. R. & Reumann, S. (2010). Arabidopsis glutathione reductase 1 is dually targeted to peroxisomes and the cytosol. *Plant Signaling & Behavior*, 5(2), 171-175.
- Kaur, G. & Asthir, B. (2015). Proline: a key player in plant abiotic stress tolerance. *Biologia Plantarum*, 59(4), 609-619.
- Kaur, G. & Asthir, B. (2017). Molecular responses to drought stress in plants. *Biologia Plantarum*, 61(2), 201-209.
- Kedare, S. B. & Singh, R. P. (2011). Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *Journal of Food Science and Technology*, 48(4), 412-422.
- Kelley, L. A., Mezulis, S., Yates, C. M., Wass, M. N. & Sternberg, M. J. (2015). The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nature Protocols*, 10(6), 845-858.
- Khalil, N., Fekry, M., Bishr, M., El-Zalabani, S. & Salama, O. (2018). Foliar spraying of salicylic acid induced accumulation of phenolics, increased radical scavenging activity and modified the composition of the essential oil of water stressed *Thymus vulgaris* L. *Plant Physiology and Biochemistry*, 123, 65-74.
- Khamsuk, O., Sonjaroon, W., Suwanwong, S., Jutamane, K. & Suksamrarn, A. (2018). Effects of 24-epibrassinolide and the synthetic brassinosteroid mimic on chili pepper under drought. *Acta Physiologiae Plantarum*, 40(6), 1-12.

- Kholova, J., Hash, C. T., Kumar, P. L., Yadav, R. S., Kočová, M. & Vadez, V. (2010). Terminal drought-tolerant pearl millet [*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.] have high leaf ABA and limit transpiration at high vapour pressure deficit. *Journal of Experimental Botany*, 61(5), 1431-1440.
- Khoyerdi, F. F., Shamshiri, M. H. & Estaji, A. (2016). Changes in some physiological and osmotic parameters of several pistachio genotypes under drought stress. *Scientia Horticulturae*, 198, 44-51.
- Kim, H. J., Fonseca, J. M., Choi, J. H. & Kubota, C. (2007). Effect of methyl jasmonate on phenolic compounds and carotenoids of romaine lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(25), 10366-10372.
- Kim, E.H., Kim, Y.S., Park, S.H., Koo, Y.J., Do Choi, Y., Chung, Y.Y., Lee, I.J. & Kim, J.K., (2009). Methyl jasmonate reduces grain yield by mediating stress signals to alter spikelet development in rice. *Plant Physiology*, 149(4), 1751-1760.
- Kim, H. J., Park, K. J. & Lim, J. H. (2011). Metabolomic analysis of phenolic compounds in buckwheat (*Fagopyrum esculentum* M.) sprouts treated with methyl jasmonate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(10), 5707-5713.
- Kim, J., Malladi, A. & Van Iersel, M. W. (2012). Physiological and molecular responses to drought in *Petunia*: the importance of stress severity. *Journal of Experimental Botany*, 63(18), 6335-6345.
- Klingler, J. P., Batelli, G. & Zhu, J. K. (2010). ABA receptors: the START of a new paradigm in phytohormone signalling. *Journal of Experimental Botany*, 61(12), 3199-3210.
- Koefoed-Johnsen, V. (1953). The Contributions of diffusion and flow to the passage of D<sub>2</sub>O through living membranes: Effect of neurohypophysenl hormone 011 isolated anuran skin. *Acta Physiologica Scandinavica*, 28(1), 60-76.
- Kooyers, N. J. (2015). The evolution of drought escape and avoidance in natural herbaceous populations. *Plant Science*, 234, 155-162.
- Kørup, K., Laerke, P. E., Baadsgaard, H., Andersen, M. N., Kristensen, K., Muennich, C., ... & Jørgensen, U. (2018). Biomass production and water use efficiency in perennial grasses during and after drought stress. *Gcb Bioenergy*, 10(1), 12-27.
- Kowalczewski, P. Ł., Radzikowska, D., Ivanišová, E., Szwengiel, A., Kačániová, M. & Sawinska, Z. (2020). Influence of abiotic stress factors on the antioxidant properties and polyphenols profile composition of green barley (*Hordeum vulgare* L.). *International Journal of Molecular Sciences*, 21(2), 397.
- Kumar, A., Kumar, S., Kumar, U., Suravajhala, P. & Gajula, M. P. (2016). Functional and structural insights into novel DREB1A transcription factors in common wheat (*Triticum aestivum* L.): A molecular modeling approach. *Computational Biology and Chemistry*, 64, 217-226.
- Kumar, A., Lata, C., Krishnamurthy, S. L., Kumar, A., Prasad, K. R. K. & Kulshreshtha, N., (2017a). Physiological and biochemical characterization of rice varieties under salt and drought stresses. *Journal of Soil Salinity and Water Quality*, 9(2), 167-177.
- Kumar, M., Kumari, B. & Kumar, R. (2017b). Structural analysis of low complexity regions of proteins. *Canadian Journal of Biotechnology*, 1(Special Issue, Supplement), 219.

- Kumar, A., Kumar, S., Kumar, A., Sharma, N., Sharma, M., Singh, K. P., ... & Gajula, M. P. (2018). Homology modeling, molecular docking and molecular dynamics based functional insights into rice urease bound to urea. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*, 88(4), 1539-1548.
- Kumar, N., Kumawat, S., Khatri, P., Singla, P., Tandon, G., Bhatt, V., ... & Deshmukh, R. (2020). Understanding aquaporin transport system in highly stress-tolerant and medicinal plant species Jujube (*Ziziphus jujuba* Mill.). *Journal of Biotechnology*, 324, 103-111.
- Kumari, B., Kumar, R., Chauhan, V. & Kumar, M. (2018). Comparative functional analysis of proteins containing low-complexity predicted amyloid regions. *PeerJ*, 6, e5823.
- Kuromori, T., Seo, M. & Shinozaki, K. (2018). ABA transport and plant water stress responses. *Trends in Plant Science*, 23(6), 513-522.
- Kurowska, M. M., Wiecha, K., Gajek, K. & Szarejko, I. (2019). Drought stress and re-watering affect the abundance of TIP aquaporin transcripts in barley. *PLoS One*, 14(12), e0226423.
- Kurowska, M. M. (2020a). TIP Aquaporins in plants: Role in abiotic stress tolerance. In: Fahad S (eds), *Abiotic Stress in Plants*. IntechOpen, London, United Kingdom, 279.
- Kurowska, M. M., Daszkowska-Golec, A., Gajecka, M., Kościelniak, P., Bierza, W. & Szarejko, I. (2020b). Methyl jasmonate affects photosynthesis efficiency, expression of *HvTIP* genes and nitrogen homeostasis in barley. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(12), 4335.
- Kurowska, M. M. (2021). Aquaporins in cereals—important players in maintaining cell homeostasis under abiotic stress. *Genes*, 12(4), 477.
- Kyte, J. & Doolittle, R. F. (1982). A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *Journal of Molecular Biology*, 157(1), 105-132.
- Lai, H. Y., Lam, C. M., Wang, W. Z. & Ji, Y. J. (2017). Cadmium uptake by cuttings of *Impatiens walleriana* in response to different cadmium concentrations and growth periods. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 98(3), 317-322.
- Laanemets, K., Brandt, B., Li, J., Merilo, E., Wang, Y. F., Keshwani, M. M., ... & Schroeder, J. I. (2013). Calcium-dependent and -independent stomatal signaling network and compensatory feedback control of stomatal opening via Ca<sup>2+</sup> sensitivity priming. *Plant Physiology*, 163(2), 504-513.
- Laskowski, R. A., MacArthur, M. W. & Thornton, J. M. (2006). PROCHECK: validation of protein-structure coordinates. *International Tables for Crystallography, F. (Ch. 25.2)*, 722-725.
- Laxa, M., Liebthal, M., Telman, W., Chibani, K. & Dietz, K. J. (2019). The role of the plant antioxidant system in drought tolerance. *Antioxidants*, 8(4), 94.
- Lei, M. A., Yang, L. I. & Hong-yu, M. A. O. (2015). Effects of drought stress and rewatering on growth and photosynthetic parameters of *Chrysanthemum morifolium*. *Chinese Horticulture Abstracts*, 5, 006.

- Levchenko, V., Konrad, K. R., Dietrich, P., Roelfsema, M. R. G. & Hedrich, R. (2005). Cytosolic abscisic acid activates guard cell anion channels without preceding Ca<sup>2+</sup> signals. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(11), 4203-4208.
- Li, R., Wang, J., Li, S., Zhang, L., Qi, C., Weeda, S., ... & Guo, Y. D. (2016). Plasma membrane intrinsic proteins SIPIP2; 1, SIPIP2; 7 and SIPIP2; 5 conferring enhanced drought stress tolerance in tomato. *Scientific Reports*, 6(1), 1-15.
- Li, H., Mo, Y., Cui, Q., Yang, X., Guo, Y., Wei, C., ... & Zhang, X. (2019). Transcriptomic and physiological analyses reveal drought adaptation strategies in drought-tolerant and-susceptible watermelon genotypes. *Plant Science*, 278, 32-43.
- Lichtenthaler, H. K. (1987). Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology*, 148, 350-382.
- Lima, V. N., Oliveira-Tintino, C. D., Santos, E. S., Morais, L. P., Tintino, S. R., Freitas, T. S., ... & Coutinho, H. D. (2016). Antimicrobial and enhancement of the antibiotic activity by phenolic compounds: Gallic acid, caffeic acid and pyrogallol. *Microbial Pathogenesis*, 99, 56-61.
- Lipiec, J., Doussan, C., Nosalewicz, A. & Kondracka, K. (2013). Effect of drought and heat stresses on plant growth and yield: a review. *International Agrophysics*, 27(4), 463-477.
- Liu, X., Shi, W., Zhang, S. & Lou, C. (2005). Nitric oxide involved in signal transduction of jasmonic acid-induced stomatal closure of *Vicia faba* L. *Chinese Science Bulletin*, 50(6), 520-525.
- Liu, C., Li, C., Liang, D., Ma, F., Wang, S., Wang, P. & Wang, R. (2013). Aquaporin expression in response to water-deficit stress in two *Malus* species: relationship with physiological status and drought tolerance. *Plant Growth Regulation*, 70(2), 187-197.
- Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>ΔΔCT method. *Methods*, 25(4), 402-408.
- Long, H., Zheng, Z., Zhang, Y., Xing, P., Wan, X., Zheng, Y. & Li, L. (2019). An abscisic acid (ABA) homeostasis regulated by its production, catabolism and transport in peanut leaves in response to drought stress. *Plos One*, 14(6), e0213963.
- Lovisollo, C., Perrone, I., Hartung, W. & Schubert, A. (2008). An abscisic acid-related reduced transpiration promotes gradual embolism repair when grapevines are rehydrated after drought. *New Phytologist*, 180(3), 642-651.
- Lum, M. S., Hanafi, M. M., Rafii, Y. M. & Akmar, A. S. N. (2014). Effect of drought stress on growth, proline and antioxidant enzyme activities of upland rice. *Journal of Animal and Plant Science*, 24(5), 1487-1493.
- Luo, H. H., Zhang, Y. L. & Zhang, W. F. (2016). Effects of water stress and rewatering on photosynthesis, root activity, and yield of cotton with drip irrigation under mulch. *Photosynthetica*, 54(1), 65-73.
- Ma, Y., Szostkiewicz, I., Korte, A., Moes, D., Yang, Y., Christmann, A. & Grill, E. (2009). Regulators of PP2C phosphatase activity function as abscisic acid sensors. *Science*, 324(5930), 1064-1068.

- Ma, D., Sun, D., Wang, C., Li, Y. & Guo, T. (2014a). Expression of flavonoid biosynthesis genes and accumulation of flavonoid in wheat leaves in response to drought stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, 80, 60-66.
- Ma, C., Wang, Z. Q., Zhang, L. T., Sun, M. M. & Lin, T. B. (2014b). Photosynthetic responses of wheat (*Triticum aestivum* L.) to combined effects of drought and exogenous methyl jasmonate. *Photosynthetica*, 52(3), 377-385.
- Macey, R. L. & Farmer, R. E. (1970). Inhibition of water and solute permeability in human red cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 211(1), 104-106.
- Mafakheri, K., Bihamta, M. R. & Abbasi, A. R. (2016). Assessment of antioxidant enzymes activity and peroxidation of membrane lipid in cowpea (*Vigna unguiculata* L.) genotypes under normal and drought stress condition. *Iranian Journal of Field Crop Science*, 47(2).
- Mahmood, T., Khalid, S., Abdullah, M., Ahmed, Z., Shah, M. K. N., Ghafoor, A. & Du, X. (2020). Insights into drought stress signaling in plants and the molecular genetic basis of cotton drought tolerance. *Cells*, 9(1), 105.
- Mahmoud, L. M., Vincent, C. I., Grosser, J. W. & Dutt, M. (2021). The response of salt-stressed Valencia sweet orange (*Citrus sinensis*) to salicylic acid and methyl jasmonate treatments. *Plant Physiology Reports*, 26(1), 137-151.
- Marshall, A. (2014). Drought-tolerant varieties begin global march. *Nature*, 201, 4.
- Malerba, M., & Cerana, R. (2018). Role of peroxynitrite in the responses induced by heat stress in tobacco BY-2 cultured cells. *Protoplasma*, 255(4), 1079-1087.
- Marten, H., Konrad, K. R., Dietrich, P., Roelfsema, M. R. G. & Hedrich, R. (2007). Ca<sup>2+</sup>-dependent and-independent abscisic acid activation of plasma membrane anion channels in guard cells of *Nicotiana tabacum*. *Plant Physiology*, 143(1), 28-37.
- Marty, L., Bausewein, D., Müller, C., Bangash, S. A. K., Moseler, A., Schwarzländer, M., ... & Meyer, A. J. (2019). Arabidopsis glutathione reductase 2 is indispensable in plastids, while mitochondrial glutathione is safeguarded by additional reduction and transport systems. *New Phytologist*, 224(4), 1569-1584.
- Maurel, C., Reizer, J., Schroeder, J. I. & Chrispeels, M. J. (1993). The vacuolar membrane protein gamma-TIP creates water specific channels in *Xenopus* oocytes. *The EMBO Journal*, 12(6), 2241-2247.
- Maurel, C. (2007). Plant aquaporins: novel functions and regulation properties. *FEBS Letters*, 581(12), 2227-2236.
- Maurel, C., Boursiac, Y., Luu, D. T., Santoni, V., Shahzad, Z. & Verdoucq, L. (2015). Aquaporins in plants. *Physiological Reviews*, 95(4), 1321-1358.
- McLachlan, D. H., Pridgeon, A. J. & Hetherington, A. M. (2018). How *Arabidopsis* talks to itself about its water supply. *Molecular Cell*, 70(6), 991-992.
- Mendoza, D., Cuaspud, O., Arias, J. P., Ruiz, O. & Arias, M. (2018). Effect of salicylic acid and methyl jasmonate in the production of phenolic compounds in plant cell suspension cultures of *Thevetia peruviana*. *Biotechnology Reports*, 19, e00273.



- Merlaen, B., De Keyser, E., Ding, L., Leroux, O., Chaumont, F. & Van Labeke, M. C. (2019). Physiological responses and aquaporin expression upon drought and osmotic stress in a conservative vs prodigal *Fragaria x ananassa* cultivar. *Plant Physiology and Biochemistry*, 145, 95-106.
- Merilo, E., Jalakas, P., Laanemets, K., Mohammadi, O., Hõrak, H., Kollist, H. & Brosché, M. (2015). Abscisic acid transport and homeostasis in the context of stomatal regulation. *Molecular Plant*, 8(9), 1321-1333.
- Mhamdi, A., Queval, G., Chaouch, S., Vanderauwera, S., Van Breusegem, F. & Noctor, G. (2010). Catalase function in plants: a focus on *Arabidopsis* mutants as stress-mimic models. *Journal of Experimental Botany*, 61(15), 4197-4220.
- Michelitsch, M. D. & Weissman, J. S. (2000). A census of glutamine/asparagine-rich regions: implications for their conserved function and the prediction of novel prions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(22), 11910-11915.
- Milosavljević, A., Prokić, L., Marjanović, M., Stikić, R. & Sabovljević, A. (2012). The effects of drought on the expression of *TAOI*, *NCED* and *EIL1* genes and ABA content in tomato wild-type and *flacca* mutant. *Archives of Biological Sciences*, 64(1), 297-306.
- Milošević, S. (2010). Regeneracija i genetička transformacija biljaka *Impatiens walleriana* L. i *Impatiens hawkerii* Bull. u kulturi *in vitro*. Doktorska disertacija, Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu.
- Milošević, S., Simonović, A., Cingel, A., Jevremović, S., Todorović, S., Filipović, B. & Subotić, A. (2012). Response of antioxidative enzymes to long-term *Tomato spotted wilt virus* infection and virus elimination by meristem-tip culture in two *Impatiens* species. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 79, 79-88.
- Milošević, S., Simonović, A., Cingel, A., Nikolić, D., Ninković, S. & Subotić, A. (2013). Introduction of dsRNA-specific ribonuclease *pac1* into *Impatiens walleriana* provides resistance to *Tomato spotted wilt virus*. *Scientia Horticulturae*, 164, 499-506.
- Miniussi, M., Del Terra, L., Savi, T., Pallavicini, A. & Nardini, A. (2015). Aquaporins in *Coffea arabica* L.: identification, expression, and impacts on plant water relations and hydraulics. *Plant Physiology and Biochemistry*, 95, 92-102.
- Mittler, R. (2017). ROS are good. *Trends in Plant Science*, 22(1), 11-19.
- Mohamed, H. I. & Latif, H. H. (2017). Improvement of drought tolerance of soybean plants by using methyl jasmonate. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 23(3), 545-556.
- Mohammadi, H., Ghorbanpour, M. & Brestic, M. (2018). Exogenous putrescine changes redox regulations and essential oil constituents in field-grown *Thymus vulgaris* L. under well-watered and drought stress conditions. *Industrial Crops and Products*, 122, 119-132.
- Mohi-Ud-Din, M., Talukder, D., Rohman, M., Ahmed, J. U., Jagadish, S. V., Islam, T. & Hasanuzzaman, M. (2021). Exogenous application of methyl jasmonate and salicylic acid mitigates drought-induced oxidative damages in french bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plants*, 10(10), 2066.
- Molinari, M. D. C., Fuganti-Pagliarini, R., Marin, S. R. R., Ferreira, L. C., Barbosa, D. D. A., Marcolino-Gomes, J., ... & Nepomuceno, A. L. (2020). Overexpression of *AtNCED3* gene improved

- drought tolerance in soybean in greenhouse and field conditions. *Genetics and Molecular Biology*, 43(3), e20190292.
- Møller, I. M., Jensen, P. E., & Hansson, A. (2007). Oxidative modifications to cellular components in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 58, 459-481.
- Molla, M. R., Ali, M. R., Hasanuzzaman, M., Al-Mamun, M. H., Ahmed, A., Nazim-Ud-Dowla, M. A. N. & Rohman, M. M. (2014). Exogenous proline and betaine-induced upregulation of glutathione transferase and glyoxalase I in lentil (*Lens culinaris*) under drought stress. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 42(1), 73-80.
- Molor, A., Khajidsuren, A., Myagmarjav, U. & Vanjildorj, E. (2016). Comparative analysis of drought tolerance of *Medicago* L. plants under stressed conditions. *Mongolian Journal of Agricultural Sciences*, 19(3), 32-40.
- Mubassir, M. H. M., Naser, M. A., Abdul-Wahab, M. F., Jawad, T., Alvy, R. I. & Hamdan, S. (2020). Comprehensive in silico modeling of the rice plant PRR Xa21 and its interaction with RaxX21-sY and OsSERK2. *RSC Advances*, 10(27), 15800-15814.
- Munné-Bosch, S., Falara, V., Pateraki, I., López-Carbonell, M., Cela, J. & Kanellis, A. K. (2009). Physiological and molecular responses of the isoprenoid biosynthetic pathway in a drought-resistant Mediterranean shrub, *Cistus creticus* exposed to water deficit. *Journal of Plant Physiology*, 166(2), 136-145.
- Murata, K., Mitsuoka, K., Hirai, T., Walz, T., Agre, P., Heymann, J. B., ... & Fujiyoshi, Y. (2000). Structural determinants of water permeation through aquaporin-1. *Nature*, 407(6804), 599.
- Muries, B., Mom, R., Benoit, P., Brunel-Michac, N., Cochard, H., Drevet, P., ... & Venisse, J. S. (2019). Aquaporins and water control in drought-stressed poplar leaves: A glimpse into the extraxylem vascular territories. *Environmental and Experimental Botany*, 162, 25-37.
- Murtaza, G., Rasool, F., Habib, R., Javed, T., Sardar, K., Ayub, M. M., ... & Rasool, A. (2016). A review of morphological, physiological and biochemical responses of plants under drought stress conditions. *Imperial Journal of Interdisciplinary Research*, 2(12), 1600-1606.
- Naeem, M., Naeem, M. S., Ahmad, R., Ihsan, M. Z., Ashraf, M. Y., Hussain, Y. & Fahad, S. (2017). Foliar calcium spray confers drought stress tolerance in maize via modulation of plant growth, water relations, proline content and hydrogen peroxide activity. *Archives of Agronomy and Soil Science*, 64(1), 116-131.
- Naidoo, G. & Naidoo, K. K. (2018). Drought stress effects on gas exchange and water relations of the invasive weed *Chromolaena odorata*. *Flora*, 248, 1-9.
- Naik, P. M. & Al-Khayri, J. M. (2016). Impact of abiotic elicitors on in vitro production of plant secondary metabolites: a review. *Journal of Advanced Research in Biotechnology*, 1(2), 1-7.
- Nambara, E. & Marion-Poll, A. (2005). Abscisic acid biosynthesis and catabolism. *Annual Review of Plant Biology*. 56, 165-185.
- Nemali, K. S., Bonin, C., Dohleman, F. G., Stephens, M., Reeves, W. R., Nelson, D. E. & Anstrom, D. (2015). Physiological responses related to increased grain yield under drought in the first biotechnology-derived drought-tolerant maize. *Plant, Cell & Environment*, 38(9), 1866-1880.

- Ng, L. M., Melcher, K., Teh, B. T. & Xu, H. E. (2014). Abscisic acid perception and signaling: structural mechanisms and applications. *Acta Pharmacologica Sinica*, 35(5), 567-584.
- Niu, L. & Liao, W. (2016). Hydrogen peroxide signaling in plant development and abiotic responses: crosstalk with nitric oxide and calcium. *Frontiers in Plant Science*, 7, 230.
- Noctor, G., Reichheld, J. P. & Foyer, C. H. (2018, August). ROS-related redox regulation and signaling in plants. In: *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 80, 3-12. Academic Press.
- Noman, A., Ali, S., Naheed, F., Ali, Q., Farid, M., Rizwan, M. & Irshad, M. K. (2015). Foliar application of ascorbate enhances the physiological and biochemical attributes of maize (*Zea mays* L.) cultivars under drought stress. *Archives of Agronomy and Soil Science*, 61(12), 1659-1672.
- Noreen, S., Fatima, K., Athar, H.U.R., Ahmad, S. & Hussain, K. (2017). Enhancement of physio-biochemical parameters of wheat through exogenous application of salicylic acid under drought stress. *Journal of Animal and Plant Science*, 27, 153-163.
- Noronha, H., Araújo, D., Conde, C., Martins, A. P., Soveral, G., Chaumont, F., ... & Gerós, H. (2016). The grapevine uncharacterized intrinsic protein 1 (VvXIP1) is regulated by drought stress and transports glycerol, hydrogen peroxide, heavy metals but not water. *PLoS One*, 11(8), 1-18.
- Nxele, X., Klein, A. & Ndimba, B.K. (2017). Drought and salinity stress alters ROS accumulation, water retention, and osmolyte content in sorghum plants. *South African Journal of Botany*, 108, 261-266.
- Obara, K., Sumi, K. & Fukuda, H. (2002). The use of multiple transcription starts causes the dual targeting of *Arabidopsis* putative monodehydroascorbate reductase to both mitochondria and chloroplasts. *Plant and Cell Physiology*, 43(7), 697-705.
- Okunlola, G. O., Olatunji, O. A., Akinwale, R. O., Tariq, A. & Adelusi, A. A. (2017). Physiological response of the three most cultivated pepper species (*Capsicum* spp.) in Africa to drought stress imposed at three stages of growth and development. *Scientia Horticulturae*, 224, 198-205.
- Ono, M., Isono, K., Sakata, Y. & Taji, T. (2021). CATALASE2 plays a crucial role in long-term heat tolerance of *Arabidopsis thaliana*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 534, 747-751.
- Otto, B., Uehlein, N., Sdorra, S., Fischer, M., Ayaz, M., Belastegui-Macadam, X., ... & Reinhard, A. (2010). Aquaporin tetramer composition modifies the function of tobacco aquaporins. *Journal of Biological Chemistry*, 285(41), 31253-31260.
- Ouyang, W., Struik, P.C., Yin, X. & Yang, J. (2017). Stomatal conductance, mesophyll conductance, and transpiration efficiency in relation to leaf anatomy in rice and wheat genotypes under drought. *Journal of Experimental Botany*, 68(18), 5191-5205.
- Ozyigit, I. I., Filiz, E., Vatansever, R., Kurtoglu, K. Y., Koc, I., Öztürk, M. X. & Anjum, N. A. (2016). Identification and comparative analysis of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-scavenging enzymes (ascorbate peroxidase and glutathione peroxidase) in selected plants employing bioinformatics approaches. *Frontiers in Plant Science*, 7, 301.
- Pagès, H. A., Gentleman, P., DebRoy, R. S. R package version 2.56. 0. In: *Biostrings: Efficient Manipulation of Biological Strings*; R Package, 2020; Available online: <https://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/Biostrings.html> (accessed on 3 December 2020).

- Pang, J., Turner, N. C., Khan, T., Du, Y. L., Xiong, J. L., Colmer, T. D., Devilla, R., Stefanova, K. & Siddique, K. H. (2016). Response of chickpea (*Cicer arietinum* L.) to terminal drought: leaf stomatal conductance, pod abscisic acid concentration, and seed set. *Journal of Experimental Botany*, 68(8), 1973-1985.
- Park, S. Y., Fung, P., Nishimura, N., Jensen, D. R., Fujii, H., Zhao, Y., ... & Cutler, S. R. (2009). Abscisic acid inhibits type 2C protein phosphatases via the PYR/PYL family of START proteins. *Science*, 324(5930), 1068-1071.
- Park, W., Scheffler, B. E., Bauer, P. J. & Campbell, B. T. (2010). Identification of the family of aquaporin genes and their expression in upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *BMC Plant Biology*, 10(1), 142.
- Pashkovskiy, P. P., Vankova, R., Zlobin, I. E., Dobrev, P., Ivanov, Y. V., Kartashov, A. V. & Kuznetsov, V. V. (2019). Comparative analysis of abscisic acid levels and expression of abscisic acid-related genes in Scots pine and Norway spruce seedlings under water deficit. *Plant Physiology and Biochemistry*, 140, 105-112.
- Paudel, I., Gerbi, H., Zisovich, A., Sapir, G., Ben-Dor, S., Brumfeld, V. & Klein, T. (2019). Drought tolerance mechanisms and aquaporin expression of wild vs. cultivated pear tree species in the field. *Environmental and Experimental Botany*, 167, 103832.
- Pazirandeh, M. S., Hasanloo, T., Niknam, V., Shahbazi, M., Mabood, H. E. & Ghaffari, A. (2013). Effects of drought and methyl jasmonate on antioxidant activities of selected barley genotypes. *Journal of Agrobiological Sciences*, 30, 71-82.
- Pazirandeh, M. S., Hasanloo, T., Shahbazi, M., Niknam, V. & Moradi-Payam, A. (2015). Effect of methyl jasmonate in alleviating adversities of water stress in barley genotypes. *International Journal of Farming and Allied Sciences*, 4(2), 111-118.
- Pires Jr, E. O., Caleja, C., Garcia, C. C., Ferreira, I. C. & Barros, L. (2021a). Current status of genus *Impatiens*: Bioactive compounds and natural pigments with health benefits. *Trends in Food Science & Technology*.
- Pires, E. D. O., Pereira, E., Pereira, C., Dias, M. I., Calhelha, R. C., Ćirić, A., ... & Ferreira, I. C. (2021b). Chemical Composition and Bioactive Characterisation of *Impatiens walleriana*. *Molecules*, 26(5), 1347.
- Pirzad, A., Shakiba, M. R., Zehtab-Salmasi, S., Mohammadi, S. A., Darvishzadeh, R. & Samadi, A. (2011). Effect of water stress on leaf relative water content, chlorophyll, proline and soluble carbohydrates in *Matricaria chamomilla* L. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(12), 2483-2488.
- Pilon, M., Ravet, K. & Tapken, W. (2011). The biogenesis and physiological function of chloroplast superoxide dismutases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1807(8), 989-998.
- Portu, J., López, R., Baroja, E., Santamaría, P. & Garde-Cerdán, T. (2016). Improvement of grape and wine phenolic content by foliar application to grapevine of three different elicitors: Methyl jasmonate, chitosan, and yeast extract. *Food Chemistry*, 201, 213-221.
- Pou, A., Jeanguenin, L., Milhiet, T., Batoko, H., Chaumont, F. & Hachez, C. (2016). Salinity-mediated transcriptional and post-translational regulation of the *Arabidopsis* aquaporin *PIP2*; 7. *Plant Molecular Biology*, 92(6), 731-744.

- Prabhu, B. M., Ramteke, P. W., Shukla, P. K., Mishra, P., Attri, A., Singh, B. & Pagire, G. S., (2018). Evaluation of response of exogenous nitric oxide on photosynthetic enzymes and pigments of C3 and C4 plants grown under drought stress. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 7(3), 2606-2612.
- Prabhukumar, K. M., Omalsree, M., Hareesh, V. S., Bhaskar, V., Nirmesh, T. K., Sreekumar, V. B. & Balachandran, I. (2015). Two new taxa of *Impatiens* L. (Balsaminaceae) from Western Ghats of India. *Phytotaxa*, 238(3), 255-264.
- Prabhukumar, K. M., Hareesh, V. S., Bhaskar, V., Sreekumar, V. B., Nirmesh, T. K. & Balachandran, I. (2016). *Impatiens glabrata* (Balsaminaceae)—A new species from southern Western Ghats, India. *Phytotaxa*, 266(1), 33-39.
- Preeti, A., Shaifali, S., Kumar, P. G. & Mani, P. D. (2019). Computational characterization of lipoxygenase and hydroperoxide lyase enzymes and Real Time PCR-based expression analysis of their encoding genes in peanut under heat and drought stress. *Res. J. Biotechnol.*, 14, 12.
- Quarrie, S. A., Whitford, P. N., Appleford, N. E. J., Wang, T. L., Cook, S. K., Henson, I. E. & Loveys, B. R. (1988). A monoclonal antibody to (S)-abscisic acid: its characterisation and use in a radioimmunoassay for measuring abscisic acid in crude extracts of cereal and lupin leaves. *Planta*, 173(3), 330-339.
- Rahantaniaina, M. S., Li, S., Chatel-Innocenti, G., Tuzet, A., Issakidis-Bourguet, E., Mhamdi, A. & Noctor, G. (2017). Cytosolic and chloroplastic DHARs cooperate in oxidative stress-driven activation of the salicylic acid pathway. *Plant Physiology*, 174(2), 956-971.
- Rai, V.K. (2002). Role of amino acids in plant responses to stresses. *Biologia Plantarum*, 45(4): 481-487.
- Ram, K., Munjal, R., Sunita, P. & Kumar, N. (2017). Evaluation of chlorophyll content index and normalized difference vegetation index as indicators for combine effects of drought and high temperature in bread wheat genotypes. *Global Journal of Bioscience and Biotechnology*, 6(3), 528-37.
- Ramasubbu, R., Manikandan, G., Mehalingam, P. & Pandurangan, A. G. (2015). *Impatiens courtallensis* (Balsaminaceae), a new species of *Impatiens* from Western Ghats, Tamil Nadu, India. *Phytotaxa*, 203(2), 199-204.
- Ramasubbu, R., Divya, C., Kala, N. S., Surendran, A. & Sreekala, A. K. (2017). *Impatiens megamalayana*, a new species of *Impatiens* from the Western Ghats, Tamil Nadu, India. *Phytotaxa*, 302(2), 193-197.
- Ramel, F., Birtic, S., Ginies, C., Soubigou-Taconnat, L., Triantaphylidès, C. & Havaux, M. (2012). Carotenoid oxidation products are stress signals that mediate gene responses to singlet oxygen in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(14), 5535-5540.
- Reddy, K. S., Sekhar, K. M. & Reddy, A. R. (2017). Genotypic variation in tolerance to drought stress is highly coordinated with hydraulic conductivity–photosynthesis interplay and aquaporin expression in field-grown mulberry (*Morus* spp.). *Tree Physiology*, 37(7), 926-937.
- Ren, J., Sun, L. N., Zhang, Q. Y. & Song, X. S. (2016). Drought tolerance is correlated with the activity of antioxidant enzymes in *Cerasus humilis* seedlings. *BioMed Research International*, 2016.

- Rewicz, A., Myśliwy, M., Adamowski, W., Podlasiński, M. & Bomanowska, A. (2020). Seed morphology and sculpture of invasive *Impatiens capensis* Meerb. from different habitats. *Peer J*, 8, e10156.
- Rodriguez, P. L., Lozano-Juste, J. & Albert, A. (2019). PYR/PYL/RCAR ABA receptors. *Advances in Botanical Research*, 92, 51-82.
- Rothe, G. M., Eisenthal, R. & Danson, M. J. (2002). Enzyme assays after gel electrophoresis. *Enzyme assays, a practical approach, 2nd edn. Oxford University Press, Oxford*, 198.
- Ruan, J., Zhou, Y., Zhou, M., Yan, J., Khurshid, M., Weng, W., ... & Zhang, K. (2019). Jasmonic acid signaling pathway in plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(10), 2479.
- Ruzicka, L. (1953). The isoprene rule and the biogenesis of terpenic compounds. *Experientia*, 9(10), 357-367.
- Sadaghiani, F. M., Dehaghi, M. A., Pirzad, A. & Fotokian, M. H. (2019). Variation in yield and biochemical factors of German chamomile (*Matricaria recutita* L.) under foliar application of osmolytes and drought stress conditions. *Journal of Herbmed Pharmacology*, 8(2), 90-100.
- Sade N., Shatil-Cohen A., & Moshelion M. (2015). Bundle-sheath aquaporins play a role in controlling Arabidopsis leaf hydraulic conductivity. *Plant Signaling and Behavior*, 10, e1017177.
- Sadeghipour, O. (2018). Drought tolerance of cowpea enhanced by exogenous application of methyl jasmonate. *International Journal of Modern Agriculture*, 7(4), 51-57.
- Safari, M., Mousavi-Fard, S., Nejad, A. R., Sorkheh, K. & Sofo, A. (2021). Exogenous salicylic acid positively affects morpho-physiological and molecular responses of *Impatiens walleriana* plants grown under drought stress. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 1-16.
- Saito, N., Yoshimasa, N., Mori, I. C. & Murata, Y. (2009). Nitric oxide functions in both methyl jasmonate signaling and abscisic acid signaling in *Arabidopsis* guard cells. *Plant Signaling & Behavior*, 4(2), 119-120.
- Salehi, A., Tasdighi, H. & Gholamhoseini, M. (2016). Evaluation of proline, chlorophyll, soluble sugar content and uptake of nutrients in the German chamomile (*Matricaria chamomilla* L.) under drought stress and organic fertilizer treatments. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 6(10), 886-891.
- Salehi-Lisar, S. Y. & Bakhshayeshan-Agdam, H. (2016). Drought stress in plants: causes, consequences, and tolerance. In: *Drought Stress Tolerance in Plants, Vol 1* (pp. 1-16). Springer, Cham.
- Sales, C. R., Marchiori, P. E. R., Machado, R. S., Fontenele, A. V., Machado, E. C., Silveira, J. A. G. & Ribeiro, R. V. (2015). Photosynthetic and antioxidant responses to drought during sugarcane ripening. *Photosynthetica*, 53(4), 547-554.
- Santos, A. B. D. & Mazzafera, P. (2013). Aquaporins and the control of the water status in coffee plants. *Theoretical and Experimental Plant Physiology*, 25(2), 79-93.
- Sánchez-Romera, B. E. A. T. R. I. Z., Ruiz-Lozano, J. M., Li, G., Luu, D. T., Martínez-Ballesta, M. D. C., Carvajal, M., ... & Aroca, R. (2014). Enhancement of root hydraulic conductivity by methyl

- jasmonate and the role of calcium and abscisic acid in this process. *Plant, Cell & Environment*, 37(4), 995-1008.
- Sarian, M. N., Ahmed, Q. U., Mat So'ad, S. Z., Alhassan, A. M., Murugesu, S., Perumal, V., ... & Latip, J. (2017). Antioxidant and antidiabetic effects of flavonoids: A structure-activity relationship based study. *Hindawi, BioMed Research International*, 2017.
- Sarker, U. & Oba, S. (2018). Drought stress effects on growth, ROS markers, compatible solutes, phenolics, flavonoids, and antioxidant activity in *Amaranthus tricolor*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 186(4), 999-1016.
- Schaller, A. & Stintzi, A. (2009). Enzymes in jasmonate biosynthesis—structure, function, regulation. *Phytochemistry*, 70(13-14), 1532-1538.
- Schuermans, J. A., van Dongen, J. T., Rutjens, B. P., Boonman, A., Pieterse, C. M. & Borstlap, A. C. (2003). Members of the aquaporin family in the developing pea seed coat include representatives of the PIP, TIP, and NIP subfamilies. *Plant Molecular Biology*, 53(5), 655-667.
- Sehnal, D., Vařeková, R. S., Berka, K., Pravda, L., Navrátilová, V., Banáš, P., ... & Koča, J. (2013). MOLE 2.0: advanced approach for analysis of biomacromolecular channels. *Journal of Cheminformatics*, 5(1), 1-13.
- Shah, A. & Smith, D. L. (2020). Flavonoids in agriculture: Chemistry and roles in, biotic and abiotic stress responses, and microbial associations. *Agronomy*, 10(8), 1209.
- Shao, H. B., Chu, L. Y., Jaleel, C. A. & Zhao, C. X. (2008). Water-deficit stress-induced anatomical changes in higher plants. *Comptes Rendus Biologies*, 331(3), 215-225.
- Sharma, S. S. & Dietz, K. J. (2006). The significance of amino acids and amino acid-derived molecules in plant responses and adaptation to heavy metal stress. *Journal of Experimental Botany*, 57(4), 711-726.
- Sharma, I. & Ahmad, P. (2014). Catalase: a versatile antioxidant in plants. In: *Oxidative Damage to Plants* (pp. 131-148). Academic Press.
- Sharma, A., Shahzad, B., Rehman, A., Bhardwaj, R., Landi, M. & Zheng, B. (2019). Response of phenylpropanoid pathway and the role of polyphenols in plants under abiotic stress. *Molecules*, 24(13), 2452.
- Shatil-Cohen A , Attia Z & Moshelion M. (2011). Bundle-sheath cell regulation of xylem–mesophyll water transport via aquaporins under drought stress: a target of xylem-borne ABA? *The Plant Journal*, 67, 72–80.
- Shavrukov, Y., Kurishbayev, A., Jatayev, S., Shvidchenko, V., Zotova, L., Koekemoer, F., ... & Langridge, P. (2017). Early flowering as a drought escape mechanism in plants: How can it aid wheat production?. *Frontiers in Plant Science*, 8, 1950.
- Shekoofa, A. & Sinclair, T. R. (2018). Aquaporin activity to improve crop drought tolerance. *Cells*, 7(9), 123.
- Sheoran, S., Thakur, V., Narwal, S., Turan, R., Mamrutha, H. M., Singh, V., ... & Sharma, I. (2015). Differential activity and expression profile of antioxidant enzymes and physiological changes in wheat (*Triticum aestivum* L.) under drought. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 177(6), 1282-1298.



- Shi, L., Wang, Z. & Kim, W. S. (2019). Effect of drought stress on shoot growth and physiological response in the cut rose 'charming black' at different developmental stages. *Horticulture, Environment, and Biotechnology*, 60(1), 1-8.
- Shinozaki, K. & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2007). Gene networks involved in drought stress response and tolerance. *Journal of Experimental Botany*, 58(2), 221-227.
- Shirani Bidabadi, S. & Sharifi, P. (2021). Strigolactone and methyl jasmonate-induced antioxidant defense and the composition alterations of different active compounds in *Dracocephalum kotschy* Boiss under drought stress. *Journal of Plant Growth Regulation*, 40, 878-889.
- Shivakrishna, P., Reddy, K. A. & Rao, D. M. (2018). Effect of PEG-6000 imposed drought stress on RNA content, relative water content (RWC), and chlorophyll content in peanut leaves and roots. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 25(2), 285-289.
- Siddiqui, M. H., Al-Khaishany, M. Y., Al-Qutami, M. A., Al-Wahaibi, M. H., Grover, A., Ali, H. M., Al-Wahibi, M. S. & Bukhari, N. A. (2015). Response of different genotypes of faba bean plant to drought stress. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(5), 10214-10227.
- Signorelli, S., Coitiño, E. L., Borsani, O. & Monza, J. (2014). Molecular mechanisms for the reaction between •OH radicals and proline: insights on the role as reactive oxygen species scavenger in plant stress. *The Journal of Physical Chemistry B*, 118(1), 37-47.
- Signorelli, S. (2016). The fermentation analogy: a point of view for understanding the intriguing role of proline accumulation in stressed plants. *Frontiers in Plant Science*. 7, 1339.
- Silva, V. A., Prado, F. M., Antunes, W. C., Paiva, R. M. C., Ferrão, M. A. G., Andrade, A. C., ... & Almeida, A. M. (2018). Reciprocal grafting between clones with contrasting drought tolerance suggests a key role of abscisic acid in coffee acclimation to drought stress. *Plant Growth Regulation*, 85(2), 221-229.
- Singh, M., Kumar, J., Singh, S., Singh, V. P., & Prasad, S. M. (2015). Roles of osmoprotectants in improving salinity and drought tolerance in plants: a review. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 14(3), 407-426.
- Singh, R. K., Shweta, S., Muthamilarasan, M., Rani, R. & Prasad, M. (2019). Study on aquaporins of *Setaria italica* suggests the involvement of SiPIP3;1 and SiSIP1;1 in abiotic stress response. *Functional & Integrative Genomics*, 19(4), 587-596.
- Singleton, V. L., Orthofer, R. & Lamuela-Raventós, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 299, 152-178.
- Skálová, H., Jarošík, V., Dvořáčková, Š. & Pyšek, P. (2013). Effect of intra- and interspecific competition on the performance of native and invasive species of *Impatiens* under varying levels of shade and moisture. *PLoS One*, 8(5), e62842.
- Ślesak, I., Libik, M., Karpinska, B., Karpinski, S. & Miszalski, Z. (2007). The role of hydrogen peroxide in regulation of plant metabolism and cellular signalling in response to environmental stresses. *Acta Biochemica Polonica, English edition*, 54(1), 39-50.
- Smirnoff, N. & Arnaud, D. (2019). Hydrogen peroxide metabolism and functions in plants. *New Phytologist*, 221(3), 1197-1214.

- Soares, C., Carvalho, M. E., Azevedo, R. A. & Fidalgo, F. (2019). Plants facing oxidative challenges—A little help from the antioxidant networks. *Environmental and Experimental Botany*, 161, 4-25.
- Srivastava, M., Gupta, S. K., Abhilash, P. C. & Singh, N. (2012). Structure prediction and binding sites analysis of curcumin protein of *Jatropha curcas* using computational approaches. *Journal of Molecular Modeling*, 18(7), 2971-2979.
- Srivastava, A. K., Penna, S., Nguyen, D. V. & Tran, L. S. P. (2016). Multifaceted roles of aquaporins as molecular conduits in plant responses to abiotic stresses. *Critical Reviews in Biotechnology*, 36(3), 389-398.
- Staswick, P. E. & Tiryaki, I. (2004). The oxylipin signal jasmonic acid is activated by an enzyme that conjugates it to isoleucine in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 16(8), 2117-2127.
- Staszek, P., & Gniazdowska, A. (2020). Peroxynitrite induced signaling pathways in plant response to non-proteinogenic amino acids. *Planta*, 252(1), 1-11.
- Stikić, R., Jovanović, Z. & Prokić, Lj. (2014). Mitigation of plant drought stress in a changing climate. *Botanica Serbica*, 38(1), 35-42.
- Sun, Y., Wang, H., Liu, S. & Peng, X. (2016). Exogenous application of hydrogen peroxide alleviates drought stress in cucumber seedlings. *South African Journal of Botany*, 106, 23-28.
- Sun, X., Deng, Y., Liang, L., Jia, X., Xiao, Z. & Su, J. (2017). Overexpression of a *PIP1* gene from *Salicornia bigelovii* in tobacco plants improves their drought tolerance. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 142(4), 235-245.
- Suhita, D., Raghavendra, A.S., Kwak, J.M. & Vavasseur, A. (2004). Cytoplasmic alkalization precedes reactive oxygen species production during methyl jasmonate-and abscisic acid-induced stomatal closure. *Plant Physiology*, 134(4), 1536-1545.
- Szewczyk, K. (2018). Phytochemistry of the genus *Impatiens* (Balsaminaceae): A review. *Biochemical Systematics and Ecology*, 80, 94-121.
- Štajner, D., Orlovic, S., Popovic, B. M., Kebert, M. & Galic, Z. (2011). Screening of drought oxidative stress tolerance in Serbian melliferous plant species. *African Journal of Biotechnology*, 10(9), 1609-1614.
- Šurbanovski, N., Sargent, D. J., Else, M. A., Simpson, D. W., Zhang, H. & Grant, O. M. (2013). Expression of *Fragaria vesca* PIP aquaporins in response to drought stress: PIP down-regulation correlates with the decline in substrate moisture content. *PloS One*, 8(9), e74945.
- Taiz, L. & Zeiger, E. (2006) *Plant Physiology*, 4th Ed., Sinauer Associates Inc. Publishers, Massachusetts.
- Takahashi, F., Kuromori, T., Urano, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. & Shinozaki, K. (2020). Drought stress responses and resistance in plants: From cellular responses to long-distance intercellular communication. *Frontiers in Plant Science*, 11, 1407.
- Talbi, S., Romero-Puertas, M. C., Hernández, A., Terrón, L., Ferchichi, A. & Sandalio, L. M., (2015). Drought tolerance in a Saharian plant *Oudneya africana*: role of antioxidant defences. *Environmental and Experimental Botany*, 111, 114-126.

- Terzi, R., Kadioglu, A., Kalaycioglu, E. & Saglam, A. (2014). Hydrogen peroxide pretreatment induces osmotic stress tolerance by influencing osmolyte and abscisic acid levels in maize leaves. *Journal of Plant Interactions*, 9(1), 559-565.
- Tickner, D. P., Angold, P. G., Gurnell, A. M., Mountford, J. O. & Sparks, T. (2001). Hydrology as an influence on invasion: experimental investigations into competition between the alien *Impatiens glandulifera* and the native *Urtica dioica* in the UK (pp. 159-167). Backhuys Publishers.
- Toll-Riera, M., Radó-Trilla, N., Martys, F. & Alba, M. M. (2012). Role of low-complexity sequences in the formation of novel protein coding sequences. *Molecular Biology and Evolution*, 29(3), 883-886.
- Tombesi, S., Nardini, A., Frioni, T., Soccolini, M., Zadra, C., Farinelli, D., Poni, S. & Palliotti, A. (2015). Stomatal closure is induced by hydraulic signals and maintained by ABA in drought-stressed grapevine. *Scientific Reports*, 5, 12449.
- Triantaphylidès, C. & Havaux, M. (2009). Singlet oxygen in plants: production, detoxification and signaling. *Trends in Plant Science*, 14(4), 219-228.
- Ullah, A., Sun, H., Yang, X. & Zhang, X. (2017). Drought coping strategies in cotton: increased crop per drop. *Plant Biotechnology Journal*, 15(3), 271-284.
- Vajpai, M., Mukherjee, M. & Sankararamkrishnan, R. (2018). Cooperativity in plant plasma membrane intrinsic proteins (PIPs): Mechanism of increased water transport in maize PIP1 channels in hetero-tetramers. *Scientific Reports*, 8(1), 1-17.
- Vandeleur, R. K., Mayo, G., Shelden, M. C., Gilliam, M., Kaiser, B. N. & Tyerman, S. D. (2009). The role of plasma membrane intrinsic protein aquaporins in water transport through roots: diurnal and drought stress responses reveal different strategies between isohydric and anisohydric cultivars of grapevine. *Plant Physiology*, 149(1), 445-460.
- Vaseva, I., Akiscan, Y., Simova-Stoilova, L., Kostadinova, A., Nenkova, R., Anders, I., ... & Demirevska, K. (2012). Antioxidant response to drought in red and white clover. *Acta Physiologiae Plantarum*, 34(5), 1689-1699.
- Velikova, V., Yordanov, I. & Edreva, A. (2000). Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants: protective role of exogenous polyamines. *Plant Science*, 151(1), 59-66.
- Vieira, E. A., das Graças Silva, M., Moro, C. F. & Laura, V. A. (2017). Physiological and biochemical changes attenuate the effects of drought on the *Cerrado* species *Vatairea macrocarpa* (Benth.) Ducke. *Plant Physiology and Biochemistry*, 115, 472-483.
- Waltz, E. (2014). Beating the heat. *Nature Biotechnology*, 32, 610-613.
- Wang, J., Song, L., Gong, X., Xu, J. & Li, M. (2020). Functions of jasmonic acid in plant regulation and response to abiotic stress. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(4), 1446.
- Wang, X., Du, T., Huang, J., Peng, S. & Xiong, D. (2018). Leaf hydraulic vulnerability triggers the decline in stomatal and mesophyll conductance during drought in rice. *Journal of Experimental Botany*, p.ery188.

- Wang, X., Li, Q., Xie, J., Huang, M., Cai, J., Zhou, Q., ... & Jiang, D. (2021). Abscisic acid and jasmonic acid are involved in drought priming-induced tolerance to drought in wheat. *The Crop Journal*, 9(1), 120-132.
- Wang, Y., Zhang, J., Li, J.L. & Ma, X.R. (2014). Exogenous hydrogen peroxide enhanced the thermotolerance of *Festuca arundinacea* and *Lolium perenne* by increasing the antioxidative capacity. *Acta Physiologiae Plantarum*, 36(11), 2915-2924.
- Wang, Z., Wang, F., Hong, Y., Yao, J., Ren, Z., Shi, H. & Zhu, J. K. (2018). The flowering repressor SVP confers drought resistance in *Arabidopsis* by regulating abscisic acid catabolism. *Molecular Plant*, 11(9), 1184-1197.
- Waseem, M., Ali, A., Tahir, M., Nadeem, M.A., Ayub, M., Tanveer, A., Ahmad, R. & Hussain, M. (2011). Mechanism of drought tolerance in plant and its management through different methods. *Continental Journal of Agricultural Science*, 5(1), 10-25.
- Wasternack, C. & Hause, B. (2013). Jasmonates: biosynthesis, perception, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. An update to the 2007 review in *Annals of Botany*. *Annals of Botany*, 111(6), 1021-1058.
- Waszczak, C., Akter, S., Jacques, S., Huang, J., Messens, J. & Van Breusegem, F. (2015). Oxidative post-translational modifications of cysteine residues in plant signal transduction. *Journal of Experimental Botany*, 66(10), 2923-2934.
- Wei, J. L., Lai, H. Y. & Chen, Z. S. (2012). Chelator effects on bioconcentration and translocation of cadmium by hyperaccumulators, *Tagetes patula* and *Impatiens walleriana*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 84, 173-178.
- Wu, H., Wu, X., Li, Z., Duan, L. & Zhang, M. (2012). Physiological evaluation of drought stress tolerance and recovery in cauliflower (*Brassica oleracea* L.) seedlings treated with methyl jasmonate and coronatine. *Journal of Plant Growth Regulation*, 31(1), 113-123.
- Wu, M., Zhang, W. H., Ma, C. & Zhou, J. Y. (2013). Changes in morphological, physiological, and biochemical responses to different levels of drought stress in Chinese cork oak (*Quercus variabilis* Bl.) seedlings. *Russian Journal of Plant Physiology*, 60(5), 681-692.
- Xia, C. Y., Sudhindra, R. G., Zhao, X. L., Do, T. V., Zhu, X. Y., Qin, Y., ... & Yu, S. X. (2019). *Impatiens maculifera* sp. nov. (Balsaminaceae) Yunnan, China. *Nordic Journal of Botany*, 37(8).
- Xiao, X., Xu, X. & Yang, F. (2008). Adaptive responses to progressive drought stress in two *Populus cathayana* populations. *Silva Fennica*, 42(5), 705-719.
- Xing, Y., Jia, W. & Zhang, J. (2007). *AtMEK1* mediates stress-induced gene expression of *CAT1* catalase by triggering H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany*, 58(11), 2969-2981.
- Xiong, B., Wang, Y., Zhang, Y., Ma, M., Gao, Y., Zhou, Z., ... & Wang, Z. (2020). Alleviation of drought stress and the physiological mechanisms in *Citrus* cultivar (Huangguogan) treated with methyl jasmonate. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 84(9), 1958-1965.
- Xu, Y., Hu, W., Liu, J., Zhang, J., Jia, C., Miao, H., ... & Jin, Z. (2014). A banana aquaporin gene, *MaPIP1;1*, is involved in tolerance to drought and salt stresses. *BMC Plant Biology*, 14(1), 59.

- Xu, W., Cui, K., Xu, A., Nie, L., Huang, J. & Peng, S. (2015). Drought stress condition increases root to shoot ratio via alteration of carbohydrate partitioning and enzymatic activity in rice seedlings. *Acta Physiologiae Plantarum*, 37(2), 9.
- Xu, Y., Hu, W., Liu, J., Song, S., Hou, X., Jia, C., ... & Jin, Z. (2020). An aquaporin gene *MaPIP2-7* is involved in tolerance to drought, cold and salt stresses in transgenic banana (*Musa acuminata* L.). *Plant Physiology and Biochemistry*, 147, 66-76.
- Yalcinkaya, T., Uzilday, B., Ozgur, R., Turkan, I. & Mano, J. I. (2019). Lipid peroxidation-derived reactive carbonyl species (RCS): Their interaction with ROS and cellular redox during environmental stresses. *Environmental and Experimental Botany*, 165, 139-149.
- Yaneff, A., Vitali, V. & Amodeo, G. (2015). PIP1 aquaporins: Intrinsic water channels or PIP2 aquaporin modulators? *FEBS letters*, 589(23), 3508-3515.
- Yang, A. J., Anjum, S. A., Wang, L., Song, J. X., Zong, X. F., Lv, J., ... & Wang, S. G. (2018). Effect of foliar application of brassinolide on photosynthesis and chlorophyll fluorescence traits of *Leymus chinensis* under varying levels of shade. *Photosynthetica*, 56(3), 873-883.
- Yang, B., Zhou, S. S., Maung, K. W. & Tan, Y. H. (2017). Two new species of *Impatiens* (Balsaminaceae) from Putao, Kachin state, northern Myanmar. *Phytotaxa*, 321(1), 103-113.
- Yang, S. H. U. S. H. E. N. & Deng, X. I. P. I. N. G. (2015). Effects of drought stress on antioxidant enzymes in seedlings of different wheat genotypes. *Pak. J. Bot.*, 47(1), 49-56.
- Yang, X., Lu, M., Wang, Y., Wang, Y., Liu, Z. & Chen, S. (2021). Response mechanism of plants to drought stress. *Horticulturae*, 7(3), 50.
- Yong, B., Xie, H., Li, Z., Li, Y.P., Zhang, Y., Nie, G., Zhang, X.Q., Ma, X., Huang, L.K., Yan, Y.H. & Peng, Y. (2017). Exogenous application of GABA improves PEG-induced drought tolerance positively associated with GABA-shunt, polyamines, and proline metabolism in white clover. *Frontiers in Physiology*, 8, 1107.
- Yooyongwech, S., Cha-um, S. & Supaibulwatana, K. (2013). Water relation and aquaporin genes (*PIP1;2* and *PIP2;1*) expression at the reproductive stage of rice (*Oryza sativa* L. spp. *indica*) mutant subjected to water deficit stress. *Plant Omics*, 6(1), 79-85.
- Yoshida, C. H. P., Pacheco, A. C., Lapaz, A. D. M., Gorni, P. H., Vítolo, H. F. & Bertoli, S. C. (2020). Methyl jasmonate modulation reduces photosynthesis and induces synthesis of phenolic compounds in sweet potatoes subjected to drought. *Bragantia*, 79(3), 319-334.
- You, J., Zhang, Y., Liu, A., Li, D., Wang, X., Dossa, K., ... & Zhang, X. (2019). Transcriptomic and metabolomic profiling of drought-tolerant and susceptible sesame genotypes in response to drought stress. *BMC Plant Biology*, 19(1), 1-16.
- Yue, C., Cao, H., Wang, L., Zhou, Y., Hao, X., Zeng, J., ... & Yang, Y. (2014). Molecular cloning and expression analysis of tea plant aquaporin (AQP) gene family. *Plant Physiology and Biochemistry*, 83, 65-76.
- Zaefyzadeh, M., Quliyev, R. A., Babayeva, S. M. & Abbasov, M. A. (2009). The effect of the interaction between genotypes and drought stress on the superoxide dismutase and chlorophyll content in durum wheat landraces. *Turkish Journal of Biology*, 33(1), 1-7.

- Zargar, S. M., Nagar, P., Deshmukh, R., Nazir, M., Wani, A. A., Masoodi, K. Z., ... & Rakwal, R. (2017a). Aquaporins as potential drought tolerance inducing proteins: Towards instigating stress tolerance. *Journal of Proteomics*, *169*, 233-238.
- Zargar, S. M., Gupta, N., Nazir, M., Mahajan, R., Malik, F. A., Sofi, N. R., ... & Salgotra, R. K. (2017b). Impact of drought on photosynthesis: Molecular perspective. *Plant Gene*, *11*, 154-159.
- Zarghami Moghaddam, M., Shoor, M., Ganjeali, A., Moshtaghi, N. & Tehranifar, A. (2014). Effect of salicylic acid on morphological and Ornamental characteristics of *Petunia hybrida* at drought stress. *Indian Journal of Fundamental and Applied Life Sciences*, *4* (3), 523-532.
- Zdunek-Zastocka, E. & Sobczak, M. (2013). Expression of *Pisum sativum* *PsAO3* gene, which encodes an aldehyde oxidase utilizing abscisic aldehyde, is induced under progressively but not rapidly imposed drought stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, *71*, 57-66.
- Zeng, X., Bai, L., Wei, Z., Yuan, H., Wang, Y., Xu, Q., ... & Nyima, T. (2016). Transcriptome analysis revealed the drought-responsive genes in Tibetan hulless barley. *BMC Genomics*, *17*(1), 1-12.
- Zhang, H., Zhu, H., Pan, Y., Yu, Y., Luan, S. & Li, L. (2014a). A DTX/MATE-type transporter facilitates abscisic acid efflux and modulates ABA sensitivity and drought tolerance in *Arabidopsis*. *Molecular Plant*, *7*(10), 1522-1532.
- Zhang, F., Li, F. & Tan, Y. (2014b). Effects of PEG Imposed Drought Stress on the Seed Germination and Seedling Growth of *Impatiens balsamina*. *J. South China Normal Univ. (Nat. Sci. Ed.)*, *2*, 021.
- Zhang, M., Jin, Z.Q., Zhao, J., Zhang, G. & Wu, F. (2015). Physiological and biochemical responses to drought stress in cultivated and Tibetan wild barley. *Plant Growth Regulation*, *75*(2), 567-574.
- Zhang, S., Li, C., Ren, H., Zhao, T., Li, Q., Wang, S., ... & Wang, X. (2020). BAK1 mediates light intensity to phosphorylate and activate catalases to regulate plant growth and development. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(4), 1437.
- Zhang, R. R., Wang, Y. H., Li, T., Tan, G. F., Tao, J. P., Su, X. J., ... & Xiong, A. S. (2021). Effects of simulated drought stress on carotenoid contents and expression of related genes in carrot taproots. *Protoplasma*, *258*(2), 379-390.
- Zhou, S., Hu, W., Deng, X., Ma, Z., Chen, L., Huang, C., ... & He, G. (2012). Overexpression of the wheat aquaporin gene, *TaAQP7*, enhances drought tolerance in transgenic tobacco. *PloS One*, *7*(12), e52439.
- Zou, J. J., Li, X. D., Ratnasekera, D., Wang, C., Liu, W. X., Song, L. F., ... & Wu, W. H. (2015). *Arabidopsis* CALCIUM-DEPENDENT PROTEIN KINASE8 and CATALASE3 function in abscisic acid-mediated signaling and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> homeostasis in stomatal guard cells under drought stress. *The Plant Cell*, *27*(5), 1445-1460.
- Zupin, M., Sedlar, A., Kidrič, M. & Meglič, V. (2017). Drought-induced expression of aquaporin genes in leaves of two common bean cultivars differing in tolerance to drought stress. *Journal of Plant Research*, *130*(4), 735-745.

## BIOGRAFIJA AUTORA

Marija J. Đurić rođena je 17.12.1993. godine u Milićima (Bosna i Hercegovina), gde je završila osnovnu školu i gimnaziju „Milutin Milanković“. Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu upisala je školske 2012/2013. godine na studijskoj grupi Biologija. Fakultet je završila 2016. godine sa prosečnom ocenom 9,15 i iste godine upisala Master akademske studije, na modulu Fiziologija i biotehnologija biljaka, na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu. Master rad pod nazivom „Efekat apscisinske kiseline na aktivnost antioksidativnih enzima *Impatiens walleriana* u uslovima vodnog deficita izazvanog polietilen glikolom *in vitro*“ odbranila je 1.9.2017. godine i time završila Master studije sa prosečnom ocenom 10,00. Iste godine upisala je Doktorske akademske studije na modulu Fiziologija i molekularna biologija biljaka, Biološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu. Sve ispite na Doktorskim studijama položila je u predviđenom roku sa prosečnom ocenom 9,90.

Na predlog predmetnih nastavnika Katedre za Fiziologiju biljaka, Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu, u zimskom semestru 2017/2018. godine, Marija Đurić je bila uključena u izvođenje praktične nastave predmeta Fiziologija biljaka, za studente treće godine Osnovnih akademskih studija.

Od juna 2018. Marija Đurić je zaposlena kao istraživač pripravnik u Odeljenju za Fiziologiju biljaka Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković” – Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerziteta u Beogradu. U zvanje istraživač saradnik izabrana je u februaru 2021. godine. Tokom avgusta 2017. godine obavila je petnaestodnevnu stručnu praksu u Laboratoriji za ispitivanje kvaliteta i zdravstvene ispravnosti proizvoda, Sektor „Topčider”, Jugoinspekt A.D.

U toku svog naučno-istraživačkog rada Marija Đurić je učestvovala u realizaciji nacionalnog projekta TR31019: „Razvoj i primena biotehnoških postupaka u dobijanju zdravog sadnog materijala ukrasnih biljaka” finansiranog od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije, pod rukovodstvom dr Angeline Subotić. Koautor je 3 publikacije M21 kategorije, od kojih su dve direktno proistekle iz ove doktorske disertacije. Dobitnik je stipendije za *FESPB/EPSO Plant Biology Europe 2020 Congress* (PBE2020), u Torinu (Italija). Kongres je odložen usled pandemije COVID-19 i održan online od 28.6.-1.7.2021. godine, sa pravom zadržavanja stipendija.

Marija Đurić je član Društva za fiziologiju biljaka Srbije (DFBS) i Srpskog biološkog društva (SBD).