

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Dragana D. Antić Reljin

**UTICAJ SALICILNE KISELINE NA BIOHEMIJSKE  
MEHANIZME TOLERANCIJE *Impatiens walleriana*  
(Balsaminaceae) PREMA VODNOM STRESU**

Doktorska disertacija

Beograd, 2022

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Dragana D. Antonić Reljin

**EFFECTS OF SALICYLIC ACID ON BIOCHEMICAL  
MECHANISMS OF *Impatiens walleriana*  
(Balsaminaceae) TOLERANCE TO WATER STRESS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2022

## **Mentori:**

---

dr Ivana Momčilović, naučni savetnik  
Univerzitet u Beogradu  
Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković”  
Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju

---

dr Angelina Subotić, naučni savetnik  
Univerzitet u Beogradu  
Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković”  
Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju

## **Članovi Komisije:**

---

dr Dušica Janošević, vanredni profesor  
Univerzitet u Beogradu - Biološki fakultet

---

dr Snežana Milošević, naučni savetnik  
Univerzitet u Beogradu  
Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković”  
Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju

---

dr Danijel Pantelić, naučni saradnik  
Univerzitet u Beogradu  
Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković”  
Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju

Datum odbrane: \_\_\_\_\_

## Zahvalnica

*Eksperimentalni deo doktorske teze pod nazivom: "Uticaj salicilne kiseline na biohemijske mehanizme tolerancije *Impatiens walleriana* (Balsaminaceae) prema vodnom stresu" urađen je u laboratorijama Odeljenja za fiziologiju biljaka Instituta za biološka istraživanja "Siniša Stanković", Instituta od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerziteta u Beogradu.*

*Zahvaljujem se mentorki dr Angelini Subotić na doprinosu u osmišljavanju, realizaciji i interpretaciji rezultata ove disertacije. Takođe, zahvaljum joj se na prilici da budem deo njenog tima poslednjih jedanaest godina.*

*Zahvaljujem se mentorki dr Ivani Momčilović na vođenju eksperimentalnog dela ove doktorske teze, na uloženom trudu i sugestijama pri čitanju i uobličavanju teksta ove disertacije.*

*Zahvaljujem se profesorki dr Dušici Janošević na pomoći tokom doktorskih studija i na pregledu teksta ove disertacije.*

*Veliku zahvalnost dugujem dr Snežani Milošević na zajedničkom radu tokom izrade ove doktorske disertacije i na korisnim savetima koje je uvek umela da pruži. Zahvaljujem joj se na pomoći u savladavanju tehnika izolacije proteina, Native-PAGE elektroforeze, kao i na pregledu teksta ove disertacije.*

*Zahvaljujem se dr Danijelu Panteliću na pomoći u eksperimentalnom radu i savladavanju tehnika za razdvajanje proteina poliakrilamid gel elektroforezom, kao i njihovu detekciju i kvantifikaciju Western blot analizom. Zahvaljujem mu se i na pregledu teksta ove disertacije.*

*Veliku zahvalnost dugujem dr Milanu Dragičeviću na analizi transkriptoma *Impatiens walleriana*, pronalazenju dehidrinskih sekvenci i pomoći u savladavanju tehnika analize ekspresije gena. Takođe, mu se zahvaljujem na pomoći oko statističke analize rezultata većine ex vitro eksperimenata.*

*Veliku zahvalnost dugujem dr Ani Simonović na pomoći oko interpretacije rezultata ove doktorske teze, kao i ogromnom doprinosu u pisanju radova koji su proistekli iz ove disertacije.*

*Danijeli Paunović se zavaljujem na pomoći oko izolacije RNK.*

*Zahvaljujem se dr Slađani Jevremović sa kojom sam započela rad na izradi disertacije, na njenim korisnim savetima i kritikama, i na savladavanju tehnika rada u kulturi biljaka.*

*Zahvaljujem se svojim kolegincama i prijateljicama Danijeli Paunović, dr Mariji Marković, i dr Mileni Trajković koje su bile uz mene tokom rada, uvek spremne da pomognu u laboratoriji, ali i razgovorom kada stvari ne idu očekivanim tokom.*

*Zahvaljujem se mojim kumama dr Jeleni Milojević i dr Suzani Pavlović koje su uvek tu za mene kada mi je najpotrebnije u svim životnim okolnostima.*

*Vesni Šinžar se zahvaljujem na zajedničkom radu i druženju na početku rada na Institutu za biološka istraživanja "Siniša Stanković".*

*Zahvaljujem se dr Nini Devrnji, dr Maji Belić, dr Tatjani Ćosić, dr Mariani Stanišić, dr Aleksandru Cingelu, dr Martinu Rasporu, i dr Milani Trifunović-Momčilov na druženju i podršci tokom višegodišnjeg rada.*

*Zahvalnost dugujem i svim svojim kolegama Odeljenja za Fiziologiju biljaka na kolegijalnosti i prijatnoj radnoj atmosferi.*

*Suprugu Draganu i našim ćerkama Niki i Tari se zahvaljujem na ljubavi koju mi pružaju i na snazi koju mi daju. Zbog njih znam da nema odustajanja i kada ciljevi deluju nedostižno.*

*Zahvaljujem se mom bratu Aleksandru na strpljenju, ljubavi i podršci u teškim trenucima tokom rada na doktorskoj disertaciji.*

*Mojim roditeljima Staniki i Dragomiru dugujem najveću zahvalnost. Tati se zahvaljujem zato što je poslednjih deset godina bio uz mene u svim segmentima života. Hvala mu što mi je pružao ljubav i podršku i kada sam grešila, što je verovao u mene i kada ja nisam. Mami se zahvaljujem jer mi je tokom svog života pružila beskrajnu ljubav, oblikovala me kao osobu, i bila moj najodaniji i najiskreniji prijatelj, iako fizički nije tu, svaki dan je u mom srcu i mislima. Njima posvećujem ovu tezu.*

## Uticaj salicilne kiseline na biohemijske mehanizme tolerancije *Impatiens walleriana* (Balsaminaceae) prema vodnom stresu

### SAŽETAK

U prvom delu doktorske disertacije ispitivan je odgovor biljaka *Impatiens walleriana* na vodni stres indukovani polietilen glikolom (PEG) i uticaj salicilne kiseline (SA) u *in vitro* uslovima. Kulture izdanaka *I. walleriana* su gajene na hranljivoj podlozi koja je sadržala različite kombinacije i koncentracije PEG (1-3%) i SA (1-3 mM). Nakon dugotrajnog delovanja vodnog stresa na biljke *I. walleriana* utvrđen je uticaj PEG i SA na parametre hidratacije, indikatore oksidativnog stresa, kao i na parametre rastenja izdanaka. PEG indukovani vodni stres je uzrokovao redukciju rastenja, smanjenje mase svežih izdanaka, broja listova i izdanaka, relativnog sadržaja vode (RWC) i sadržaja hlorofila, kao i akumulaciju prolina, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, i malondialdehida (MDA). Aktivnosti antioksidativnih enzima, katalaza (CAT), superoksid dismutaza (SOD) i peroksidaza (POX), su povećane kao odgovor na PEG tretman i to zavisno od primenjene koncentracije PEG. U drugom delu doktorske disertacije ispitivan je uticaj folijarne primene 2 mM SA na *I. walleriana* gajene *ex vitro* u uslovima suše. Biljke su podeljene u 4 grupe: zalivane biljke, zalivane biljke tretirane sa SA, nezalivane biljke i nezalivane biljke tretirane sa SA. Utvrđen je broj cvetnih pupoljaka i cvetova, RWC, sadržaj MDA, prolina, kao i aktivnosti SOD, CAT i POX u različitim vremenskim tačkama tokom trajanja eksperimenta. Suša je dovela do venjenja, odbacivanja cvetova, smanjenja RWC i porasta MDA. Kao odgovor na sušu kod *I. walleriana* je pojačana aktivnost hloroplastne Cu/ZnSOD i dve izoforme gvajakol peroksidaze. Identifikovane su tri *de novo* sekvence dehidrina korišćenjem transkriptoma iz listova *I. walleriana*: *IwDhn1*, *IwDhn2.1* i *IwDhn2.2*. Suša je indukovala ekspresiju *IwDhn2.1* i *IwDhn2.2*. Primena SA je pozitivno uticala na biljke koje su bile izložene suši, sprečavajući venjenje, održavajući RWC i aktivnost antioksidativnih enzima, ali nije imala uticaj na sprečavanje odbacivanja cvetova.

**Ključne reči:** vodni stres, suša, PEG, reaktivne vrste kiseonika, salicilna kiselina, antioksidativni enzimi, cvetanje, malondialdehid, prolin, dehidrini.

**Naučna oblast:** Biologija

**Uža naučna oblast:** Fiziologija i molekularna biologija biljaka

## Effect of salicylic acid on biochemical tolerance mechanisms of *Impatiens walleriana* (Balsaminaceae) to water stress

### ABSTRACT

In the first part of dissertation the responses of *Impatiens walleriana* to polyethylene glycol (PEG) induced water stress and the potential of exogenous salicylic acid (SA) as stress-ameliorating agent was described. *Impatiens* shoot culture was established on medium containing different concentrations and combinations of PEG (1–3% ) and SA (1–3 mM). After prolonged drought, water relation parameters, oxidative stress indicators, and growth responses of the shoots to PEG and/or SA were recorded. PEG reduced growth, fresh weight of shoots, the number of developed leaves and shoots, relative water content (RWC), and chlorophyll content. PEG caused accumulation of proline, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, and malondialdehyde (MDA). The activities of catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), and peroxidase (POX) were increased in response to PEG in a dose-dependent manner. In the second part of dissertation it was investigated whether the foliar application of 2 mM SA could protect *ex vitro* grown *I. walleriana* plants from drought stress. The plants were divided into 4 groups: watered plants, drought-stressed plants, watered plants treated with SA and drought-stressed plants treated with SA. The number of flower buds and flowers, RWC, contents of MDA, proline and the activities of superoxide dismutases, catalases and peroxidases were recorded at different time points. Three dehydrin sequences were identified in *de novo* assembled leaf transcriptome: *IwDhn1*, *IwDhn2.1* and *IwDhn2.2*. Drought stress caused wilting, floral abortion, reduction of RWC and increased MDA. In response to drought, *I. walleriana* induced chloroplastic Cu/ZnSOD and two guaiacol peroxidase isoforms. The remarkable drought response was induction of *IwDhn2.1* and *IwDhn2.2*. SA had ameliorating effects on plants exposed to drought, including prevention of wilting, preservation of RWC, modulation of antioxidative activities, but had no effects on flowers preservation.

**Keywords:** Water stress, Drought, Polyethylene glycol, Reactive oxygen species, Salicylic acid, Antioxidative enzymes, Flowering, Malondialdehyde, Proline, Dehydrins.

**Scientific field:** Biology

**Scientific subfield:** Plant physiology and molecular biology

## **Lista skraćenica:**

ABA – apscisinska kiselina (eng. *Abscisic acid*)

ANOVA – analiza varijanse

APX – askorbat peroksidaza

AsA – askorbinska kiselina (vitamin C)

CAT – katalaze

DAG – diacilglicerol

DNK – dezoksiribonukleinska kiselina

FAD – flavin adenin dinukleotid

GPOX – gvajakol peroksidaze

GSH – glutation

HSPs – proteini toplotnog stresa (eng. *Heat Shock Proteins*)

IDPs – proteini intrinzično neuređenestrukture (eng. *Intrinsically Disordered Proteins*)

IHS – izohorizmat sintaza

IP<sub>3</sub> – inozitol trifosfat (eng. *Inositol Trisphosphate*)

IPL – izohorizmat piruvat lijaza

kD – kilodalton

LEA – proteini zastupljeni u kasnoj fazi embriogeneze (eng. *Late Embryogenesis Abundant*)

LP – lipidna peroksidacija

LWL – gubitak vode u listovima (eng. *Leaf Water Loss*)

MAPK – mitogenom aktivirane protein kinaze (eng. *Mitogen Activated Protein Kinase*)

MDA – malondialdehid

NAD<sup>+</sup> – nikotinamid dinukleotid

NADP – nikotinamid dinukleotid fosfat

P5CR – pirolin-5-karboksilat reduktaza

P5CS –  $\Delta$ -1-pirolin-5-karboksilat sintetaza

PA – fosfatidinska kiselina (eng. *Phosphatidic Acid*)

PAO – poliamin oksidaza



PAL – fenilalanin amonijum liaza

PC – fosfatidil-holin

PDH – prolin-dehidrogenaza

PLC – fosfolipaza C

PLD – fosfolipaza D

PEG – polietilen glikol (eng. *Polyethylene Glycol*)

PIP<sub>2</sub> – fosfatidilinozitol 4,5-bifosfat

PSI – fotosistem I

PSII – fotosistem II

RNK – ribonukleinska kiselina

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

RuBisCo – ribuloza 1,5-bisfosfat karboksilaza/oksigenaza

Ru-1,5-BP – ribuloza-1,5-bisfosfat

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

SA – salicilna kiselina (eng. *Salicylic Acid*)

SABP – SA-vezujući protein (eng. *Salicylic Acid Binding Protein*)

SDS-PAGE – natrijum dodecil sulfat-poliakrilamid gel elektroforeza (eng. *Sodium Dodecyl Sulfate - Polyacrylamide Gel Electrophoresis*)

SOD – superoksid dismutaza

TF – transkripcioni faktor

# SADRŽAJ

1.	Uvod .....	1
1.1.	Vodni stres.....	1
1.1.1.	Odgovor biljaka na vodni stres .....	2
1.1.2.	Prijem i prenos signala pri vodnom stresu.....	4
1.1.3.	Mehanizmi otpornosti biljaka prema vodnom stresu.....	9
1.1.4.	Tolerancija biljaka prema vodnom stresu osmotskim prilagođavanjem.....	10
1.1.4.1.	Uloga prolina u odgovoru biljaka prema vodnom stresu.....	11
1.2.	Oksidativni stres kao posledica vodnog stresa .....	13
1.2.1.	Reaktivne vrste kiseonika (ROS) - tipovi, izvori i osobine .....	14
1.2.2.	Antioksidativni sistem .....	17
1.2.3.	Posledice oksidativnih oštećenja .....	20
1.3.	Salicilna kiselina.....	22
1.3.1.	Biosinteza i metabolizam SA .....	22
1.3.2.	Modifikacije SA .....	24
1.3.3.	Uticaj SA na fiziološke procese biljaka.....	26
1.3.4.	Uloga SA u odgovoru na biotičke faktore stresa.....	27
1.3.5.	SA i tolerancija na abiotički stres .....	27
1.3.5.1.	Efekti egzogene primene SA na biljke .....	29
1.4.	Dehidrini.....	31
1.4.1.	Struktura dehidrina .....	32
1.4.1.1.	Intrinzično neuređena struktura dehidrina .....	33
1.5.	Proteini toplotnog stresa (HSP) i njihova uloga prilikom delovanja abiotičkih faktora stresa.....	34
1.5.1.	Familija HSP100.....	35
1.6.	Karakteristike vrste <i>Impatiens walleriana</i> .....	35
1.6.1.	Gajenje i istraživanja na vrsti <i>I. walleriana</i> u Srbiji.....	36
2.	Ciljevi rada .....	37
3.	Materijal i metode.....	38
3.1.	Biljni materijal.....	38
3.2.	Hranljiva podloga za <i>in vitro</i> gajenje.....	38
3.3.	Uspostavljanje <i>in vitro</i> kulture <i>I. walleriana</i> i uslovi gajenja.....	39
3.4.	Eksperiment uticaja SA i vodnog stresa na <i>in vitro</i> gajene biljke <i>I. walleriana</i> .....	40
3.5.	Uspostavljanje <i>ex vitro</i> kulture i uslovi gajenja.....	40
3.6.	Eksperiment uticaja SA i vodnog stresa na <i>ex vitro</i> gajene biljke <i>I. walleriana</i> .....	41
3.7.	Određivanje RWC i LWL.....	41

3.8.	Određivanje sadržaja hlorofila (Hlorofil a+b), karotenoida i ukupnih fotosintetičkih pigmenata u listovima.....	42
3.9.	Određivanje koncentracije H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , malondialdehida (MDA) i prolina u listovima.....	43
3.10.	Izolacija i kvantifikacija proteina .....	44
3.11.	Spektrofotometrijska analiza aktivnosti SOD, CAT i GPOX.....	44
3.12.	SDS-PAGE i imunoblot analiza proteina .....	46
3.13.	Nativna gel-elektroforeza i analiza aktivnosti enzima.....	46
3.13.1.	Određivanje aktivnosti superoksid-dismutaza.....	47
3.13.2.	Određivanje aktivnosti katalaza.....	47
3.13.3.	Određivanje aktivnosti peroksidaza.....	47
3.14.	Izolacija RNK.....	47
3.15.	Reverzna transkripcija RNK.....	48
3.16.	RNK sekvenciranje, <i>de novo</i> sklapanje transkriptoma i funkcionalna anotacija.....	49
3.17.	Dizajniranje prajmera za praćenje ekspresije <i>de novo</i> sekvenci dehidrina.....	50
3.18.	PCR amplifikacija.....	51
3.19.	Pripremanje standarda za apsolutnu kvantifikaciju prečišćavanjem PCR produkata iz gela .....	51
3.20.	Određivanje nivoa ekspresije gena metodom kvantitativnog RT-PCR (qRT-PCR) .....	52
3.21.	Statistička obrada podataka .....	53
4.	Rezultati.....	54
4.1.	Uticaj egzogene primene SA na biljke <i>I. walleriana</i> gajene <i>in vitro</i> u uslovima PEG indukovanoog vodnog stresa.....	54
4.1.1.	Uticaj SA na morfologiju izdanaka biljaka <i>I. walleriana</i> gajenih <i>in vitro</i> u uslovima vodnog stresa.....	54
4.1.2.	Efekat SA na nivo hidratacije izdanaka i sadržaj fotosintetskih pigmenata u listovima biljaka <i>I. walleriana</i> gajenih <i>in vitro</i> u uslovima PEG indukovanoog vodnog stresa .....	58
4.1.3.	Efekat SA na produkciju H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> i LP u listovima biljaka <i>I. walleriana</i> gajenih <i>in vitro</i> u uslovima PEG indukovanoog vodnog stresa .....	63
4.1.4.	Uticaj SA na koncentraciju prolina u listovima biljaka <i>I. walleriana</i> gajenih <i>in vitro</i> u uslovima PEG indukovanoog vodnog stresa .....	65
4.1.5.	Efekat PEG i SA na aktivnost antioksidativnih enzima u listovima biljaka <i>I. walleriana</i> gajenih <i>in vitro</i> .....	66
4.2.	Efekat vodnog stresa i SA na biljke <i>I. walleriana</i> gajene <i>ex vitro</i> .....	70
4.2.1.	Efekat vodnog stresa i SA na cvetanje biljaka <i>I. walleriana</i> gajenih <i>ex vitro</i> .....	70
4.2.2.	Uticaj SA na RWC u listovima biljaka <i>I. walleriana</i> gajenih <i>ex vitro</i> u uslovima vodnog stresa.....	72
4.2.3.	Uticaj suše i SA na promenu sadržaja prolina u listovima biljaka <i>I. walleriana</i> gajenih <i>ex vitro</i> .....	74
4.2.4.	Uticaj vodnog stresa i SA na promenu sadržaja MDA u listovima biljaka <i>I. walleriana</i> gajenih <i>ex vitro</i> .....	75

4.2.5. Uticaj vodnog stresa i SA na aktivnost antioksidativnih enzima (SOD, CAT i POX) kod biljaka <i>I. walleriana</i> gajenih <i>ex vitro</i> .....	76
4.2.6. Uticaj vodnog stresa i SA na ekspresiju HSP101 kod biljaka <i>I. walleriana</i> gajenih <i>ex vitro</i> .....	80
4.2.7. Struktura dehidrina kod biljaka <i>I. walleriana</i> gajenih <i>ex vitro</i> i njihova ekspresija u uslovima vodnog stresa pri primeni SA.....	81
5. Diskusija.....	87
5.1. Morfo-anatomski i biohemijski odgovori biljaka <i>I. walleriana</i> gajenih <i>in vitro</i> u uslovima PEG indukovanoog vodnog stresa.....	87
5.2. Uticaj SA na rastenje, razviche i biohemijske odgovore biljaka <i>I. walleriana</i> gajenih <i>in vitro</i> u uslovima PEG indukovanoog vodnog stresa.....	89
5.3. Mehanizmi delovanja SA u indukciji tolerancije biljaka <i>I. walleriana</i> gajenih <i>ex vitro</i> prema vodnom stresu.....	92
5.4. Uticaj vodnog stresa i SA na ekspresiju <i>de novo</i> identifikovanih dehidrinskih sekvenci kod <i>I. walleriana</i> gajenih <i>ex vitro</i> .....	96
6. Zakljucci.....	99
7. Literatura .....	100
Biografija autora.....	119

# 1. Uvod

Biljke su sesilni organizmi i kao takvi izloženi su svakoj promeni u spoljašnjoj sredini čije eventualne negativne efekte mogu da tolerišu različitim mehanizmima koje su razvile tokom evolucije. Ne predstavljaju sva variranja spoljašnjih faktora stres za biljku, zato što su biljke sposobne da pri interakciji sa faktorima sredine menjaju i prilagođavaju metabolizam, kao i procese rastanja i razvića. Međutim, velike promene u spoljašnjoj sredini dovode do stresa koji za posledicu može imati različita oštećenja biljaka.

Različiti autori daju različite definicije stresa ali najveći broj autora smatra da stres predstavlja bilo koje variranje abiotičkih i biotičkih faktora van optimalnog opsega vrednosti za datu biljnu vrstu, koje može da dovede do oštećenja i oboljenja kod biljaka, kao i do brojnih nepovoljnih fizioloških promena (Cassells i Curry, 2001). Suština stresa ogleda se u promenama osnovnog fiziološkog stanja organizma, koje ugrožava odvijanje životnih procesa u biljci (Gaspar i sar., 2002).

Voda je najobilniji, najrasprostranjeniji i najznačajni faktor spoljašnje sredine. Rastenje, razviće i rasprostranjenost biljaka na našoj planeti u najvećoj meri zavisi od dostupnosti vode. Voda je biljkama neophodna za sve procese rastanja i razvića, kao i za obavljanje svih fizioloških i metaboličkih procesa.

Vodni režim predstavlja promet vode u biljci. Zavisi od procesa primanja vode iz sredine u kojoj biljke rastu, najčešće putem korenovog sistema, procesa transporta vode od korena ka stablu, listovima i ostalim organima, kao i od procesa odavanja vode preko nadzemnih organa (najčešće listova putem transpiracije). Odnos između usvojene i odate vode označava se kao vodni balans. Nemogućnost biljaka da usvajaju vodu iz svog okruženja utiče na pravilno odvijanje njihovih fizioloških i metaboličkih procesa, što dovodi do redukcije rastanja i razvića, ubrzavanja senescencije i u određenim slučajevima ima letalan efekat (Stikić i Jovanović, 2012).

## 1.1. Vodni stres

Poremećaj u vodnom statusu biljke, odnosno vodni stres, može da nastane kao rezultat negativnog dejstva različitih abiotičkih faktora stresa, kao što su nedostatak vode u zemljištu, povećani salinitet zemljišta, promene u količini padavina, porast koncentracije CO<sub>2</sub> u vazduhu, povećan intenzitet svetlosti, pojava suvog vetra u atmosferi koji povećava evaporaciju vode sa podloge, kao i ekstremne temperature.

Izmenjen vodni status biljke može biti posledica mnogih vrsta abiotičkog stresa, ali njegov značaj se najbolje objašnjava u uslovima suše. Suša, u širem smislu, može da se definiše kao dugotrajni nedostatak vode u spoljašnjoj sredini; ova pojava je označena kao **fizička suša**. Za biljke je od značaja i **fiziološka suša**, koja se definiše kao nemogućnost usvajanja vode iz podloge i kada je ona prisutna usled velike zaslanjenosti zemljišta, niskih temperatura ili nedostatka kiseonika u zemljištu nakon poplava. U uslovima vodnog stresa zahtev biljaka za vodom prevazilazi količinu raspoložive vode u podlozi koju biljka može da usvoji. Količina vode koju će biljka usvajati iz zemljišta uglavnom zavisi od stope stomaterne transpiracije. Što je suvlji vazduh koji okružuje biljku veća je i sila transpiracije, a samim tim i brža transpiraciona stopa odnosno usvajanje vode iz zemljišta putem korenovog sistema i odavanje vode u atmosferu preko stoma na listovima. Nivo stomaterne transpiracije takođe zavisi od brzine strujanja vazduha, kao i od njegove relativne vlažnosti. Suša uzrokuje zatvaranja stoma, što za posledicu ima nemogućnost fiksacije CO<sub>2</sub>, te tako

dolazi do smanjenja intenziteta fotosinteze, što na kraju rezultuje manjim prinosom biljaka (Slater i sar., 2008).

Većina biljaka je u toku svog životnog ciklusa izložena nedostatku vode u manjoj ili većoj meri, pa su razvile mehanizme za toleranciju na nedostatak vode u zemljištu. Neke biljke su sposobnije da izdrže dugotrajan i intenzivan vodni stres. Prema karakteru vlažnosti staništa koje zahtevaju razlikuju se biljne vrste koje žive u vodi (hidrofite) i suvozemne biljke: higrofite, mezofite i kserofite (Stikić i Jovanović, 2012). Higrofite su prilagođene uslovima vlažnih staništa i ne podnose sušu. Kserofite poseduju adaptacije koje im omogućavaju da podnesu sušu, odnosno nedostatak vode u zemljištu. Mezofite predstavljaju prelaznu grupu biljaka od higrofita ka kserofitama. Većina gajenih biljaka spada u grupu mezofita i može da podnese kratkotrajnu sušu bez štetnih posledica.

Za precizno opisivanje vodnog statusa biljne ćelije ili tkiva obično se koriste dva parametra: vodni potencijal i relativni sadržaj vode. Vodni potencijal ( $\Psi_v$ ) ili hemijski potencijal vode predstavlja kvantitativnu meru slobodne energije vode. Potencijal čiste vode pri standardnim fizičkim uslovima iznosi 0 MPa, dok rastvaranje neke supstance u vodi dovodi do snižavanja vrednosti vodnog potencijala. Voda se uvek kreće sa mesta višeg ka mestu sa nižim vrednostima vodnog potencijala; na taj način razlika u vodnom potencijalu koja se javlja između podloge (vlažno zemljište ima relativno visoku vrednost  $\Psi_w$ ) i atmosfere, omogućava stalno kretanje vode kroz biljku. Tokom procesa transpiracije dolazi do snižavanja vrednosti vodnog potencijala u listovima, ali ako u podlozi ima dovoljno vode, ona će ulaziti u biljku i kretati se prema listovima da bi se nadomestio gubitak. Međutim, ako je vodni potencijal zemljišta snižen, onda zahtev biljke za vodom prevazilazi mogućnosti njenog usvajanja iz podloge. Vodni stres nastaje kada se, pod dejstvom faktora spoljašnje sredine, smanji vodni potencijal podloge i/ili poveća vrednost vodnog potencijala u listovima biljaka (Slater i sar, 2008).

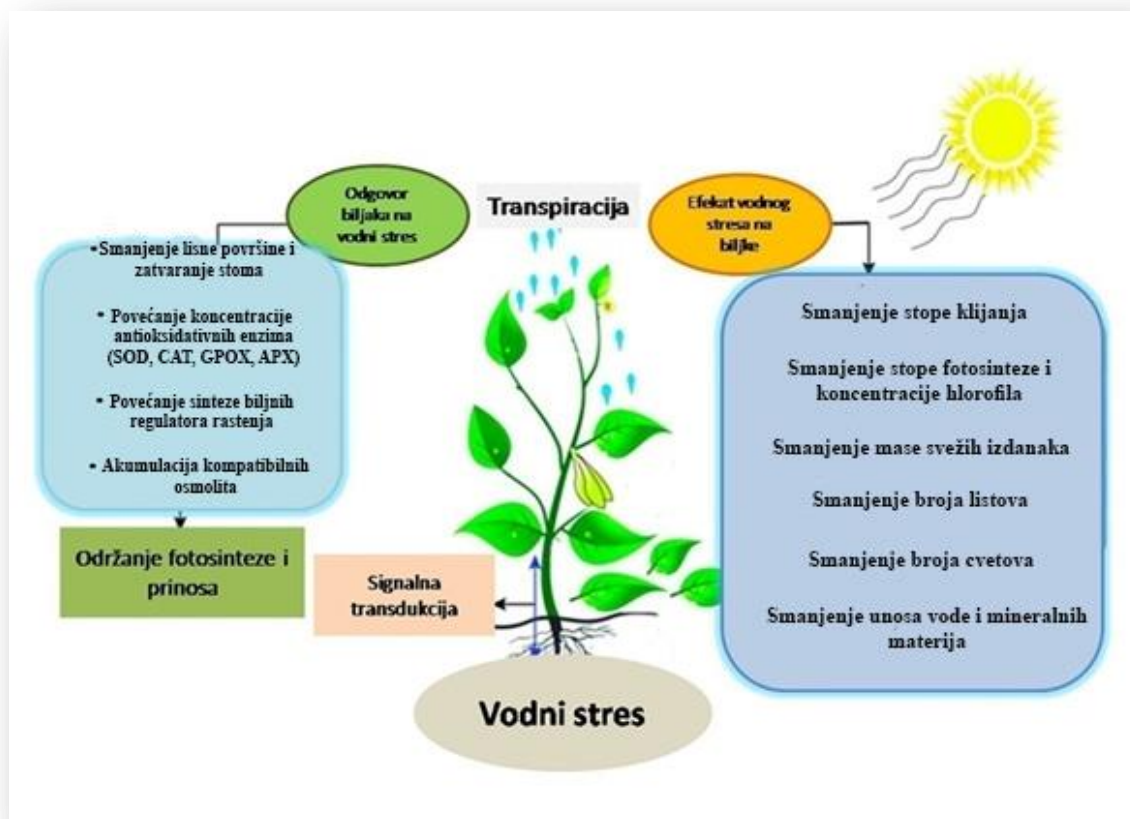
Relativni sadržaj vode (RWC, eng. *Relative Water Content*) određuje količinu vode u biljnim tkivima ili organima u odnosu na stanje pune turgescencije, odnosno potpune zasićenosti tkiva vodom. Na osnovu vrednosti relativnog sadržaja vode može da se odredi vodni deficit, koji predstavlja količinu vode izraženu u procentima koja nedostaje do punog zasićenja biljke vodom (Stevanović i Janković, 2001).

Smanjena dostupnost vode se može predstaviti kvantitativno kroz snižavanje vodnog potencijala (Kramer i Boyer, 1995). Snižavanje  $\Psi_w$  podloge otežava biljkama proces usvajanja vode, a dalje produžavanje stresa može dovesti i do potpune dehidracije i smrti biljke. Međutim, u uslovima vodnog stresa dolazi do pokretanja brojnih odbrambenih mehanizama u biljkama koji će im omogućiti da izbegnu gubitak vode u uslovima sniženog  $\Psi_w$ . Ovi mehanizmi uvek obuhvataju promene kako na ćelijskom nivou, tako i na nivou biljke kao celine (Versules i sar., 2006).

### 1.1.1. Odgovor biljaka na vodni stres

Vodni stres dovodi do molekularnih, biohemijskih i fizioloških odgovora kod biljaka. Poznato je da tolerancija na stres izazvan dehidracijom predstavlja kompleksan fenomen koji se može menjati u zavisnosti od uslova sredine koji deluju na biljke. Kako bi se kompenzovao nedostatak vode započinju regulatorni procesi koji će regulisati metabolizam na nove uslove. Geni koji se eksprimiraju tokom vodnog stresa trebalo bi da obezbede ćelijsku toleranciju prema nepovoljnim uslovima omogućavajući održavanje osmotske homeostaze, kontolu i popravku štete do koje stres dovodi, kao i regulaciju ekspresije drugih gena (Zhu 2002, Lata i sar., 2015; Zargar i sar., 2017).

Vodni stres višestruko utiče na biljke (**Slika 1.**). Ukoliko dugo traje, većina biljaka će dehidrirati i uvenuti. Vodni stres dovodi do smanjenja deoba i rasta ćelija što za posledicu ima smanjenje stope rasta biljaka, kao i inhibiciju reprodukcije.



**Slika 1.** Efekat vodnog stresa na biljke i odgovor biljaka na vodni stres (preuzeto i modifikovano iz Nadeem i sar., 2019).

Efekat vodnog stresa na biljke zavisi najviše od faze ontogenetskog razvića tokom koje deluje. Generativna faza razvića biljaka je osetljivija na nedostatak vode u odnosu na vegetativnu fazu. Usled nedostatka vode u zemljištu, dolazi do ubrzanog rasta korena u odnosu na nadzemni deo biljke čime se omogućava uzimanje vode iz dubljih slojeva zemljišta. Pored toga u ovim uslovima dolazi do smanjenja vodnog potencijala i turgora u ćelijama što za posledicu ima povećanje koncentracije osmotski aktivnih supstanci kao što su prolin i glicin betain u citoplazmi i ekstracelularnom prostoru čime se omogućava održavanje turgora u ćelijama. Ukoliko dođe do daljeg pada potencijala vode dolazi i do zatvaranja stoma, što predstavlja poslednju liniju odbrane biljke od vodnog stresa (Stikić i Jovanović, 2012). Biljke koje su pod uticajem suše su niže i sa manjom lisnom površinom jer tako smanjuju transpiraciju, a samim tim i fotosintezu. Kada dođe do zatvaranja stoma nema razmene gasova sa spoljašnjom sredinom, ne usvaja se CO<sub>2</sub> čime se usporava fotosinteza i smanjuje prinos gajenih biljaka (Lisar i sar., 2012; Nadeem i sar., 2019).

Efekat vodnog stresa na biljke, kao i reakcije biljaka, zavise od intenziteta i dužine trajanja vodnog stresa. Ukoliko stres duže traje njegovi negativni efekti sve više dolaze do izražaja, dok se mogućnost oporavka biljaka smanjuje. Od svih fizioloških procesa uvećanje ćelija je najosetljivije na opadanje potencijala vode, provodljivost stoma i fotosinteza. Kako opada vodni potencijal intenzivira se akumulacija osmotski aktivnih supstanci i hormona apscisinske kiseline (ABA) (Zhu 2002; Stikić i Jovanović, 2012).

Fotosinteza je proces posebno osetljiv na nedostatak vode. Da bi se biljka zaštitila od nedostatka vode dolazi do funkcionalnih i strukturnih promena u fotosintetičkom aparatu. Usled smanjenja dostupne vode u zemljištu ćelije korena počinju da šalju signale o nedostatku vode, otpuštajući ABA. Joni  $\text{Ca}^{2+}$  ulaze u citoplazmu iz spoljašnje sredine preko  $\text{Ca}^{2+}$  kanala u ćelijskoj membrani ćelija zatvaračica i iz vakuola u kojima se  $\text{Ca}^{2+}$  akumulira. Povećanje koncentracije  $\text{Ca}^{2+}$  smanjuje aktivnost protonske ATP-azne pumpe čime se smanjuje polarizacija membrane.  $\text{Ca}^{2+}$  joni sprečavaju fostorilaciju ATPaze jer inhibiraju specifičnu proteinsku kinazu koja vrši fosforilaciju.  $\text{Ca}^{2+}$  zatvara ulazne kanale za jone  $\text{K}^+$  čime se sprečava akumulacija jona  $\text{K}^+$  u ćelijama zatvaračicama (akumulacija ovih jona je neophodna da bi stome bile otvorene). Smanjenje aktivnosti protonske ATP-azne pumpe dovodi po povećanja membranskog potencijala koje uzrokuje da voltažni kanali u ćelijskoj membrani postaju propusni za jone  $\text{Cl}^-$  čiji izlazak iz ćelije dovodi do dodatne depolarizacije membranskog potencijala usled čega se otvaraju i izlazni  $\text{K}^+$  kanali. Gubitak  $\text{Cl}^-$  i  $\text{K}^+$  dovodi do gubitka turgora i zatvaranja stoma. Kada su stome zatvorene nema razmene gasova između biljke i atmosfere, odnosno nema ulaska  $\text{CO}_2$  koji je neophodan za fotosintezu (Nešković i sar., 2010).

Preko efekta na svetlu fazu fotosinteze i transporta elektrona, a naročito kroz uticaj na fotosisteme I (PSI) i II (PSII), kao i metaboličke reakcije fotosinteze takođe se ostvaruje nestomatna inhibicija fotosinteze. Menja se aktivnost ribuloza 1,5-bisfosfat karboksilaze/oksigenaze (RuBisCo), ključnog enzima fotosinteze koji može da katalizuje dve reakcije na istom supstratu. RuBisCo može da katalizuje reakciju karboksilacije ribuloza-1,5-bisfosfata (Ru-1,5-BP) koja vodi ka fotosintezi, i reakciju oksigenacije Ru-1,5-BP, koja vodi ka fotorespiraciji. U uslovima vodnog stresa dolazi do povećanja fotorespiracije usled smanjenja dostupne količine  $\text{CO}_2$  koji je neophodan za formiranje Ru-1,5-BP. Suša koja dovodi do vodnog stresa kod biljaka, je najčešće praćena visokim intenzitetom svetlosti, kao i visokim temperaturama, te se tako pored fotorespiracije, javlja i fotoinhibicija fotosinteze (Nešković i sar., 2010; Lisar i sar., 2012; Stikić i Jovanović, 2012; Zargar i sar., 2017; Hasanuzzaman i sar., 2018).

Suša na ćelijskom nivou dovodi do promena propustljivosti ćelijskih membrana kao i strukture citoplazme. Gubitak vode u ćelijama dovodi do promena u hidrataciji proteina, prostornoj organizaciji proteinskih molekula, enzima i membrana. Kao rezultat dehidratacije dolazi do smanjenja zapremine ćelije, povećanja koncentracije molekula u citoplazmi čime se menja njena viskoznost, smanjuje se aktivnost enzima i razmena materija između različitih delova ćelije (Zhu 2002; Lisar i sar., 2012).

### 1.1.2. Prijem i prenos signala pri vodnom stresu

Usled smanjenja dostupne vode u zemljištu dolazi do smanjenja turgora u ćelijama korena i ta se promena označava kao hidraulični signal suše koji se prenosi od korena do nadzemnih delova biljke izazivajući smanjenje rastenja ćelija i zatvaranje stominih ćelija. Do smanjenja rastenja u uslovima vodnog stresa dolazi i bez opadanja turgora, a promene su rezultat hemijskih signala suše. Nedostatak vode u zemljištu prvo detektuje koren koji potom šalje signal nadzemnim delovima biljaka sintezom molekula, koji se transportuju ksilemom do nadzemnog dela dovodeći do zatvaranja stoma i smanjenja rastenja. Najverovatnije hemijski signali prethode hidrauličnim i zato se označavaju kao signali ranog upozoravanja biljaka na vodni stres. Smatra se da su najvažniji hemijski signali ABA, citokinini, etilen i joni  $\text{Ca}^{2+}$  (Zhu, 2002).

Signalna kaskada pri uslovima vodnog stresa za biljke se sastoji od tri osnovne komponente: prijem signala stresa, prenos signala i odgovor biljaka. Još uvek nije u potpunosti jasno kako biljke prepoznaju vodni stres i mnogo više se zna o prenosu signala i odgovoru biljaka, mada ni ti procesi nisu u potpunosti rasvetljeni (Nongpiur i sar., 2020). Veliki broj signalnih puteva koji se dešavaju

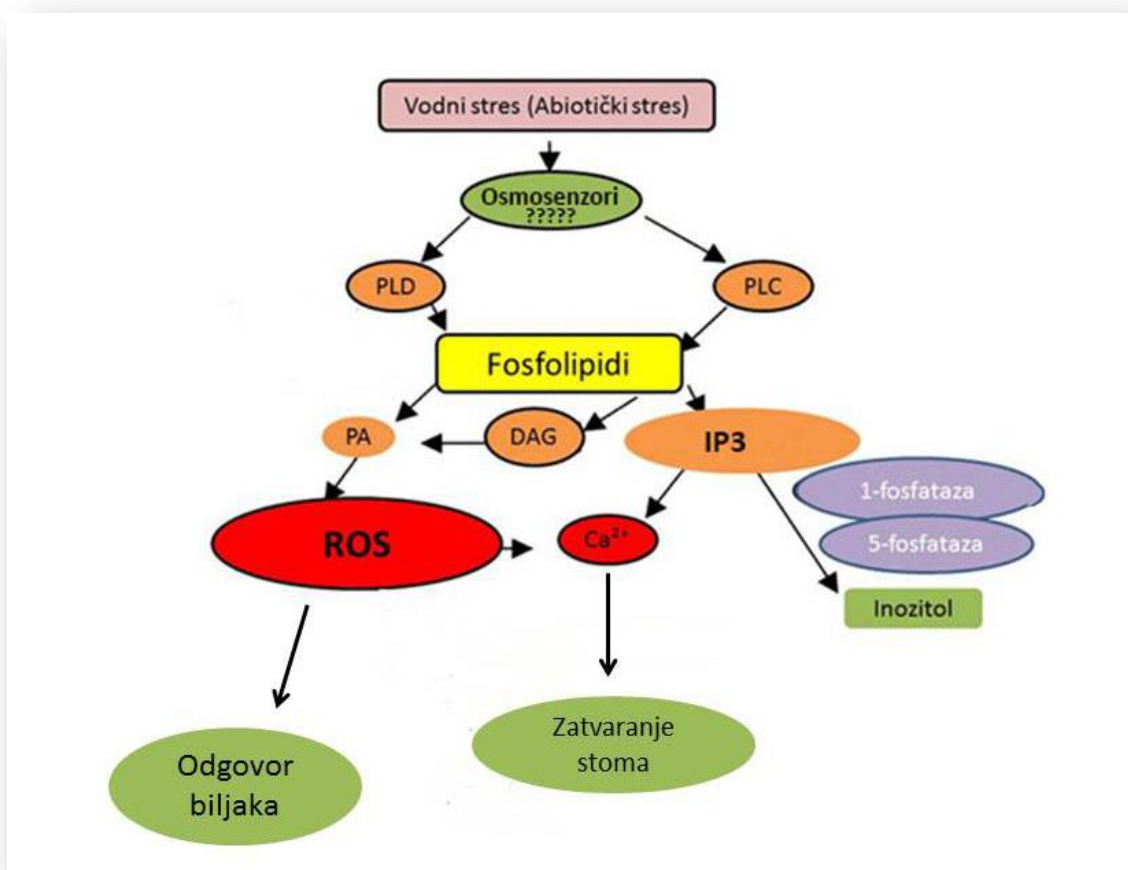


pri vodnom stresu kod biljaka sugerije da postoji više mehanizama koji omogućavaju prijem signala vodnog stresa. Prijem signala vodnog stresa osmosenzorima kod biljaka uključuje prepoznavanje vodnog stresa pomoću ćelijskih komponenti kao što su ćelijska membrana i ćelijski zid (Nongpiur i sar., 2020).

Na nivou ćelije glavni senzor suše je najverovatnije transmembranski vezana dvo-komponentna histidin kinaza koju aktivira pad osmotskog potencijala ćelije. Ova kinaza se zbog toga označava kao osmosenzor. Prvo je pronađena kod bakterija i kvasca. Kod *Arabidopsis thaliana* otkrivena je histidin kinaza AtHTK1 za koju se veruje da pokreće kaskadu signalnih reakcija (transdukcija signala) koja dovodi do ekspresije gena indukovanih dehidratacijom (Nongpiur i sar., 2020; Takahashi i sar., 2020).

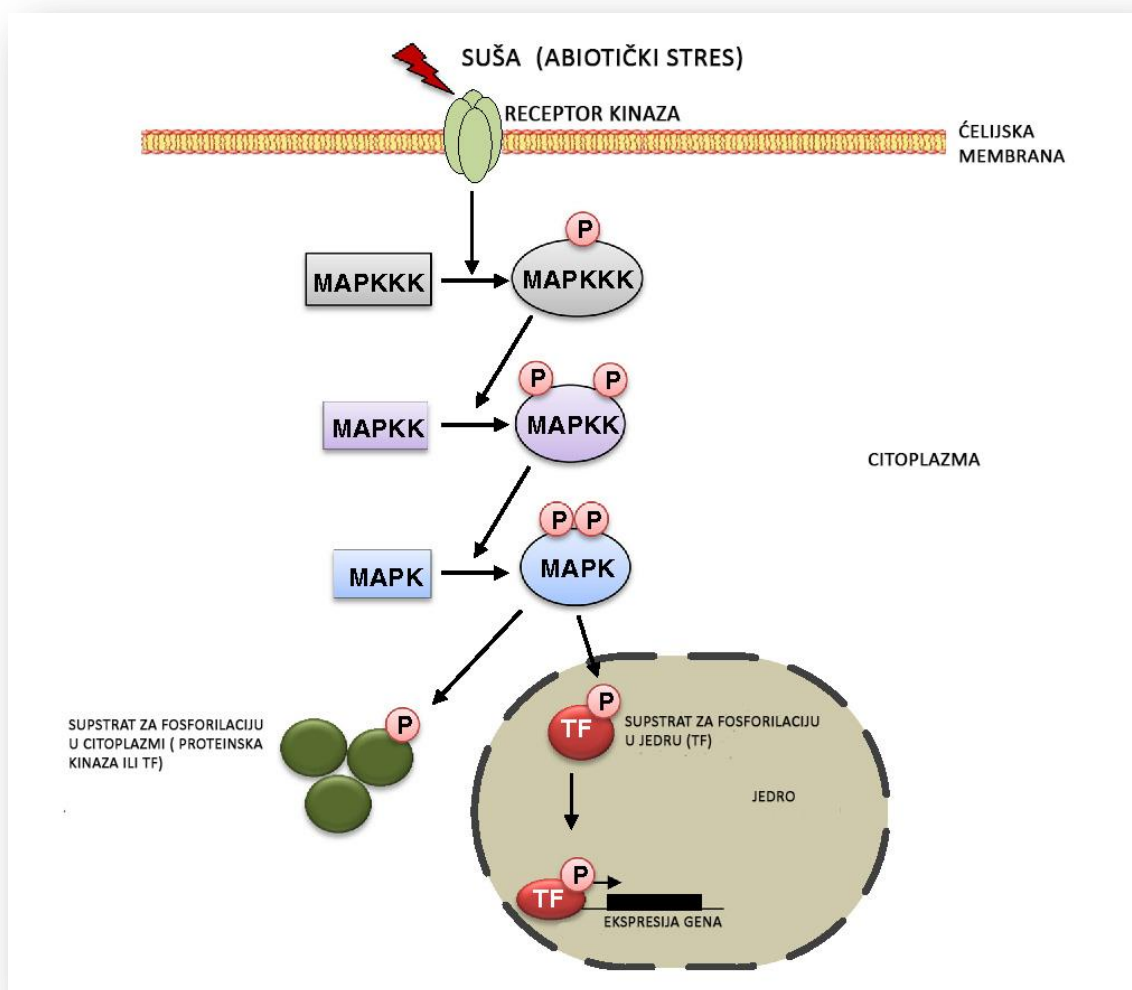
Kalcijumovi kanali su jedan od kandidata za osmosenzore u odgovoru na vodni stres. Kanali za usvajanje  $Ca^{2+}$ , mehanosenzitivni kanali propustljivi za  $Ca^{2+}$  1 (MCA1) i MCA2 omogućavaju rastenje u stresnim uslovima (Takahashi i sar., 2020). MCA1 i MCA2 predstavljaju senzore potencijala pritiska ćelijskog zida na protoplast kod biljaka i zato se smatra da mogu da vrše percipiranje promena u hidrauličnom pritisku koje nastaje usled dehidratacije pri vodnom stresu (Takahashi i sar., 2020).

Membranski fosfolipidi su značajni strukturni elementi ćelijske membrane koji tokom odgovora na stres predstavljaju i supstrat fosfolipaza (prvog efektor) za formiranje sekundarnih glasnika poput inozitol 1,4,5-trifosfata ( $IP_3$ , eng. *Inositol Trisphosphate*), diacilglicerola (DAG), i fosfatidinske kiseline (PA eng. *Phosphatidic Acid*) (Zhu, 2002). Fosfolipidni signalni sistem se kategorizuje na osnovu fosfolipaze koja katalizuje formiranje lipida i drugih prenosioaca signala (**Slika 2.**). Među ovim signalnim sistemima putevi fosfolipaze C (PLC, eng. *Phospholipase C*) i fosfolipaze D su dobro okarakterisani. PLC katalizuje hidrolizu fosfatidilinositol 2,5-bifosfata ( $PIP_2$  – eng. *Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate*) na sekundarne prenosioce  $IP_3$ , i DAG.  $IP_3$  dovodi do otpuštanja kalcijuma iz ćelijskih rezervoara, dok se DAG aktivnošću DAG kinaze fosforiliše u PA.  $IP_3$  indukovano otpuštanje kalcijuma dovodi do zatvaranja stoma čime se omogućava da ćelije zadrže vodu. (Lata i sar., 2015). Uvećanje aktivnosti fosfolipaze D (PLD) je primećeno kod velikog broja biljaka. PLD dovodi do degradacije membranskih fosfolipida na PA i slobodne masne kiseline. PA je značajan signalni molekul koji dovodi do povećanja produkcije reaktivnih vrsti kiseonika (ROS, eng. *Reactive Oxygen Species*) najverovatnije aktivirajući NADPH oksidazu. Povećanje ROS dovodi do različitih molekularnih, biohemijskih i fizioloških odgovora biljaka (Zhu, 2002; Lata i sar., 2015).



**Slika 2.** Shema fosfolipidne signalizacije pri vodnom stresu. Prilikom delovanja vodnog stresa dolazi do prijema i prenosa signala u biljnim ćelijama. Aktivira se nekoliko fosfolipaza (npr. fosfolipaze C i D) koje hidrolizuju fosfolipide čime nastaju sekundarni prenosiooci (npr. PA, DAG i IP<sub>3</sub>), koji omogućavaju toleranciju na stres indukujući specifičan odgovor biljaka (preuzeto i modifikovano iz Zhu, 2002).

Fosforilacija proteina je bitna u ćelijskoj signalizaciji prilikom odgovara biljaka na stres. Proteinske kinaze koje se aktiviraju mitogenima (MAPK – eng. *Mitogen Activated Protein Kinase*) su najviše izučavana klasa proteina koja ima ključnu ulogu u prijemu signala stresa i njegovog daljeg prenosa u ćeliji (Danquah i sar., 2013). MAPK kaskada se sastoji najmanje od tri proteinske kinaze: MAPKKK, MAPKK, i MAPK koje sekvencijalno aktiviraju jedna drugu fosforilacijom (Slika 3.). Prikazana je generalizovana shema MAPK kaskade za eukariotske ćelije koja još uvek nije dokazana za većinu biljnih MAPKKK (Lozano-Juste i sar., 2020). MAPK kaskada započinje tako da aktivirana MAPKKK prvo fosforiliše serinski i/ili treoninski ostatak u aktivnom mestu MAPKK. Aktivirana MAPKK aktivira MAPK fosforilacijom visoko konzervativnog T-X-Y motiva u aktivnom mestu MAPK (Danquah i sar., 2013). Sekvencijalna aktivacija MAPK kaskade dovodi do fosforilacije specifičnih ciljnih molekula kao što su transkripcioni faktori (TF), fosfolipidi, proteini citoskeleta i proteini zastupljeni u kasnoj fazi embriogeneze (LEA – eng. *Late Embryogenesis Abundant*). Ovi molekuli dovode do aktivacije određene grupe gena koji se eksprimiraju kao odgovor na prijem signala stresa. Veliki broj MAPK, MAPKK, MAPKKK su identifikovane kod brojnih biljnih vrsta i funkcionišu u nekoliko različitih procesa formirajući kompleksne mreže signalizacije (Danquah i sar., 2013).

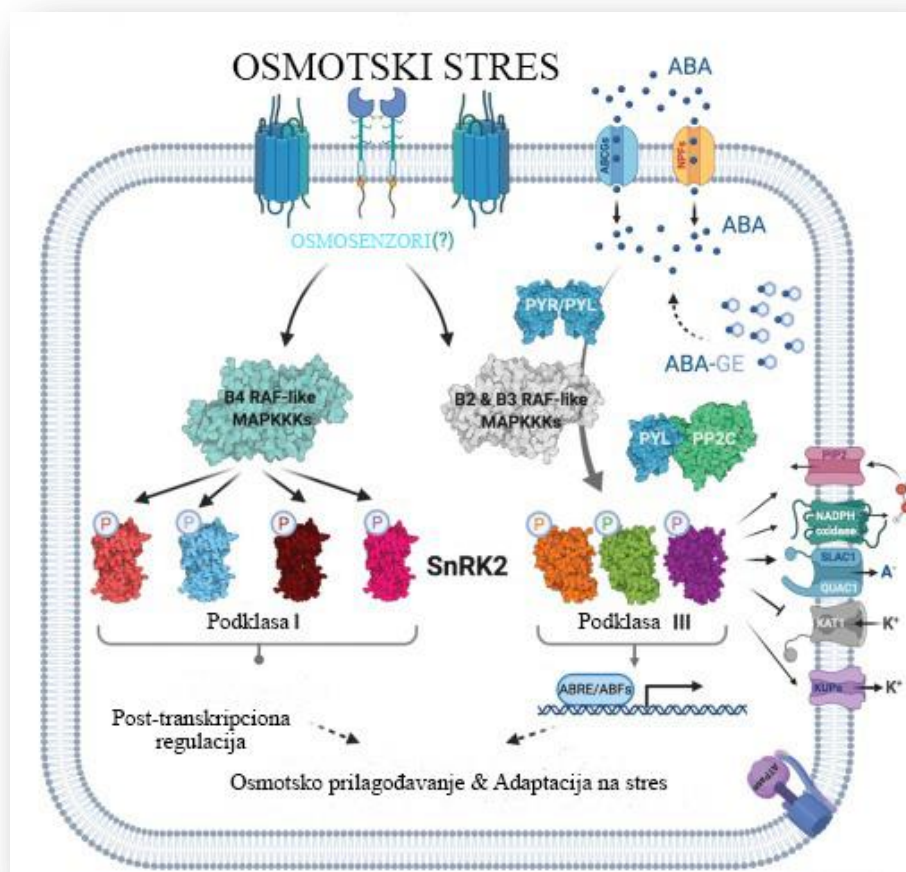


**Slika 3.** Shema tipične MAPK kaskade. Aktivacija MAPKKK dovodi do sekvencijalne aktivacije i fosforilacije MAPKK i MAPK koje dalje aktiviraju ciljne molekule kao što su TF, vrše fosforilaciju ciljnih proteina, regulišu gensku ekspresiju i dovode do aklimacije biljke pri uslovima stresa (preuzeto i modificovano iz Danquah i sar., 2013).

ABA predstavlja biljni hormon izoprenoidne strukture koji se često naziva i univerzalnim hormonom stresa. Pri vodnom stresu akumulacija ABA stimuliše zatvaranje stoma smanjujući transpiraciju, indukuje ekspresiju određenih gena (ABA - zavisni geni) čime doprinosi toleranciji na vodni stres. ABA se sintetiše u ćelijama mezofila listova ili u ćelijama korena. ABA se u korenovima sintetiše kao odgovor na isušivanje zemljišta u ranim fazama suše. Ona se iz korena transportuje ksilemskim elementima do nadzemnih delova i listova gde utiče na procese rastenja i reakcije stominih ćelija. ABA sintetisana u mezofilnim ćelijama listova može da se transportuje floemom do korena, a odatle da recirkuliše ksilemom ponovo do listova (Stikić i Jovanović, 2012).

Kod biljaka pre pojave ABA, stres se prepoznaje za sada nepoznatim osmosenzorima koji aktiviraju B2, B3 i B4 RAF-like MAPKKK (**Slika 4.**). B2 i B3 MAPKKK vrše fosforilaciju klase I SnRK2s (SNF1-srodne proteinske kinaze 2s), koje imaju ulogu u osmotskom prilagođavanju biljnih ćelija putem postranskripcione regulacije. ABA se u ćelijama zatvaračicama javlja brzo (jer najverovatnije dolazi do povlačenja ABA iz ćelijskih rezervoara u okolnim ćelijama mezofila listova), dok je za druga tkiva neophodno više vremena za njenu sintezu u korenu i transport vaskularnim tkivima do mesta na kojima se koristi. Na **Slici 4.** su označeni ABCG i NBF koji predstavljaju transmembranske ABA transportere. ABA-glikozil estar (ABA-GE) koji se skladišti u

vakuoli ili endoplazmatičnom retikulumu se otpušta kao odgovor na vodni stres i predstavlja još jedan izvor ABA. Podklasa I SnRK2s (SnRK2.2, SnRK2.3 i SnRK2.6) se aktivira pomoću B4-MAPKK. Potpuna aktivacija SnRK2.2/3/6 zahteva da se ABA i ABA receptori oslobode od PP2C inhibicije. SnRK2.2, SnRK2.3 i SnRK2.6 su ključne komponente signalnih puteva ABA. U odsustvu ABA SnRK2.2/3/6 su inhibirane defosforilacijom sa proteinskom fosfatazom (PP2C). Kada su biljke izložene vodnom stresu dolazi do biosinteze i akumulacije ABA koja se vezuje za receptore (PYR1, PYL i RCAR) što dovodi do inhibicije PP2C aktivnosti i fosforilacije SnRK2.2/3/6 (Lin i sar., 2020). Transkripciona aktivacija ABA zavisnih gena je kontrolisana podklasom III SnRK2. U ćelijama zatvaračicama podklasa III SnRK2s omogućava efluks anjona (posebno Cl<sup>-</sup>) i kalijuma (K<sup>+</sup>), što dovodi do gubitka vode i zatvaranja stoma, čime se sprečava prekomerni gubitak vode transpiracijom. Spori i brzi anjonski kanali (SLAC/QUAC) pomažu u efluksu Cl<sup>-</sup>. Akvaporini predstavljaju intrinzične proteine ćelijske membrane i pripadaju PIP<sub>2</sub> proteinskoj familiji, imaju ulogu u povećanju propustljivosti bioloških membrana za vodu i omogućavaju pasivni prolaz H<sub>2</sub>O niz gradijent koncentracije. U drugim ćelijama i tkivima (kao što su korenovi) aklimacija na vodni stres obuhvata osmotsko prilagođavanje kako bi se obezbedilo uzimanje vode. (Lozano-Juste i sar., 2020).



**Slika 4.** Odgovor biljaka na vodni stres. Shema ilustruje osmosenzore i percepciju ABA koja aktivira prilagođavanje biljaka na stres. Na slici su označeni za sada nepoznati osmosenzori, ABCG i NBF- transmembranski ABA transporteri; B2, B3 i B4 RAF-like MAPKKK; SnRK2s podklase I i spori i brzi anjonski kanali (SLAC/QUAC), ulazni i izlazni kanali za K<sup>+</sup>; PIP<sub>2</sub> proteini; ABA receptori PYR1, PYL i RCAR; AREB/ABF - familija transkripcionih faktora koji prepoznaju ABRE motiv i tako aktiviraju ABA-zavisne gene (preuzeto i modifikovano iz Lozano-Juste i sar., 2020).

Proizvodi gena koji se aktiviraju usled vodnog stresa najčešće se klasifikuju u proteine koji direktno učestvuju u toleranciji stresa kao što su akvaporini i LEA proteini. Nekoliko proizvoda gena indukovanih vodnim stresom štite ćelijske strukture od dehidracije. LEA proteini su najzastupljeniji ćelijski proteini koji se povezuju sa tolerancijom biljaka prema vodnom stresu i stresu izazvanim niskim temperaturama. Kod biljaka je do sada identifikovano šest grupa LEA gena koji kodiraju šest grupa LEA proteina. Dehidrini predstavljaju grupu 2 LEA proteina koja se akumuliraju tokom vodnog stresa (Tunnacliffe i Wise, 2007; Hirayama i Shinozaki, 2010). Akvaporini su transmembranski proteinski kanali koji omogućavaju brz i selektivni transport molekula vode kroz ćelijsku membranu biljaka. Nekoliko studija je potvrdilo da akvaporini imaju izuzetno značajnu ulogu i u međućelijskom transportu vode. Akvaporini su zastupljeni u ćelijama korena gde posreduju u procesu usisavanja vode iz zemljišta (Javot i Maurel, 2002).

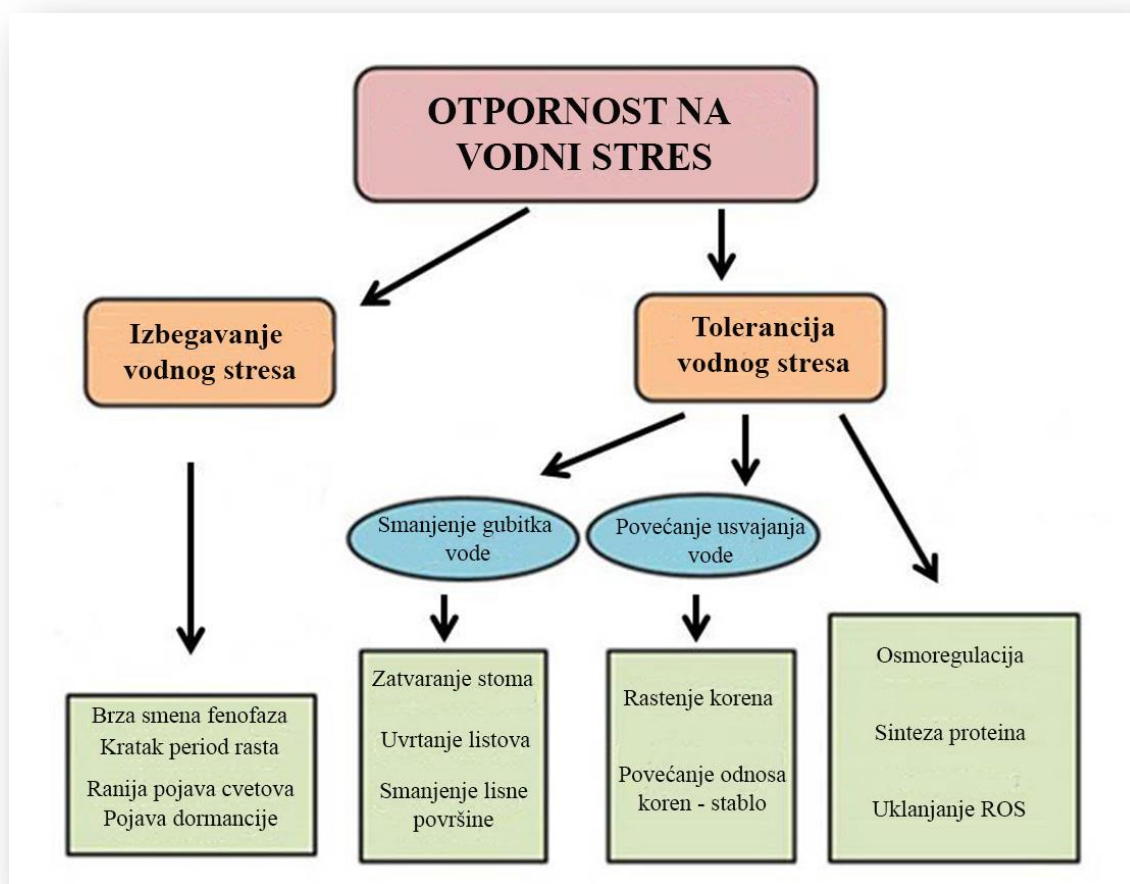
### 1.1.3. Mehanizmi otpornosti biljaka prema vodnom stresu

Biljke uglavnom poseduju više različitih mehanizama za toleranciju ili izbegavanje stresa. Početni stres može biti blag, sa minimalnim efektom na biljke, ali ako se dejstvo stresogenih faktora slabog intenziteta nastavi tokom dužeg vremenskog perioda može dovesti do hroničnog stresa. U ovakvim uslovima će najčešće doći do morfoloških i fizioloških promena na biljkama koje vode aklimaciji. U uslovima akutnog stresa, dejstvo faktora stresa je brzo i intenzivno, pa u kratkom vremenskom periodu dovodi do značajnih promena u biljci, koje mogu imati letalni ishod (Gaspar i sar., 2002).

U ispitivanju fiziologije stresa važno je napraviti razliku između termina adaptacija i aklimacija biljaka na stres. Adaptacija biljaka na dejstvo faktora stresa nastaje kao rezultat genetičkih promena u populaciji koje se javljaju tokom više generacija. Procesi mikroevolucije menjaju učestalost određenih gena u populaciji. Tako će specifični genotip, sa odgovarajućom kombinacijom gena (koja povećava mogućnost jedinke da preživi i da se reprodukuje u uslovima stresa) biti dominantan u populaciji. Ove posebno povoljne kombinacija gena predstavljaju adaptaciju biljaka i omogućavaju im da naseljavaju „stresna“ staništa. Aklimacija biljaka predstavlja sposobnost podešavanja fizioloških i strukturnih osobina u okviru istog genotipa. Tokom aklimacije organizam menja svoju homeostazu, odnosno stabilno fiziološko stanje, da bi se prilagodio promenama u svom okruženju. Ako se biljke koje su recimo otporne na hlađenje (eng. *chilling*), duži vremenski period izlažu niskim temperaturama, one će prilagoditi svoj metabolizam i proces rastanja i razvića navedenim specifičnim uslovima, a biljno tkivo će se odlikovati povećanom otpornošću na hlađenje (Jouve i sar., 2000). Biljke otporne na smrzavanje (eng. *freezing*) mogu da prežive i nakon formiranje leda u svom tkivu. Aklimacija predstavlja fenotipski odgovor na različite kombinacije faktora spoljašnje sredine. Fenotipska plastičnost je pokazatelj broja mogućih aklimacija u okviru jednog genotipa (Nilsen i Orcutt, 1996).

Kroz kombinaciju morfoloških, anatomskih, fizioloških i biohemijskih procesa odigravaju se adaptacije na nivou populacije, a aklimacije na nivou pojedinačne biljke (Luthe i sar., 2000).

Postoje dva osnovna mehanizma otpornosti kod biljaka prema vodnom stresu: izbegavanje stresa i tolerancija na stres (**Slika 5.**).



**Slika 5.** Shematski prikaz mehanizama otpornosti prema vodnom stresu (preuzeto i modifikovano iz Bodner i sar., 2015).

Izbegavanje stresa odnosi se na fenološke promene – promene dužine trajanja i nastupanja pojedinih faza razvika na nivou organizma ili populacije. Ostvaruje se brzom smenom fenofaza posle kratkotrajnih padavina, kratkim periodom rastenja i ranijom pojavom cvetanja, a kod nekih biljaka i periodom dormancije kada nastupe nepovoljni uslovi sredine. Najčešće se javlja kod biljaka iz tropskih oblasti gde su razdvojeni kišni i sušni periodi (Chaves i sar., 2003).

Tolerancija biljaka na vodni stres se postiže osmotskim prilagođavanjem (sintezom osmotski aktivnih molekula), sintezom LEA proteina i uklanjanjem ROS koji nastaju kao posledica vodnog stresa (Bodner i sar., 2015). Bržim rastenjem korena se takođe postiže tolerancija biljaka na vodni stres, jer koren prodire u dublje slojeve zemljišta (podloge) u kojima ima više vode. Smanjenje gubitka vode kada period vodnog stresa duže traje ostvaruje se zatvaranjem stoma čime se sprečava gubitak vode putem transpiracije (Kramer i Boyer, 1995).

#### 1.1.4. Tolerancija biljaka prema vodnom stresu osmotskim prilagođavanjem

Kao posledica vodnog stresa dolazi do pojave osmotskog prilagođavanja biljaka putem akumulacije velike količine različitih tipova kompatibilnih osmolita. Kompatibilni osmoliti predstavljaju organske molekule niske molekulske mase. Molekuli koji imaju ovu funkciju mogu biti aminokiseline (prolin), kvaternerna jedinjenja amonijaka (glicin betain), šećeri (saharoza, trehaloza, glukoza, fruktoza) i šećerni alkoholi (manitol, sorbitol, inozitol, myo-inozitol). Data

jedinjenja sakupljaju se u citoplazmi i održavaju osmotski potencijal i fiziološku aktivnost ćelije (Taiz i Zeiger, 2010). Kompatibilni osmoliti su molekuli koji ne narušavaju normalne reakcije metabolizma u ćeliji, nisu toksični za ćeliju i biljku ni u visokim koncentracijama. Kompatibilni osmoliti omogućavaju osmotsko prilagođavanje biljke u uslovima vodnog stresa jer dovode do snižavanja ćelijskog osmotskog potencijala u odnosu na osmotski potencijal u zemljištu. a time i vodnog potencijala ćelije ( $\Psi_v$ ) u odnosu na vodni potencijal supstrata ( $\Psi_w$ ) (Chen i Murata, 2008).

Ćelijski sok u vakuoli predstavlja rastvor koji ima određeni osmotski potencijal ( $\Psi_\pi$ ). Kada se ćelije stave u vodu, rastvorene supstance ne mogu da izađu jer im ne dopuštaju citoplazmatična membrana i membrana vakuole (tonoplast). Međutim, voda koja lako prolazi kroz obe membrane, ulazi u ćeliju putem osmoze usled razlike u vodnom potencijalu u vakuoli i van ćelije. U ćeliji, voda koja ulazi u vakuolu razvija pritisak na ćelijski zid koji se naziva turgorov pritisak (TP), a za ćeliju se u tom slučaju kaže da je turgescetna. Pod pritiskom, koji se razvija u vakuoli ćelijski zid se do izvesne mere rasteže, ali i razvija pritisak na ćelijski sadržaj koji se naziva zidni pritisak (ZP). TP je u svakom momentu jednak ZP samo je suprotnog smera. ZP zaustavlja osmozu ne sprečavajući da voda ulazi u ćeliju već istiskuje višak vode napolje jer povećava vodni potencijal rastvora tako da voda difunduje niz gradijent napolje. Biljna ćelija tako stiče potencijal pritiska ćelijskog zida ( $\Psi_p$ ).

$\Psi_v$  se sastoji iz dve komponente: osmotski potencijal ( $\Psi_\pi$ ) i potencijal pritiska ćelijskog zida  $\Psi_p$ . Odnos između ove dve komponente može se predstaviti jednačinom:

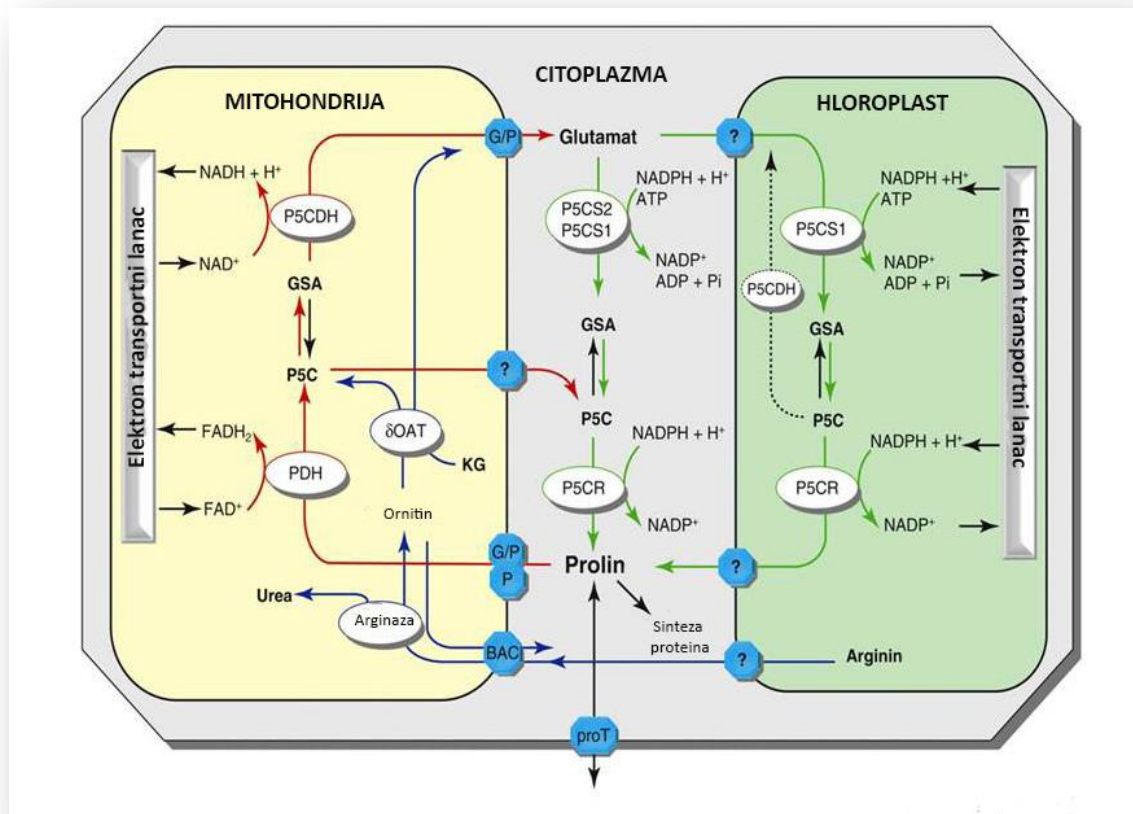
$$\Psi_v = \Psi_\pi + \Psi_p$$

$\Psi_v$  i  $\Psi_\pi$  imaju negativan predznak, vodni potencijal ćelijskog soka označava količinu vode koju ćelija može da primi (Nešković i sar., 2010).

#### 1.1.4.1. Uloga prolina u odgovoru biljaka prema vodnom stresu

Prolin je važan kompatibilni osmolit. Primećeno je da u uslovima stresa dolazi do nakupljanja prolina kod velikog broja biljnih vrsta. Iako se mnogo toga zna o metabolizmu prolina, određeni aspekti su još uvek nepoznati (Szabados i Savouré, 2010). Prolin se u biljkama sintetiše iz glutamata i ornitina, ali u uslovima osmotskog stresa glavni prekursor za sintezu je glutamat. Enzimi za sintezu prolina lokalizovani su u citoplazmi i plastidima, dok se razgradnja prolina odvija u mitohondrijama (**Slika 6.**). Prolin se nagomilava u mnogim biljnim vrstama kao odgovor na različite faktore abiotičkog stresa kao što su nedostatak vode, zaslanjenost ili prisustvo teških metala u zemljištu. Prolin je inertan kompatibilni osmolit koji štiti ćelijske strukture i makromolekule u uslovima vodnog stresa. (Sharma i Dubey, 2005).

Prolin učestvuje i u regulaciji pH kao i u regulaciji redoks statusa ćelije. Tokom biosinteze prolina u hloroplastima koristi se višak redukujućeg potencijala (u vidu NADPH) koji je nastao u zasićenom elektron transportnom lancu i na taj način se doprinosi održanju redoks ravnoteže (odnosa  $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ ) i ćelijske homeostaze (Taiz i Zeiger, 2010). Katabolizam prolina u mitohondrijama je povezan sa oksidativnom respiracijom i snabdevanjem biljke energijom u periodima oporavka od stresa. Prolin se tokom stresa nagomilava u vakuoli i citoplazmi gde štiti ćeliju od hidroksil radikala ( $\text{HO}\cdot$ ) i singleta kiseonika ( $^1\text{O}_2$ ) (Matysik i sar., 2002). Tokom sinteze prolina, NADH se koristi za redukciju glutamata, što povećava  $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$  odnos, koji sprečava poremećaje redoks osetljivih puteva tokom vodnog stresa (Hare i Cress, 1997; Taiz i Zeiger, 2010).



**Slika 6.** Model metabolizma prolina. Biosintetski put prolina je obeležen zelenim linijama, katabolički put crvenim linijama, a put ornitina plavim linijama. Enzimi su obeleženi elipsama, transportni protein plavim oktagonima. BAC – bazični nosač aminokiselina koji učestvuje u razmeni arginina i ornitina; Glu – glutamat; G/P – mitohondrijalni glutamate/prolin antiporter; KG – alfa keto glutarat; P – mitohondrijalni prolin transporter; Pi – neorganski fosfor; ProT – transporter prolina ćelijske membrane; ? – pretpostavljeni transporter (preuzeto i modifikovano iz Szabados i Savouré, 2010).

Najbitniji enzim biosintetskog puta prolina iz glutamata kod biljaka i viših eukariota je  $\Delta$ -1-pirolin-5-karboksilat sintetaza (P5CS) (Hu i sar., 1992). P5CS je bifunkcionalan enzim koji prvo katalizuje aktivaciju glutamata fosforilacijom, a zatim redukciju nastalog međuproizvoda,  $\gamma$ -glutamil fosfata u glutamat semialdehid (GSA). Spontanom ciklizacijom nastaje glavni intermedijer pirolin-5-karboksilat (P5C). Redukcijom intermedijera P5C u citoplazmi nastaje L-prolin dejstvom enzima P5C reduktaze (P5CR). Katabolizam prolina se odvija u mitohondrijama. Delovanjem prolin-dehidrogenaze (PDH) iz prolina nastaje P5C, koji podleže neenzimskoj hidrolizi koja dovodi do otvaranja prstena i nastajanja GSA (Adams i Frank, 1980). PDH je FAD-zavisan enzim lokalizovan u unutrašnjoj membrani mitohondrija koji tokom oksidacije prolina direktno vrši prenos elektrona na mitohondrijalni elektron transportni lanac (Tanner, 2008). Delovanjem P5C dehidrogenaze (P5CDH) GSA prelazi u glutamat u prisustvu NAD<sup>+</sup>. U meristemskim i embriogenim tkivima biosinteza prolina se odvija u citoplazmi i kontrolisana je P5CS i P5CR enzimima. Pri stresnim uslovima P5CS1 se akumulira u hloroplastima i tako se sinteza prolina povećava u plastidima. Degradacija prolina se dešava u mitohondrijama, prolin se oksiduje u P5C i glutamat delovanjem PDH i P5CDH. Put ornitina kreće od arginina, pri čemu nastaje P5C i glutamat u mitohondrijama. Mitohondrijalni P5C može da se reciklira u prolin u citoplazmi delovanjem P5CR.

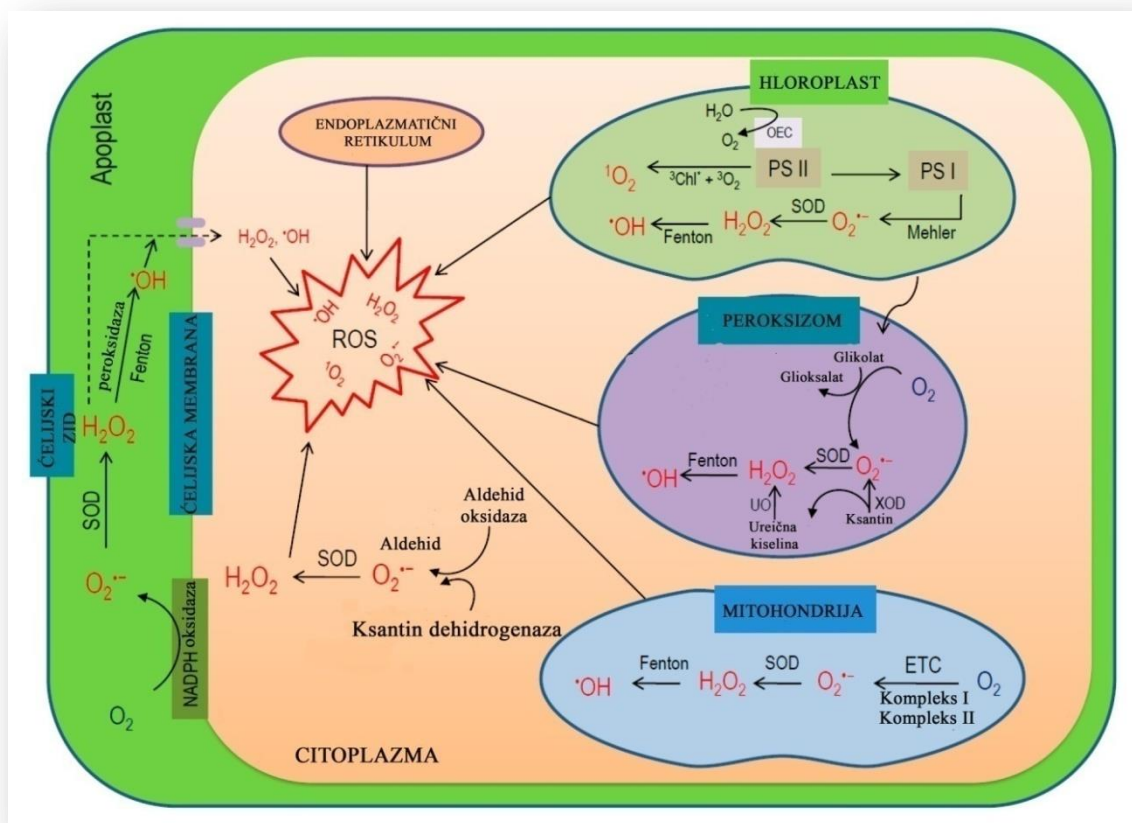


U većini biljaka, stresom indukovana akumulacija slobodnog prolina je rezultat povećane biosinteze i smanjene degradacije prolina (Szabados i Saviouré, 2010). Dok je biosinteza prolina stimulirana u uslovima visokog intenziteta svetlosti i osmotskog stresa, katabolizam prolina je aktiviran u mraku, kao i pri oporavku od stresa i kontrolisan je enzimima PDH i P5CDH (Saibi i sar., 2015).

## 1.2. Oksidativni stres kao posledica vodnog stresa

Svaki stres koji nastaje kao posledica dejstva faktora sredine (biotičkih i abiotičkih) može da dovede do oksidativnog stresa (Slater i sar., 2008). Vodni stres je uvek praćen oksidativnim stresom, usled stvaranja velike količine ROS. Oksidativni stres se javlja kao rezultat poremećene ravnoteže između produkcije ROS i antioksidativnog sistema koji je odgovoran za uklanjanje ROS. U ROS spadaju: superoksid anjon radikal ( $O_2^{\cdot-}$ ), hidroksil radikal ( $OH^{\cdot}$ ), peroksil radikal ( $RO_2^{\cdot}$ ), kao i vodonik-peroksid ( $H_2O_2$ ), singlet kiseonik ( $^1O_2$ ) (Radojčić, 2006).

Glavna mesta nastanka ROS u biljkama su hloroplasti, mitohondrije, peroksizomi i endoplazmatični retikulum (Slika 7) (Hasanuzzaman i sar., 2020).



**Slika 7.** Mesto nastanka ROS u biljnoj ćeliji: ROS – reaktivne vrste kiseonika,  $H_2O_2$  – vodonik peroksid,  $O_2^{\cdot-}$  – superoksid anjon,  $^1O_2$  – singlet kiseonika,  $OH^{\cdot}$  – hidroksil radikal, SOD – superoksid dismutaza, UO – urat oksidaza, ETC – elektron transportni lanac, PSI – fotosistem I, PSII – fotosistem II, NADPH – nikotinamid adenin dinukleotid fosfat, OEC – kompleks koji oksiduje vodu (Preuzeto iz Hasanuzzaman i sar., 2020).

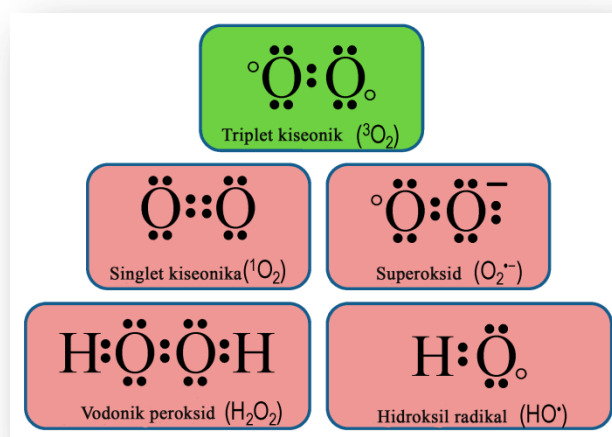
U hloroplastima ROS se proizvode uglavnom u reaktivnim centrima fotosistema I i II (PSI i PSII) (Saleem i sar., 2021). U okviru PSII nakon apsorpcije fotona molekuli antena hlorofila prelaze u pobuđeno stanje (prvi ili drugi singlet) i brzo otpuštaju elektrone ako je reaktivni centar u stanju da ih primi. Ako ostanu duže ekscitirani povećava se prelaz u triplet stanje koje je dovoljno dugo da se energija može preneti na kiseonik. Tako kiseonik prelazi u singlet kiseonika  $^1\text{O}_2$ , koji je veoma reaktivan prema lipidima, proteinima i pigmentima u okolini nastanka. Prenos elektrona sa plastokinona A na plastokinon B u okviru PSII je najsporiji proces, a dodatno je usporen kada je pul plastokinona redukovano i ne može da primi elektrone, i tada najčešće nastaje  $^1\text{O}_2$  (Asada, 2006; Nešković i sar., 2010; Saleem i sar., 2021). U PSI dolazi do zastoja prenosa elektrona kada je pul NADP maksimalno redukovano, usled usporavanja biohemijskih reakcija u kojima se NADP ponovo oksiduje. Tada se elektroni sa feredoksina prenose na kiseonik umesto na NADP, pri čemu nastaje  $\text{O}_2^-$  (Asada, 2006; Nešković i sar., 2010; Saleem i sar., 2021).

U mitohondrijama ROS se stvaraju na mestima gde se dešava transfer elektrona u okviru elektron transportnih lanaca (ETC kompleks I i II) i najčešće se javlja  $\text{O}_2^-$ , koji nastaje redukcijom ubikvinona (UQ) (Sharma i sar., 2012). U peroksizomima, se stvara  $\text{H}_2\text{O}_2$  i to u reakciji glikolat oksidaze koja prevodi glikolat u glioksalat pri čemu se oslobađa  $\text{H}_2\text{O}_2$ , što se dešava u procesu fotorespiracije. U peroksizomima nastaje i  $\text{O}_2^-$  aktivnošću ksantin oksidaze (Karpinski i sar., 2003; Saleem i sar., 2021). U apoplastu ROS nastaju aktivnošću enzima koji proizvode ROS kao što su oksidaze ćelijskog zida, poliamin oksidaze (PAO), peroksidaze i NADPH oksidaze koje su vezane za ćelijsku membranu (Sharma i sar., 2012; Saleem i sar., 2021). ROS se formiraju i u endoplazmatičnom retikulumu (ER), koji je mesto sinteze velikog broja proteina, gde se tokom formiranja disulfidnih mostova u proteinima, sintetiše  $\text{H}_2\text{O}_2$  u reakciji koju katalizuju enzimi ER oksidoreduktin i disulfid izomeraza (Ozgun i sar., 2014). Takođe, u ER nastaje i  $\text{O}_2^-$  pri reakciji NADPH citohrom-P450 reduktaze sa molekulom citohroma-P450 (Saleem i sar., 2021). ROS u citoplazmi nastaju dejstvom aldehid oksidaze (AO) i ksantin dehidrogenaze (XDH) (Sharma i sar., 2012; Saleem i sar., 2021).

ROS imaju dvostruku ulogu u biljnim ćelijama: pri niskim koncentracijama predstavljaju signalne molekule, dok u visokim koncentracijama ROS uzrokuju lipidnu peroksidaciju, oksidaciju proteina, oštećenje nukleinskih kiselina, inhibiciju enzima, i aktivaciju programirane ćelijske smrti (Sharma i sar., 2012; Oldenburg i Bendich, 2015; Carvalho i sar., 2018a). Za razliku od biotičkog stresa u kome ROS predstavljaju odbrambeni odgovor koji dovodi do programirane ćelijske smrti zaraženih ćelija, uloga ROS u vodnom stresu tek treba da se razjasni (Carvalho, 2008). Kako bi se održala ćelijska redoks homeostaza biljke poseduju antioksidativni sistem koji se sastoji iz enzimske i neenzimske komponente. Antioksidativni sistem učestvuje u percepciji, eliminaciji i/ili neutralizaciji visoke koncentracije ROS (Halliwell, 2006; Das i Roychoudhury, 2014; Liebthal i sar., 2018).

### 1.2.1. Reaktivne vrste kiseonika (ROS) - tipovi, izvori i osobine

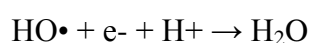
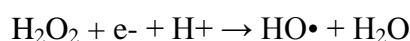
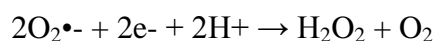
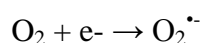
Nastanak ROS najbolje se može shvatiti kada se upozna osnovna hemijska priroda kiseonika. Atmosferski kiseonik u svom osnovnom stanju ima dva nesparena elektrona sa paralelnim spinom (triplet kiseonika), tako da kiseonik nije reaktivan u odnosu na većinu organskih molekula (**Slika 8**). Molekul kiseonika ne može da reaguje sa dvovalentnim reduktantima, osim u slučaju kada ovi reduktanti poseduju dva nesparena elektrona sa paralelnim spinom, koji je suprotan spinu elektrona kiseonika. Tako je najčešći mehanizam redukcije kiseonika u biohemijskim reakcijama povezan sa prenošenjem samo jednog elektrona, što znači da molekul kiseonika mora da se aktivira pre nego što se uključi u reakcije sa organskim molekulima (**Tabela 1**).



**Slika 8.** Luisove formule tripleta kiseonika ( ${}^3\text{O}_2$ ) i ROS. Obojeni crni kružići predstavljaju sparene elektrone, dok providni kružići predstavljaju nesparene elektrone (preuzeto i modificovano iz Hasanuzzaman i sar., 2020).

Aktivacija molekula kiseonika može da se odvija na dva načina. Apsorpcijom određene količine energije, koja je dovoljna da promeni spin jednog od nesparenih elektrona, molekul kiseonika prelazi u singlet stanje ( ${}^1\text{O}_2$ ), u kome elektroni imaju suprotne spinove. Singlet kiseonik može da učestvuje u reakcijama koje uključuju istovremeni prenos dva elektrona, pa singlet kiseonik pokazuje mnogo izraženiju reaktivnost sa organskim molekulima u odnosu na svoje triplet stanje. Kod biljaka koje vrše fotosintezu dolazi često do formiranja  ${}^1\text{O}_2$  u fotosistemima, a osnovna metabolička uloga ovog reaktivnog molekula povezana je sa procesom polimerizacije lignina. Međutim,  ${}^1\text{O}_2$  se u biljkama može formirati i zbog izmena u funkcionisanju enzima ili sistema za transport elektrona, odnosno, kao rezultat metaboličkih promena u uslovima stresa (Slater i sar., 2008). Singlet kiseonika nastaje kao posledica prenosa energije sa tripletnog pobuđenog stanja hlorofila tokom fotosinteze na molekularni kiseonik ( $\text{O}_2$ ), što može dovesti do oštećenja PSII.  ${}^1\text{O}_2$  je izuzetno reaktivan radikal, sa kratkim vremenom raspada 4-100  $\mu\text{s}$ , koji može da reaguje sa različitim biološkim molekulima, dovodeći do lipidne peroksidacije (LP) membrana, oksidacije proteina i nukleinskih kiselina (Mittler, 2017). Antioksidativna jedinjenja kao što su  $\beta$ -karoten,  $\alpha$ -tokoferol mogu da ga eliminišu (Krieger-Liszkay i sar., 2008).

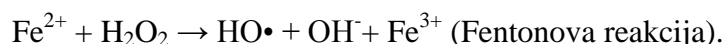
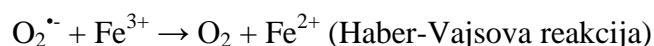
Drugi mehanizam za formiranje ROS je proces postepene, monovalentne redukcije kiseonika. Tako nastaju superoksid anjon radikal ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ), vodonik peroksid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) i hidroksil radikal ( $\text{HO}^\bullet$ ):



**Tabela 1.** Podela ROS. Tipovi, izvori i osobine (preuzeto i modifikovano iz Mittler, 2017).

ROS	Vreme poluraspada	Migracija	Način delovanja	Mesto nastanka	Način neutralisanja
<b>Singlet kiseonika (<math>^1O_2</math>)</b>	1-4 $\mu$ s	30 nm	Oksidacija lipida, proteina DNK.	Membrane, hloroplasti, jedro	Karotenoidi i $\alpha$ -tokoferol
<b>Superoksid (<math>O_2^{\cdot-}</math>)</b>	1-4 $\mu$ s	30 nm	Reaguje sa Fe-S proteinima. Dismutazom nastaje $H_2O_2$ .	Apoplast, hloroplasti, mitohondrije, peroksizomi	SOD, flavonoidi, askorbat...
<b>Vodonik peroksid (<math>H_2O_2</math>)</b>	>1ms	>1 $\mu$ m	Reaguje sa proteinima napadajući cisteinske i metioninske ostatke. Reaguje sa proteinima koji sadrže hem grupu. Reaguje sa DNK.	Peroksizomi, hloroplasti, mitohondrije, citoplazma, apoplast	CAT, POX, askorbat, glutation
<b>Hidroksil radikal (<math>OH^{\cdot}</math>)</b>	1 ns	1nm	Ekstremno reaktivan sa svim biomolekulima: DNK, RNK, lipidi i proteini.	Fentonova reakcija	Flavonoidi, prolin, askorbat

Superoksid radikal ( $O_2^{\cdot-}$ ) je najčešće prvi ROS koji se stvara u uslovima oksidativnog stresa i njegov nastanak povezan je sa elektron transportnim lancima (ETC – eng. *electron transport chains*). Najveći izvori  $O_2^{\cdot-}$  u biljnoj ćeliji su mitohondrije (kompleksi I i II) i hloroplasti (PSI i PSII) (Noctor i sar., 2006; Sharma i sar., 2012).  $O_2^{\cdot-}$  se proizvodi i u drugim organelama kao što su peroksizomi i glioksizomi, pa čak i u ćelijskom zidu (Gill i Tuteja, 2010). Superoksid radikal se klasifikuje kao umereno reaktivan radikal, sa kratkim vremenom poluraspada, malom pokretljivošću usled negativnog naelektrisanja i nemogućnošću da prolazi kroz biološke membrane (Demidchik, 2015).  $O_2^{\cdot-}$  ne može direktno da reaguje sa organskim makromolekulima, i njegova toksičnost je vezana za mogućnost da redukuje  $Fe^{3+}$  u  $Fe^{2+}$ , koji kasnije može da intereaguje sa  $H_2O_2$  stvarajući  $OH^{\cdot}$ , koji predstavlja najtoksičniji ROS (Mittler, 2017). Ove reakcije su poznate kao Haber-Vajsova (Haber-Weiss), i Fentonova reakcija (Cuypers i sar., 2016):



$H_2O_2$  i  $O_2^{\cdot-}$  se smatraju primarnim ROS, sa razlikom što  $H_2O_2$  može da dovede do ozbiljnijih oksidativnih oštećenja zbog svoje veće stabilnosti u odnosu na  $O_2^{\cdot-}$  (Sharma i sar., 2012).  $H_2O_2$  nastaje na elektron transportnim lancima mitohondrija i hloroplasta, u procesu fotorespiracije i  $\beta$ -oksidacije masnih kiselina u peroksizomima (Sharma i sar., 2012; Mittler, 2017). Poliamin oksidaze (PAOs), enzimi iz metabolizma poliamina (PA) takođe oslobađaju  $H_2O_2$  kao jedan od nusproizvoda u apoplast (Handa i sar., 2018) i verovatno u peroksizome (Hao i sar., 2018). Velika toksičnost  $H_2O_2$  može da se objasni njegovom hemijskom prirodom: nema nesparene elektrone i vreme poluraspada je dugo, pa može da prolazi kroz biološke membrane i da difunduje na veća rastojanja čime uvećava potencijalna mesta delovanja (Gupta i sar., 2015). Enzimi Kalvinovog ciklusa su

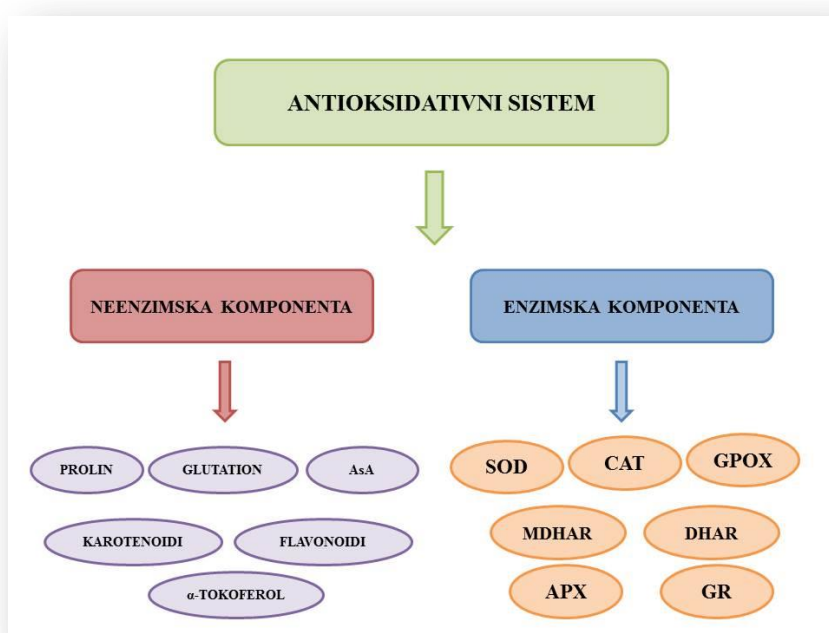
jako osetljivi na  $H_2O_2$  i visoka koncentracija ovog ROS može direktno da smanji asimilaciju  $CO_2$  (Scandalios, 2005).

Hidroksil radikal ( $OH^\cdot$ ) je najštetnija i najreaktivnija vrsta ROS, koja nastaje kao proizvod Haber-Vajsove reakcije usled interakcije superoksid radikala i  $H_2O_2$ , u prisustvu jona metala koji imaju sposobnost redukcije kao što su  $Cu^{2+}$  i  $Fe^{2+}$  (Cuypers i sar., 2016). Hidroksil radikal ima kratko vreme poluraspada, oko 1ns (Mittler, 2017) i mesta reakcije su na mestima njegovog nastanka (Sharma i sar., 2012). Njegove hemijske osobine uzrokuju veliku reaktivnost što za posledicu ima visoku toksičnost.  $OH^\cdot$  može da ošteti sve organske molekule, uprkos kratkom vremenu poluraspada, zbog nepostojanja enzimskih mehanizama antioksidativnog sistema odgovornih za njegovu degradaciju i metabolizam. Tako da nije slučajnost što visoka koncentracija  $OH^\cdot$  dovodi do programirane ćelijske smrti (Gill i Tuteja, 2010; Sharma i sar., 2012; Demidchik, 2015).

Aktivne vrste kiseonika su sposobne da reaguju sa svim tipovima biomakromolekula (Grassmann i sar., 2002). Mogu da uzrokuju lipidnu peroksidaciju, mutacije DNK, razgradnju hlorofila, inaktivaciju enzima. Na primer,  $O_2^{\cdot-}$  može da deluje na DNK i da oksiduje nukleotidne baze parove formirajući 8-okso guanin koji dovodi do transverzija G-T u G-A a koje predstavlja mutaciju DNK, dok na proteinima vrši oksidaciju triptofanskog ostatka (Radojčić, 2006). Međutim, treba naglasiti da ROS imaju značajnu ulogu u odbrani organizma od raznih patogena, u signalnom putu tokom biotičkog i abiotičkog stresa, kao i tokom apoptoze (Danon i sar., 2000).

### 1.2.2. Antioksidativni sistem

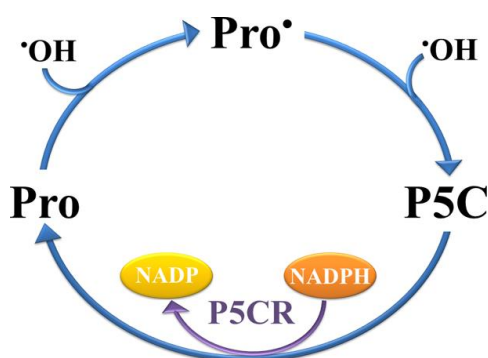
Kako bi održavale ćelijsku redoks homeostazu biljke poseduju antioksidativni sistem koji učestvuje u detekciji, eliminaciji i/ili neutralizaciji ROS, a koji se sastoji od neenzimske i enzimske komponente (**Slika 9.**) (Liebthal i sar., 2018).



**Slika 9.** Osnovne komponente antioksidativnog sistema.

Neenzimska komponenta antioksidativnog sistema uključujeveliki broj molekula i metabolita male molekulske mase kao što su: glutation (GSH), askorbinska kiselina (vitamin C), fenolna jedinjenja i prolin, koji mogu da neutrališu, uklone i/ili transformišu ROS. Na taj način omogućavaju uspostavljanje homeostaze ROS kako bi se održala ćelijska redoks ravnoteža kod biljaka koje su pod stresom (Mittler, 2017; Carvalho i sar., 2018a). Efikasnost neenzimske komponente antioksidativnog sistema zavisi od više faktora, kao što su tip stresa, dužina trajanja i intenzitet stresa, kao i od biljne vrste (Carvalho i sar., 2018b; Borges i sar., 2018).

Veliki broj autora smatra da prolin (Pro) može da deluje kao antioksidant tako što eliminiše  $\text{OH}^\bullet$  (Sharma i Dietz, 2006; Hayat i sar., 2012; Signorelli i sar., 2014). Pretpostavlja se da prolin eliminiše  $\text{OH}^\bullet$  tzv. ciklusom Pro-(P5C)-Pro (**Slika 10.**). Prolin eliminiše  $\text{OH}^\bullet$  uklanjajući vodonikov atom na C5, zatim dolazi do uklanjanja još jednog vodonikovog atoma čime se eliminiše još jedan  $\text{OH}^\bullet$ , nastaje P5C od koga ponovo nastaje Pro zahvaljujući P5CR/NADPH enzimskom sistemu (Signorelli i sar., 2014).



**Slika 10.** Pro-P5C-Pro ciklus (preuzeto iz Signorelli i sar., 2014).

Glutation (GSH) je tripeptid koji može hemijski da reaguje sa  $\text{O}_2^\bullet$ ,  $\text{OH}^\bullet$  i  $\text{H}_2\text{O}_2$  i tako funkcioniše kao direktni „čistač“ radikala, a takođe može biti i kofaktor određenih antioksidativnih enzima (Sharma i sar., 2012). GSH je neophodan i za regeneraciju askorbinske kiseline, s obzirom da je supstrat za dehidroaskorbat reduktazu (DHAR) (Foyer i Noctor, 2005). Odnos između redukovanog GSH i oksidovanog glutaciona (GSSG), koji se sakuplja prilikom reakcije GSH sa različitim oksidansima, pokazuje u kakvom je redoks stanju ćelija. Ako je odnos GSH/GSSG visok, glutation je redukovan (GSH), nivo oksidativnog stresa je nizak. Ukoliko je odnos GSH/GSSG visok, glutation je oksidovan (GSSG) a ćelija, odnosno organizam je u stanju oksidativnog stresa (Gill i Tuteja, 2010).

Askorbinska kiselina (AsA), poznatija kao vitamin C, predstavlja najzastupljeniji antioksidativni metabolit u biljnim ćelijama (Smirnoff, 2008). Može direktno da reaguje sa različitim ROS molekulima, neutrališući toksičan efekat  $^1\text{O}_2$ ,  $\text{O}_2^\bullet$  i  $\text{OH}^\bullet$ , a može da bude i donor elektrona u enzimskim reakcijama dovodeći do smanjenja  $\text{H}_2\text{O}_2$  regujući preko askorbat peroksidaze (APX; EC 1.11.1.11) (Smirnoff, 2008; Gill i Tuteja, 2010; Sharma i sar., 2012). AsA se nalazi u različitim ćelijskim delovima, a najzastupljenija je u hloroplastima 30-40% (Gill i Tuteja, 2010).

Karotenoidi predstavljaju klasu lipofilnih jedinjenja i najzastupljeniji su pigmenti u prirodi (Nisar i sar., 2015). Podeljeni su na dve klase: prvu klasu čine karoteni u koje spadaju npr.  $\beta$ -karoten i likopen, a drugu klasu čine ksantofili kao što su lutein i zeaksantin (Havaux, 2014). Karotenoidi imaju primarnu fotoprotektivnu funkciju u hloroplastu. Kao pigmenti koji ulaze u antena komplekse, u bliskoj su vezi sa ekscitiranim hlorofilom. Prilikom vodnog stresa energija pobuđenog hlorofila prelazi na karotenoid koji ne može da pređe u pobuđeno stanje, već otpušta

energiju kao toplotu. Na taj način se skraćuje vreme života singleta hlorofila, ne dolazi do stvaranja  $^1\text{O}_2$  čime se sprečava produkcija ROS i nema neželjenih efekata. Ovaj proces se naziva termalno rasipanje energije (Nešković i sar., 2010). U optimalnim okolnostima spoljašnje sredine za datu biljnu vrstu, karotenoidi koji su sastavni deo antena pigmenta PSI i PSII, apsorbuju talasne dužine od 400-550 nm i tu energiju prenose na hlorofile pa predstavljaju pomoćne fotosintetske pigmente. Karotenoidi imaju i strukturnu ulogu jer su značajna komponenta neophodna za stabilnost i izgradnju PSI (Gill i Tuteja, 2010).

Flavonoidi su klasa sekundarnih metabolita i pripadaju grupi fenolnih jedinjenja koje proizvode samo biljke (Agati i Tattini, 2010; Pollastri i Tattini, 2011). Antioksidativni kapacitet flavonoida je posledica njihove direktne interakcije sa ROS (najčešće  $^1\text{O}_2$  i  $\text{H}_2\text{O}_2$ ), ali i mogućnosti da budu supstrati različitim peroksidazama (Pourcel i sar., 2007).

$\alpha$ -tokoferol predstavlja najzastupljeniji izomer tokoferola, i ima najveću antioksidativnu aktivnost (Blokina i sar., 2003; Foyer i Noctor, 2003). Naročito je aktivan u tilakoidnim membranama gde direktno reguluje sa  $^1\text{O}_2$  i  $\text{OH}^\cdot$ , a takođe i sa nekim lipidnim radikalima nastalim oksidacijom polinezasićenih masnih kiselina, čime sprečava LP (lipidnu peroksidaciju).

Zajedno sa neenzimskim komponentama antioksidativnog sistema, enzimske komponente pružaju kompleksan zaštitni mehanizam koji održava ROS homeostazu kako bi se izbegla oksidativna oštećenja biljnih ćelija i kako bi se omogućilo razviće biljaka (Mittler, 2017). Enzimski deo antioksidativnog sistema čine: superoksid dismutaze (SOD; EC 1.15.1.1), katalaze (CAT; EC 1.11.1.6), askorbat peroksidaze (APX; E.C.1.1.1.11.1), monodehidroaskorbat reduktaze (MDHAR; E.C.1.6.5.4), dehidroaskorbat reduktaze (DHAR; M.C.1.8.5.1), glutation reduktaze (GR; E.C.1.6.4.2) i gvajakol peroksidaze (GPOX; EC 1.11.1.7).

Superoksid-dismutaza (SOD; 1.15.1.1) je enzim kojije univerzalno rasprostranjen u aerobnim organizmima, gde predstavlja prvu liniju odbrane protiv oksidativnog stresa (Gratão i sar., 2015). SOD katalizuje dismutaciju  $\text{O}_2^{\cdot-}$  u  $\text{H}_2\text{O}_2$  i molekularni kiseonik. Na taj način vrši detoksifikaciju  $\text{O}_2^{\cdot-}$  i reguliše nivoe  $\text{O}_2^{\cdot-}$  i  $\text{H}_2\text{O}_2$ , onemogućavajući toksičnost povezanu sa  $\text{O}_2^{\cdot-}$  (Abouzari i Fakheri, 2015). SOD ima mogućnost da reguliše proizvodnju  $\text{OH}^\cdot$  koji nastaje u Fentonovoj reakciji usled uklanjanja  $\text{O}_2^{\cdot-}$  (Gupta i sar., 2018). SOD se klasifikuje kod viših biljaka u tri klase na osnovu tipa metala koji se nalazi u aktivnom centru enzima: Cu/ZnSOD, MnSOD i FeSOD (Perry i sar., 2010; Sharma i sar., 2012). FeSOD i MnSOD su po strukturi mnogo sličniji, dok Cu/ZnSOD ima dva metalna jona u svojoj strukturi, i u odnosu na druge dve klase razlikuje se po hemijskim i fizičkim osobinama (Scandalios, 2005). Svi SOD izoenzimi su kodirani genima jedarne DNK i nakon translacije se transportuju do ciljnih ćelijskih organela (Pan i sar., 2006). Smatra se da je kod biljaka najzastupljenija Cu/ZnSOD izoforma, iako broj i zastupljenost izoenzima zavisi od biljne vrste i uslova sredine (Gill i Tuteja, 2010). SOD izoenzimi se nalaze u različitim delovima ćelije: Cu/ZnSOD je generalno prisutan u citoplazmi, hloroplastima, peroksisomima i apoplastu; MnSOD je obično prisutan u mitohondrijalnom matriksu, a FeSOD se najčešće nalazi u hloroplastima (Gill i Tuteja, 2010).

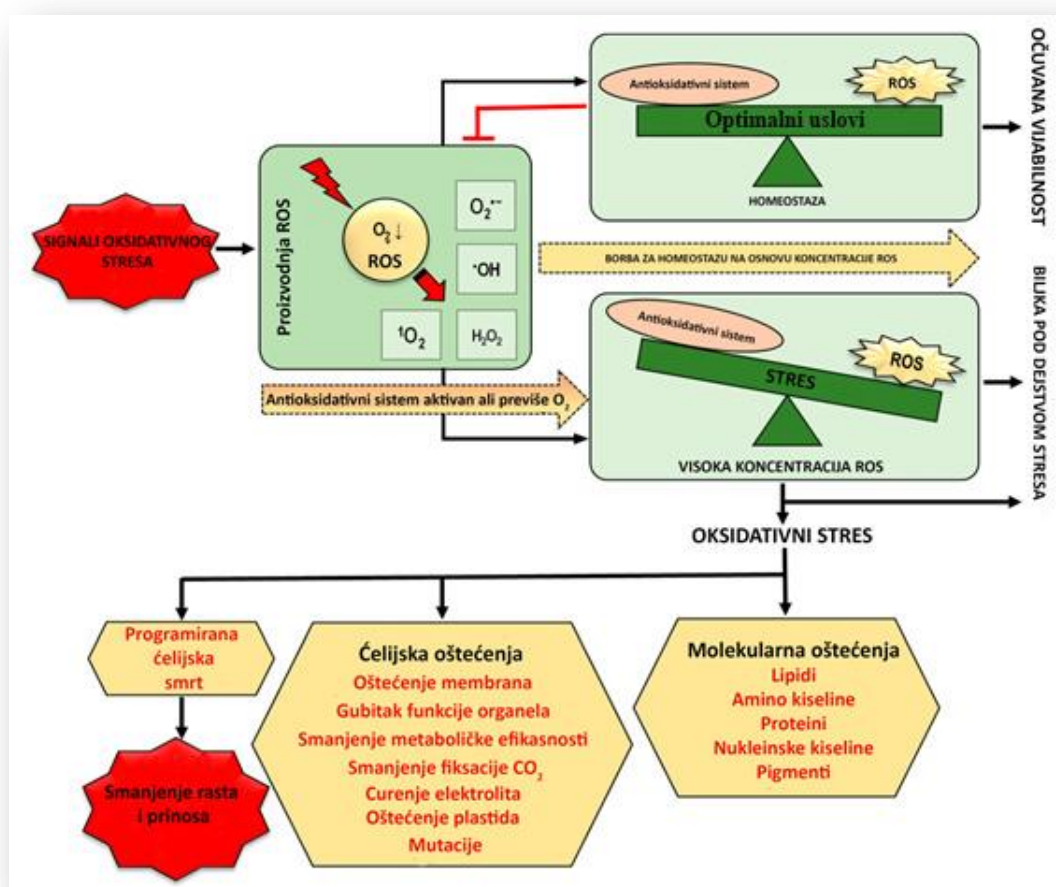
Peroksidaze predstavljaju grupu različitih enzima koji su prisutni u biljnim ćelijama i učestvuju u unutarćelijskoj detoksifikaciji  $\text{H}_2\text{O}_2$  oksidacijom različitih hemijskih supstrata (Bela i sar., 2015). Pored uloge u antioksidativnoj odbrani, peroksidaze su uključene i u druge ćelijske procese kao što su kontrola rasta ćelija, mehanizmima odbrane protiv patogenih infekcija i imaju bitnu ulogu u metabolizmu auksina i etilena (Cosio i Dunand, 2009). Gvajakol-peroksidaze (GPOX) su enzimi koji se nalaze kod svih organizama, dok su u biljkama najčešće prisutni u vakuolama, citoplazmi i ćelijskom zidu (Sharma i sar., 2012). Kao i ostale peroksidaze, GPOX reguliše nivo unutarćelijskog  $\text{H}_2\text{O}_2$  koristeći različita organska jedinjenja kao supstrate, kao što su npr. gvajakol ili pirogalol (Gill i Tuteja, 2010). Pored uloge u antioksidativnoj odbrani, GPOX

učestvuju u još nekoliko bitnih biosintetičkih puteva, kao što su lignifikacija ćelijskog zida, katabolizam indolsirćetne kiseline i biosinteza etilena (Sharma i sar., 2012; Soares i sar., 2019).

Katalaze su enzimi koji se sastoje iz četiri subjedinice od kojih svaka sadrži hem prostetičku grupu, prisutni su kod skoro svih organizama i prvi je antioksidativni enzim koji je otkriven i funkcionalno okarakterisan (Sharma i sar., 2012). Katalaze su odgovorne za detoksifikaciju  $H_2O_2$  u ćeliji i prvo ga u  $H_2O$  i  $O_2$ . U biljnim ćelijama CAT se nalaze na mestima stvaranja  $H_2O_2$ , najčešće u peroksisomima (Soares i sar., 2019). Podeljene su na tri klase u odnosu na mesto delovanja: klasa I se nalazi u fotosintetičkom tkivu; klasa II se uglavnom nalazi u vaskularnom tkivu, a klasa III je prisutna u semenima i u ranim fazama razvića klijanaca (Soares i sar., 2019). Aktivnost katalaza može da se inhibira sa  $O_2^{\cdot-}$  pa se često dešava da su CAT neaktivne kada je koncentracija  $O_2^{\cdot-}$  visoka (Iannone i sar., 2015; Borges i sar., 2018., Soares i sar., 2019).

### 1.2.3. Posledice oksidativnih oštećenja

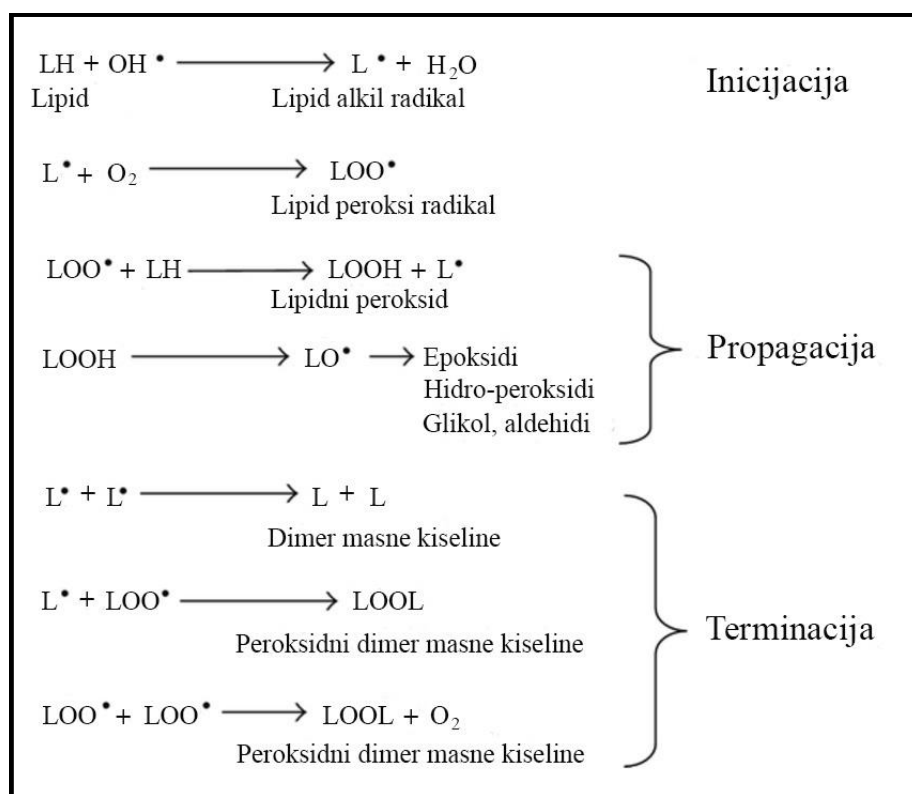
ROS molekuli su izuzetno reaktivni i mogu da reaguju sa svim organskim molekulima (proteini, nukleinske kiseline, lipidi i ugljenihidrati). Ukoliko ćelijski odbrambeni odgovor nije snažan da se izbori sa intenzivnom proizvodnjom ROS, dolazi do oksidacije lipida i proteina, inhibicije enzima, citogenotoksičnosti što na kraju dovodi do programirane ćelijske smrti (Slika 11) (Gill i Tuteja, 2010; Sharma i sar., 2012; Mittler, 2017).



**Slika 11.** Posledice oksidativnog stresa kod biljaka (preuzeto i modifikovano iz Hasanuzzaman i sar., 2020).



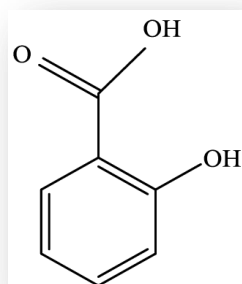
Lipidna peroksidacija (LP) predstavlja kaskadu biohemijskih reakcija koja započinje reakcijom ROS sa nezasićenim masnim kiselinama (**Slika 12.**) koje se nalaze u citoplazmatičnim membranama ili membranama organela. Lipidna peroksidacija ugrožava integritet, fluidnost i selektivnost membrana stvarajući lipidne radikale koji uvećavaju oksidativna oštećenja (Gil i Tuteja, 2010; Sharma i sar., 2012; Anjum i sar., 2015; Halliwell i Gutteridge, 2015; Wang i sar., 2017). Lipidna peroksidacija obuhvata tri faze: inicijaciju, propagaciju i terminaciju. U toku inicijacije lipidne peroksidacije, različiti ROS (najčešće OH<sup>•</sup>, i O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) vezuju H atom iz polinezasićenog lanca masnih kiselina, formirajući lipid alkil radikal (Anjum i sar., 2015). Lipid alkil radikal može da reaguje sa molekularnim kiseonikom stvarajući lipid peroksi radikal koji uklanja vodonikove atome lateralnih lanaca susednih polinezasićenih masnih kiselina (faza II – propagacija LP). U fazi terminacije dolazi do sjedinjavanja dva radikala čime se prekida reakcija, ali nastali produkti mogu biti reaktivni sami po sebi. Lipidni peroksid se može transformisati u nekoliko hemijski aktivnih jedinjenja kao što su MDA (malondialdehid), alkani, lipidni epoksidi i alkoholi (Gill i Tuteja, 2010; Sharma i sar., 2012). Alkoksi radikal (RO<sup>•</sup>), peroksi radikal (ROO<sup>•</sup>), lipidni hidroperoksidi (ROOH), toksični aldehidi (kao što je MDA) predstavljaju nove ROS koji stupaju u reakciju sa lipidima pospešujući fazu propagacije LP. Oni dolaze u kontakt i sa ostalim molekulima: proteinima, nukleinskim kiselinama i šećerima, dovodeći do njihove oksidacije, fragmentacije, kao i do nastanka lipooksidacijskih i glikozilacijskih produkata (Anjum i sar., 2015). LP se smatra znakom da je došlo do oksidativnog oštećenja biljne ćelije. Intenzitet LP se procenjuje kvantifikacijom proizvoda lipidne peroksidacije, odnosno kvantifikacijom MDA (Soares i sar., 2019).



**Slika 12.** Lipidna peroksidacija u ćelijskim membranama biljaka – potencijalni izvor ROS kod biljaka (preuzeto i modifikovano iz Gill i Tuteja, 2010).

### 1.3. Salicilna kiselina

Salicilna kiselina (SA) je fenolno jedinjenje koje učestvuje u regulaciji rastenja i razvića biljaka, kao i u njihovom odgovoru na variranje biotičkih i abiotičkih faktora stresa (**Slika 13.**) (Khan i sar., 2015).



**Slika 13.** Struktura salicilne kiseline (sinonim: orto-hidroksi benzoeva kiselina):  $C_6H_4(OH)CO_2H$ .

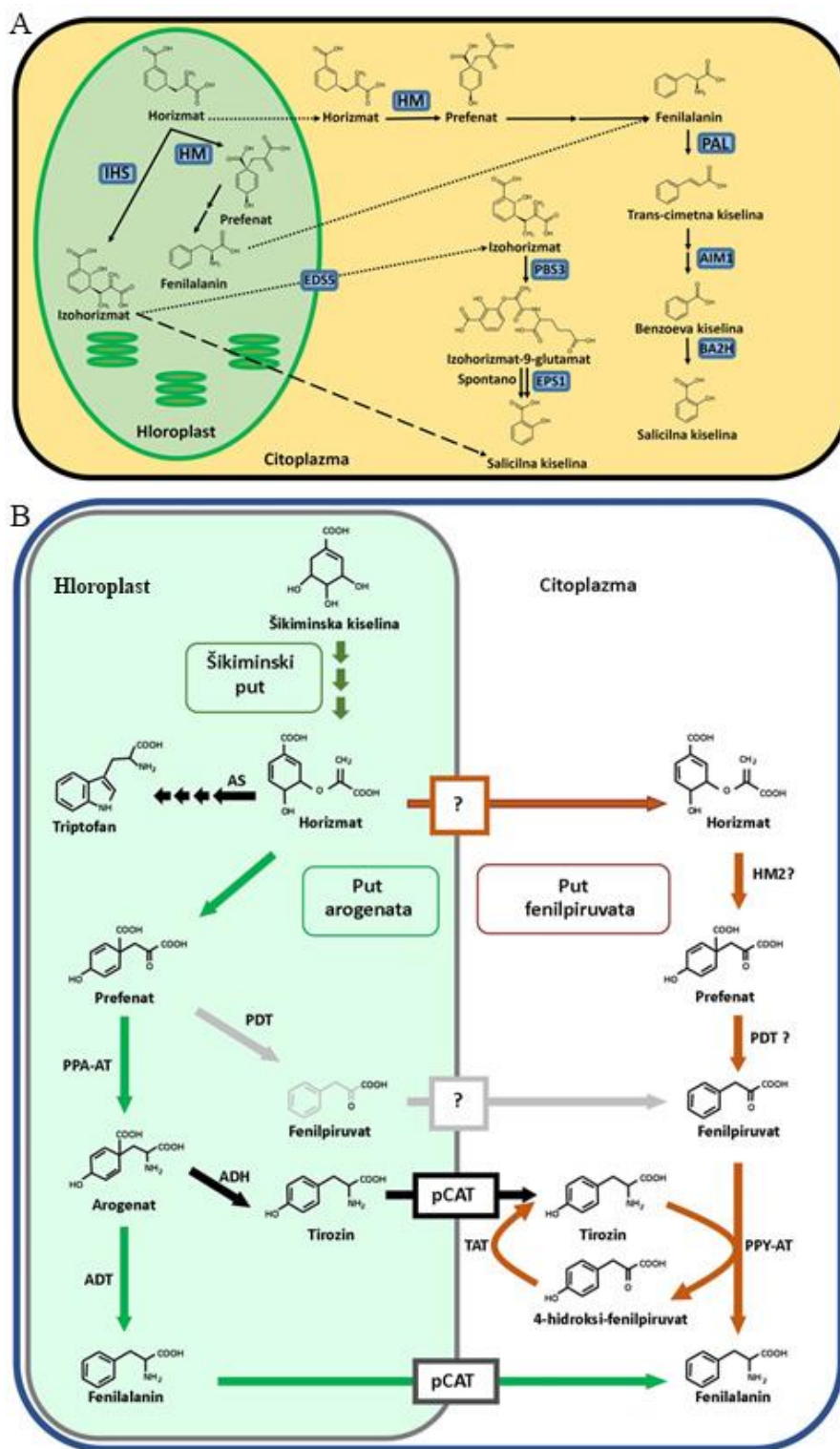
SA učestvuje u regulaciji bitnih fizioloških procesa kao što su: fotosinteza, metabolizam azota, metabolizam Pro, proizvodnja glicinbetaina, aktivacija antioksidativnih sistema. SA učestvuje i u održavanju vodnog balansa biljaka pri vodnom stresu (Miura i Tada, 2014; Khan i sar., 2015). Prema literaturnim podacima SA se može primeniti na biljkama: potapanjem semena u SA, dodavanjem SA u hranljivi rastvor ili prskanjem listova, a dovodi do aktivacije mehanizama otpornosti na abiotički stres (Khan i sar., 2015). Uticaj SA na biljke zavisi od biljne vrste, stadijuma razvića biljke, primenjene koncentracije i načina primene. Obično, primena SA u nižim koncentracijama utiče povoljno na biljne fiziološke procese koji su SA posredovani, dok primena SA u visokim koncentracijama ima negativno dejstvo na iste fiziološke procese (Khan i sar., 2015). Utvrđeno je da SA aktivira nekoliko gena odgovornih za sintezu proteina toplotnog stresa, antioksidativnih enzima, kao i enzima koji učestvuju u sintezi sekundarnih metabolita kao što su sinapil alkoholna dehidrogenaza, cinamil alkoholna dehidrogenaza (Jumali i sar., 2011; Khan i sar., 2015).

#### 1.3.1. Biosinteza i metabolizam SA

SA je prirodni derivat cimetne kiseline, međuprodukt u putu šikiminske kiseline u kojem nastaje veliki broj fenolnih jedinjenja. Sinteza SA u biljkama se vrši preko dva biosintetska puta PAL i IHS (**Slika 14.**) koji započinju od horizmata kao primarne komponente za sintezu SA. PAL biosintetski put se označava po enzimu fenilalanin amonijum lijaza, dok je IHS oznaka za izohorizmat sintazu (Lefevere i sar., 2020). Značaj ova dva biosintetska puta je različit kod različitih biljaka. Kod *A. thaliana* sinteza SA je značajnija preko IHS puta, PAL biosintetski put je dominantniji kod pirinča, dok su kod soje podjednako zastupljena oba puta (Lefevere i sar., 2020).

IHS biosintetski put za sintezu SA počinje od horizmata (**Slika 14.A**) koji se konvertuje u izohorizmat (IH) pomoću IHS (Catinot i sar., 2008; Hao i sar., 2018). Ovaj biosintetski put je prvi put otkriven kod bakterija. Broj IHS homologa je ograničen u okviru biljnog genoma i većina biljaka ima jednu ili dve genske kopije. Nastanak SA iz IH je kod biljaka je najverovatnije rezultat enzimske konverzije ali tačan biohemijski put još uvek nije poznat (Rekhter i sar., 2019; Torrens-

Spence i sar., 2019). IHS biosintetskim putem se kod biljaka sintetiše SA pri odbrani od patogena, što je i utvrđeno kod *A. thaliana* (Nawrath i Metraux, 1999). Međutim, u biljkama je do danas identifikovan samo jedan gen koji kodira za enzim ovog biosintetskog puta i to za fenilpiruvat aminotransferazu (PPY-AT) koja vrši konverziju fenilpiruvata u fenilalanin (Slika 14.B) (Qian i sar., 2019).



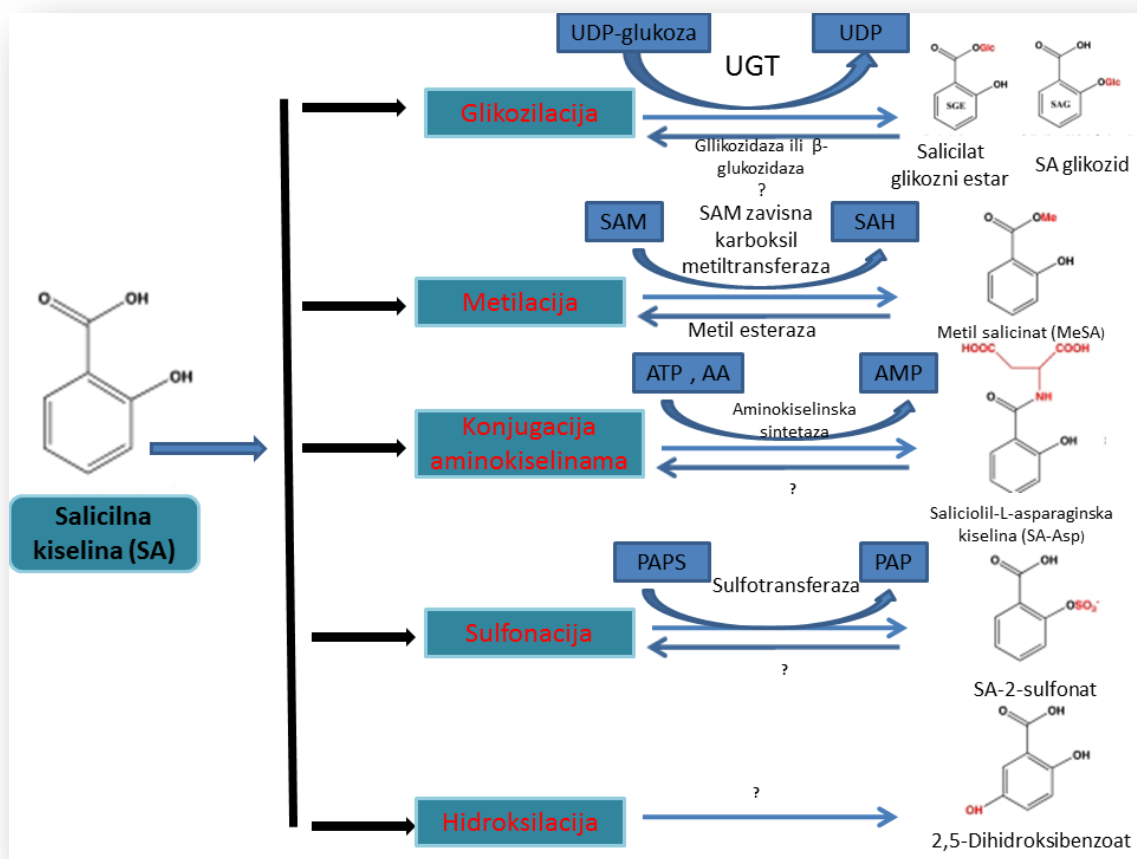
**Slika 14.** Shema potencijalnih puteva biosinteze SA u biljkama. A. Pune linije prikazuju puteve konverzije SA, istačkane linije predstavljaju puteve transporta iz hloroplasta do citoplazme, linija prezentovana isprekidanim crticama ukazuje na alternativni nepoznati put biosinteze SA.

Upitnikom su obeleženi neidentifikovani proteini. Enzimi su predstavljeni plavim kvadratićima i obeleženi skaćenicama: IHS – izohorizmat sintaza; HM – horizmat mutaza; PAL – fenilalanin amonijum lijaza; AIM1 – abnormal inflorescence meristem1; BA2H – benzoil-2-hidroksilaza; EDS5 – eng. *Enhanced Disease Susceptibility 5*; PBS3 – eng. *avrPphB Susceptible 3*; EPS1 – eng. *Enhanced Pseudomonas Susceptibility* (preuzeto i modifikovano iz Lefevere i sar., 2020). B. Pretpostavljeni načini biosinteze fenilalanina u biljkama. Enzimi i transporteri koji još uvek nisu poznati su obeleženi upitnikom ili sivim pravougaonicima. ADH – arogenat dehidrogenaza, ADT – arogenat dehidrataza, AS – antranilat sintaza, pCAT – plastidni transporter aminokiselinskih katjona, HM – horizmat mutaza, PDT – prefenat dehidrataza, PPA – AT-prefenat aminotransferaza, PPY – AT-fenilpiruvat aminotransferaza, TAT – tirozin aminotransferaza (preuzeto i modifikovano iz Qian i sar., 2019).

Horizmat mutaza (HM) je jedan od ključnih enzima biosinteze SA i odgovorna je za konverziju horizmata u prefenat (**Slika 14.A**). Na **Slici 14.B** prikazani su pretpostavljeni načini i mesta biosinteze fenilalanina (Phe) čijom enzimatskom konverzijom se dobija SA u PAL biosintetičkom putu. Nije poznato da li fenilalanin nastaje u hloroplastima i/ili citoplazmi pošto postoje i hloroplastne i citoplazmatične HM. U hloroplastima prefenat delovanjem prefenat aminotransferaze (PPA-AT) prelazi u arogenat. Arogenat je supstrat za arogenat dehidrogenazu (ADH) pri čemu nastaje tirozin (Tyr) ili za arogenat dehidratazu (ADT) kada nastaje Phe. U citoplazmi prefenat najverovatnije prvo dekarboksilacijom/dehidratacijom prelazi u fenilpiruvat koji zatim prelazi u Phe transaminacijom (**Slika 14.B**) (Qian i sar., 2019). PAL konvertuje Phe u trans-cimetnu kiselinu (tCA) i okarakterisan je u brojnim biljnim vrstama (Reichert, 2009). Enzim koji katalizuje sledeću reakciju, konverziju trans-cimetne kiseline (tCA) u benzoevu kiselinu (BA), je AIM1 (eng. *abnormal inflorescence meristem1*). Poslednji korak u konverziji BA u SA je katalizovan verovatno benzoil-2-hidroksilazom (BA2H), enzimom koji još nije identifikovan, najverovatnije zbog velikog broja enzima koji bi mogli da katalizuju datu reakciju (**Slika 14.A**) (Lefevere i sar., 2020).

### 1.3.2. Modifikacije SA

Nakon sinteze u biljnim ćelijama, SA se može modifikovati glikozilacijom, metilacijom, sulfonacijom, konjugacijom aminokiselinama i hidroksilacijom (**Slika 15.**). Modifikacije najčešće inaktiviraju SA i služe za privremeno skladištenje SA (Ding i Ding, 2020). SA se glikozilacijom deaktivira i omogućava se skladištenje većih količina u vakuoli. Metilacija deaktivira SA, pri čemu nastaje metil salicinat (MeSA) koji lakše prolazi kroz ćelijsku membranu pa se na taj način omogućava transport SA na veću udaljenost u odnosu na mesto sinteze. Aminokiselinskom konjugacijom najverovatnije dolazi do razgradnje SA (Dempsey i sar., 2011).



**Slika 15.** Modifikacije SA (preuzeto i modifikovano iz Dempsey i sar., 2011).

SA može da se konvertuje u dva derivata glikozilacijom (**Slika 15.**): SA glikozid (SAG: SA 2-O- $\beta$ -D-glikozid) i SGE (Salicilat glikozni estar). Kod biljaka je češća glikozilacija u kojoj nastaje SAG i do nje dolazi konjugacijom hidroksilne grupe SA glukozom. SGE nastaje ređe i to konjugacijom karboksilne grupe SA glukozom. SAG i SGE su neaktivne forme SA koje se skladište u vakuoli i smatra se da hidrolizom mogu ponovo dati SA kada je neophodno da se koncentracija SA u ćeliji poveća. Sam mehanizam hidrolize i enzimi koji u njima učestvuju još uvek nije poznat. Kod biljaka najverovatnije u tome učestvuje još uvek neidentifikovana hidrolaza glukoze ili  $\beta$ -glikozidaza (Ding i Ding, 2020).

Karboksilna grupa SA može biti metilovana pomoću S-adenozil-L-metionin zavisne metiltransferaze (SAM-MT) kod biljaka, čime nastaje metil salicilat (MeSA) (**Slika 15.**). Slično kao i glikozilacija, metilacija inaktivira SA, ali MeSA ukoliko je neophodno može da se brzo konvertuje u aktivan oblik pomoću metil-trantsferaza (MES) (Vlot i sar., 2008, Park i sar., 2007).

SA može da se modifikuje konjugacijom aminokiselinama (AA konjugacija). Familija glikozid hidrolaza (GH3) vrši konjugaciju aminokiselina različitih biljnih regulatora rastenja sa različitom preferencijom prema određenim aminokiselinama. Kod biljaka je konjugacija SA sa asparaginskom kiselinom (Asp) najčešća i kao proizvod se dobija saliciol-L-aspartat (SA-Asp) (Bourne i sar., 1991). Konjugacija SA aminokiselinama takođe inaktivira SA.

Sulfonacijom SA nastaje SA-2-sulfonat (**Slika 15.**). Ova metabolička modifikacija katalizovana je sulfotransferazama (SOT). Donor sulfonatne grupe je obično koenzim 3'-fosfoadenozin-5'-fosfosulfat (PAPS) i krajnji proizvod reakcije, pored SA-2-sulfonata, je i 3'-

fosfoadenozin-5'-fosfat (PAP) (Klein i Papenbrock., 2004). SA-2-sulfonat i drugi sulfonatni derivati salicilne kiseline najverovatnije imaju ulogu u ćelijskoj signalizaciji što je zaključeno na osnovu mutanata *A. thaliana* kod kojih se SOT ne sintetiše (Günel i sar., 2019).

Hidroksilacijom SA nastaju: 2,3-dihidroksi-benzoeva kiselina (2,3-DHBA) i 2,5 dihidroksi-benzoeva kiselina (2,5-DHBA). SA može u *in vitro* uslovima da neutrališe slobodne hidroksil radikale bez posredstva enzima formirajući jednu od dve navedene forme dihidroksi-benzoeve kiseline (Chang i sar., 2008; Zhang i sar., 2017). Ove reakcije su reverzibilne. Obe DHBA se mogu inaktivirati glikozilacijom sauridin difosfat-glikotransverazom (UGT89A2) (Chen i Li., 2017).

Biosinteza SA u biljnim ćelijama u optimalnim koncentracijama je neophodna za normalno funkcionisanje fizioloških i biohemijskih procesa koji su pod kontrolom SA, ali dugotrajna visoka koncentracija SA u citoplazmi biljnih ćelija može imati štetan uticaj. Zato je neophodan mehanizam koji reguliše i održava optimalnu koncentraciju SA u biljkama. SA se akumulira pri stresu *de novo* biosintezom i najverovatnije aktiviranjem neaktivnih formi. Ekspresija gena koji su zaduženi za biosintezu SA je indukovana faktorima stresa (Seguel i sar., 2018).

### 1.3.3. Uticaj SA na fiziološke procese biljaka

SA kao endogeni regulator rastenja (fitohormon) utiče na regulaciju različitih procesa u biljkama kao što su rast, razviće, transport jona i fotosinteza. Zajedno sa drugim biljnim hormonima SA doprinosi očuvanju stope rasta, odbrani od biotičkih i abiotičkih faktora stresa (Bidabadi i sar., 2012).

SA se intenzivno proučava zbog njenog uticaja na: indukciju cvetanja kod zeljastih vrsta (Martin-Mex i sar., 2005; Hegazi i El-Shrayi, 2007), klijanje i formiranje klijanaca (Shakirova i sar., 2003), stimulaciju rastenja korena (Singh i Usha, 2003), zatvaranje stoma i smanjenje transpiracije (Hayat i sar., 2012), regulaciju gravitropizma, metabolizam azota, senescenciju (Hussein i sar., 2007).

Uspešna reprodukcija skrivenosemenica oslanja se na cvetanje u odgovarajućem delu sezone i odgovarajućem razvojnom stupnju (Araki, 2001; Martinez i sar., 2004). Da bi biljke cvetale u pravo vreme u sezoni, postoji velika i pažljivo regulisana mreža signalnih puteva. Primećeno je da biljke koje su izložene uslovima stresa mogu ranije da pokrenu proces cvetanja. Veliki broj faktora može da dovede do ranijeg cvetanja: infekcija patogenima, suša, ekstremne temperature i zračenje. Ovi faktori stresa dovode do povećanja koncentracije nekoliko metabolita kao što su etilen, ABA i SA (Martinez i sar., 2004). Smatra se da SA može da reguliše cvetanje kod biljaka, ali tačan mehanizam još uvek nije poznat. Primena SA je dovela do indukcije cvetanja kod brojnih biljnih vrsta kao što su krastavac, paradajz (Larqué-Saavedra i Martin-Mex, 2007), *Carica papaya* (Martin-Mex i sar., 2005), *Lemna* (Cleland i Ajami, 1974). Različite biljne vrste kao što je ukrasna *Sinningia speciosa* cvetale su ranije u poređenju sa netretiranom kontrolom kada su listovi isprskani rastvorom SA (Martin-Mex i sar., 2005). SA je ubrzala otvaranje cvetova kod *Onicidium* (Hew, 1987). Kod krastavca i paradajza plod je bio značajno veći kod biljaka koje su prskane niskom koncentracijom SA (Larque-Saavedra i Martin-Mex, 2007). Folijarna primena SA kod soje takođe je dovela do poboljšanja cvetanja (Kumar i sar., 1999; Hayat i sar., 2010).

### 1.3.4. Uloga SA u odgovoru na biotičke faktore stresa

SA je biljni regulator rastenja koji ima važnu ulogu u procesu prenosa signala i odgovoru na virusnu, bakterijsku i gljivičnu infekciju kod mnogih biljnih vrsta (Ding i Ding, 2020). Raymond F. White je 1979 prvi primetio da SA ima uticaj na otpornost biljaka prema patogenima, tako što je tretirao duvan aspirinom (acetil-SA), a potom ga izložio mozaičnom virusu duvana (TMV, eng. *Tomato mosaic virus*) na koji je duvan inače osetljiv. Tretirani duvan je pokazao otpornost prema TMV. Ovaj rezultat ukazao je da SA kod biljaka može imati ulogu u povećanju otpornosti pri infekciji patogenima (White, 1979). Ustanovljeno je kod kultivara duvana koji ima veću otpornost prema TMV, da sintetiše veće količine endogene SA i proteina koji su povezani sa patogenezom, neposredno nakon virusne infekcije (Malamy, 1990). Kod krastavca je takođe utvrđeno da kod kultivara koji imaju povećanu otpornost prema TMV dolazi do akumulacije SA u floemu u visokoj koncentraciji neposredno nakon infekcije (Métraux i sar., 1990). Obe studije su pokazale da endogena SA ima ulogu signala koji pokreće odbranu i otpornost biljaka prema patogenima.

Važan segment odgovora biljaka na biotički stres je sistemski stečena otpornost (SAR – eng. *Systemic Acquired Resistance*). Ovaj termin prvi put je upotrebio Frank Ross 1961. god., kako bi opisao indukovanu sistematsku otpornost duvana prema TMV. Infekcija biljke na jednom mestu je bila je dovoljna da ograniči rast i širenje velikog broja patogena koji su inokulisani na drugom mestu (u odnosu na primarno mesto infekcije) (Ross, 1961). SAR se obično javlja nakon hipersenzitivnog odgovora i može trajati mesecima. Smrt inficiranih ćelija i mehaničko izolovanje patogena u jednom delu biljke (hipersenzitivni odgovor) indukuje u drugim delovima biljke reakcije koje će dovesti do aktivacije gena koji kodiraju za PR proteine i fitoaleksine. PR proteini se indukuju nakon infekcije patogenima, ili nakon mehaničkih povreda biljke koje nanose insekti. Oni mogu biti različiti proteolitički enzmi koji nepovoljno utiču na digestivni trakt insekata ili enzimi koji dovode do jačanja ćelijskog zida, te na taj način štite biljku od dalje infekcije.

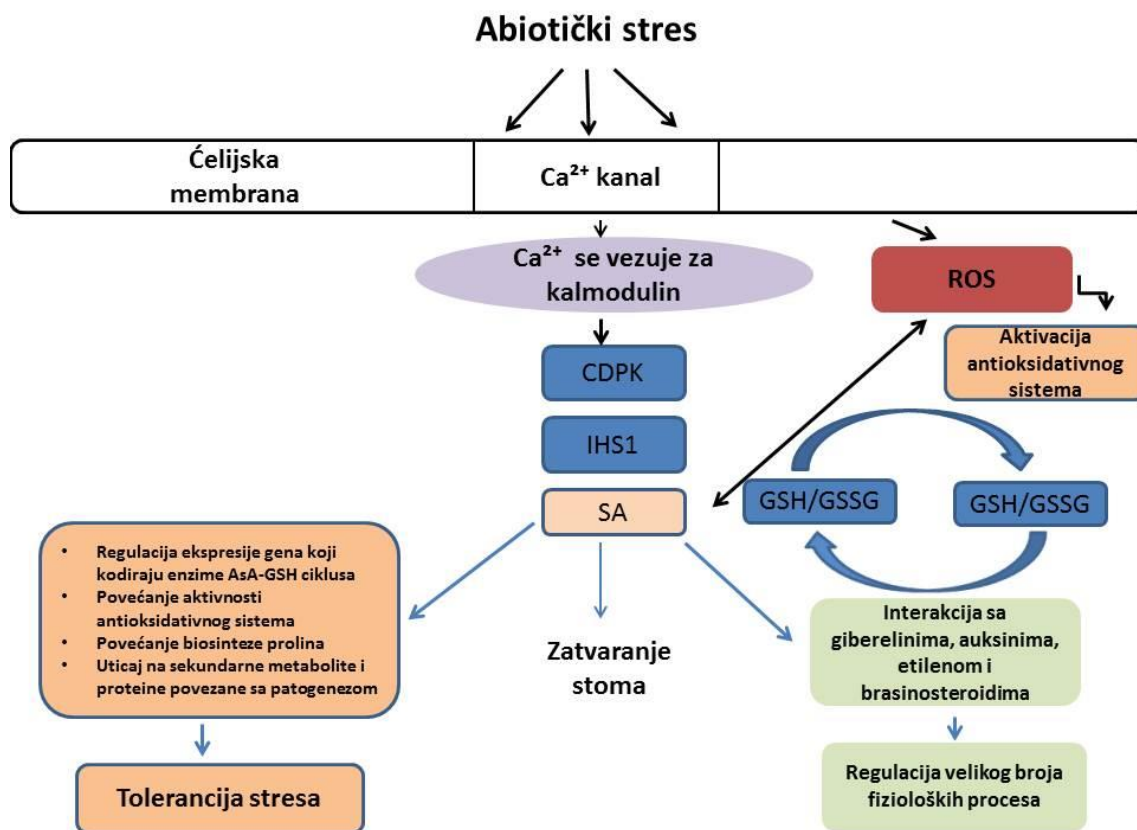
SA verovatno predstavlja hemijski SAR signal, jer koncentracija SA naglo raste nakon infekcije. Biljno tkivo koje je oštećeno ili inficirano patogenom reaguje tako što indukuje povećanje koncentracije SA koja potom pokreće signalne reakcije, stimuliše ekspresiju PR gena i aktivnost PR proteina. U eksperimentima sa transgenim biljkama duvana koje su ekspimirale gene za degradaciju SA (SA hidrosilaza) nije dolazilo do SAR reakcija nakon virusne, bakterijske ili gljivične infekcije. Ovi rezultati ukazuju da je akumulacija SA esencijalna za SAR odgovor (Huang i sar., 2020; Ding i Ding, 2020).

Iako ima značajnu ulogu u SAR, SA najverovatnije nije mobilni signal koji pokreće SAR odgovor biljaka u udaljenim delovima u odnosu na primarno mesto infekcije. MeSA se smatrao SAR signalom kod duvana (Park i sar., 2007; Huang i sar., 2020), ali je utvrđeno kod *A. thaliana* da nije neophodan za SAR odgovor (Attaran i sar., 2009; Huang i sar., 2020).

### 1.3.5. SA i tolerancija na abiotički stres

SA je biljni regulator rastenja i ima ulogu u toleranciji biljaka prema abiotičkom stresu, koja se intenzivno proučava u poslednjih nekoliko decenija. Veliki broj istraživanja ukazuje da endogena sinteza SA, kao i njena egzogena primena, povećavaju toleranciju biljaka prema stresu izazvanim solima (Miura i Tada, 2014; Hasanuzzaman i sar., 2014; Nazar i sar., 2015; Tari i sar., 2015), sušom (Kang i sar., 2012; Alam i sar., 2013; Demiralay i sar., 2013; Miura i Tada, 2014), ekstremnim temperaturama (Miura i Tada, 2014; Kumar i sar., 2015; Cingoz i Gruel., 2016; Singh i sar., 2016) i drugim abiotičkim faktorima (Singh i sar., 2015; Shakirova i sar., 2016; Islam i sar., 2016).

Još uvek nisu u potpunosti razjašnjeni mehanizmi kako SA povećava toleranciju biljaka prema abiotičkim faktorima stresa. Pretpostavlja se da SA deluje tako što utiče na sintezu osmolita, vodni balans (zatvaranje stoma) i aktivnost antioksidativnog sistema (Kaur i sar., 2022) (**Slika 16.**). SA ima ulogu i u zatvaranju stoma što posredno dovodi do uticaja na efikasnost karboksilacije RuBisCO enzima, a samim tim i na fotosintezu (Kaur i sar., 2022).



**Slika 16.** Shematski prikaz mogućih mehanizama delovanja SA u indukciji tolerancije na abiotički stres (preuzeto i modifikovano iz Kaur i sar., 2022). CDPK - Ca<sup>2+</sup>/kalmodulin aktivira kalcijum/kalmodulin zavisnu kinazu, IHS - izohorizmat sintazu, ROS - reaktivne vrste kiseonika, GSH/GSSG – odnos između redukovanog i oksidovanog glutationa.

Prilikom delovanja abiotičkih faktora stresa dolazi do povećanja unutarćelijskog nivoa Ca<sup>2+</sup> koji se vezuje za protein kalmodulin. Ca<sup>2+</sup>/kalmodulin aktivira kalcijum/kalmodulin zavisnu kinazu (CDPK, eng. *Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase*) koja fosforilacijom aktivira TF kao što je CBP60g (kalmodulin vezujući transkripcioni faktor 60g). Biosinteza SA zavisna je od Ca<sup>2+</sup>, jer kalmodulin vezujući transkripcioni faktor (CBP60g) kontroliše sintezu SA preko aktivacije ekspresije gena *IHS1* koji kodira za izohorizmat sintazu, jednog od enzima u biosintetskom putu SA (Seyfferth i Tsuda, 2014; Kaur i sar., 2022) (**Slika 16.**).

Stome omogućavaju biljkama da regulišu unos CO<sub>2</sub> i transpiraciju. U uslovima vodnog stresa stome se zatvaraju i na taj način biljke smanjuju transpiraciju odnosno gubitak vode, ali pošto se tako smanjuje unos CO<sub>2</sub>, dolazi do smanjenja efikasnosti fotosinteze. Čelije zatvaračice regulišu otvorenost stoma u zavisnosti od sredinskih uslova i biljnih regulatora rastenja. ABA ima najznačajniju ulogu u regulaciji zatvaranja stoma prilikom vodnog stresa, ali pored ABA i drugi biljni hormoni su takođe uključeni u zatvaranje stoma, poput SA (Miura i Tada, 2014). Do zatvaranja stoma najverovatnije dolazi tako što vodni stres uzrokuje povećanje endogene koncentracije SA koja potom dovodi do povećanja produkcije ROS u ćelijama zatvaračicama. Egzogeno primena SA takođe povećava nivo ROS u ćelijama zatvaračicama, kao i akumulaciju



Ca<sup>2+</sup>, što dovodi do zatvaranja stoma. SA verovatno stimuliše ekstracelularnu SHAM (eng. *salicylhidroxamic acid*) – senzitivnu gvajakol peroksidazu (peroksidazu ćelijskog zida) koja dovodi do nagle akumulacije ROS u ćelijama zatvaračicama, što uzrokuje zatvaranje ulaznih jonskih kanala za K<sup>+</sup> koje će dovesti do zatvaranja stoma (Miura i Tada, 2014).

SA najverovatnije ima ulogu i u povećanju tolerancije biljaka prema vodnom stresu povećavajući sintezu osmotski aktivnih jedinjenja kao što je prolin (Khan i sar., 2015; Abbaspour i Ehsanpour, 2020; Kaur i sar., 2022). SA posredovano povećanje sinteze prolina najverovatnije se dešava tako što SA za sada nepoznatim mehanizmom utiče na povećanje sinteze enzima P5CS i  $\gamma$ -glutamil kinaze koji učestvuju u biosintetskom putu prolina i smanjuje aktivnost enzima koji vrše degradaciju prolina kao što je prolin oksidaza (Abbaspour i Ehsanpour, 2020; Kaur i sar., 2022).

SA i GSH imaju važnu ulogu u prenosu signala koji aktiviraju antioksidativni odgovor (Hasanuzzaman i sar., 2017b; Kaur i sar., 2020). Ako je endogena produkcija SA u biljkama visoka, viši je i nivo GSH, odnos GSH/GSSG je veći, redoks stanje ćelije je optimalno i nivo oksidativnog stresa je nizak (Herrera-Vásquez i sar., 2015, Kaur i sar., 2022). Blokiranje SA akumulacije dovodi do smanjenja GSH/GSSG odnosa, i smatra se da se ćelija, odnosno organizam nalazi u stanju oksidativnog stresa (Kaur i sar., 2022). Obrnuto, biljke koje su GSH deficijentne (kod kojih nema biosinteze GSH, GSH deficijentni mutanti), imaju i smanjenu sintezu IHS enzima, pa samim tim i biosintezu SA.

Zanimljivo je da H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> može da dovede do povećanja endogene količine SA u biljkama, najverovatnije jer H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> deluje kao katalizator reakcije u kojoj učestvuje BA2H, a u kojoj dolazi do konverzije benzoeve kiseline u SA (Kaur i sar., 2022). Međutim, egzogeno primenjena SA dovodi do povećanja koncentracije H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zbog mogućnosti SA da se veže direktno za CAT i APX inhibirajući njihovo dejstvo, čime se smanjuje razgradnja H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Smirnoff i Arnaud, 2019; Kaur i sar., 2022).

#### 1.3.5.1. Efekti egzogene primene SA na biljke

Višak soli u podlozi negativno utiče, direktno ili indirektno, na morfološke, fiziološke i biohemijske osobine biljaka. Kada su biljke izložene dejstvu soli, na njih deluje osmotski i jonski stres, ali i vodni i drugi stresovi koji iz njega proizilaze. Postoji veliki broj studija koje pokazuju zaštitnu ulogu SA pri delovanju stresa izazvanog solima na biljke (Arfan i sar., 2007; Tari i sar., 2015).

Kako bi pokazali da SA povećava toleranciju na stres soli Arfan i saradnici (2007) koristili su dva varijeteta pšenice (*Triticum aestivum*) koja je gajena u uslovima *in vitro*. Jedan koji je tolerantan na stres izazvan solima (S-24) i drugi koji je osetljiv na povećanu zaslanjenost medijuma (MH-97). U studiji su korišćene različite koncentracije SA (0.25-1mM) koje su dodate u hranljivi medijum, a stres izazvan solima je postignut dodatkom 150mM NaCl u hranljivi medijum. I SA i NaCl su korišćene od samog početka eksperimenta, uz postojanje kontrole (u hranljivoj podlozi nije bilo ni NaCl ni SA) a podaci su prikupljeni 30 dana nakon zasejavanja. Njihovi rezultati pokazali su da niže koncentracije SA (0,25mM) dovode do smanjenja negativnog efekta soli na masu svežih i suvih izdanaka i korenova kod tolerantnog varijeteta dok je za senzitivni bila potrebna veća koncentracija SA (0,75mM). Korišćenje egzogene SA u optimalnim koncentracijama za određenu biljnu vrstu može da poveća tolerantnost na stres izazvan solima. Međutim, u slučajevima kada se koriste visoke koncentracije SA, efekat može biti štetan i toksičan za biljku (Nazar i sar. 2015; Arfan i sar., 2007), dok jako niske koncentracije mogu imati mali ili nikakav efekat u prevazilaženju stresa izazvanog solima (Tari i sar., 2015; Horváth i sar., 2015). Koncentracija SA, način i vreme primene SA, ali i trajanje stresa soli i fiziološki status same biljke, su bitni za efekat SA u prevazilaženju stresa izazvanog solima.

Veliki broj studija je pokazao značajnu ulogu SA u povećanju tolerancije biljaka prema vodnom stresu (Hayat i sar., 2008; Farooq i sar., 2010; Bidabadi i sar., 2012; Kang i sar., 2012; Demiralay i sar., 2013; Alam i sar., 2013, Damalas, 2019).

Bosiljak (*Ocimum basilicum*) je biljka osetljiva na nedostatak vode. Utvrđeno je da pri delovanju vodnog stresa na pomenutu biljku dolazi do smanjenja mase svežih i suvih biljaka, visine biljaka, sadržaja hlorofila, RWC ali i do povećanja sadržaja prolina, dok egzogena primena SA u koncentraciji od 200 pM u uslovima vodnog stresa dovodi do povećanja mase svežih i suvih biljaka, visine biljke, fotosintetičkih pigmenata, RWC i još dodatno povećava sadržaj prolina u odnosu na biljke izložene samo vodnom stresu (Damalas, 2019).

U radu Alama i saradnika (2013) kod slačice (*Brassica juncea*) vodni stres je nametnut primenom 10 i 20% PEG tokom 48h, a listovi su prskani sa 50 μM SA. Pod dejstvom PEG došlo je do smanjenja RWC koji predstavlja pokazatelj stanja hidratisanosti biljaka, zatim povećanja koncentracije MDA, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i Pro koji ukazuju na pojavu oksidativnog stresa. Pored toga, uočeno je i smanjenje sadržaja hlorofila što ukazuje na negativan efekat vodnog stresa na fotosintezu. Primena SA u uslovima PEG nametnutog vodnog stresa dovela je do povećanja: RWC, sadržaja hlorofila, GSH, aktivnosti APX i na taj način je povećala toleranciju prema vodnom stresu.

Kod *Ctenanthe setosa* (Demiralay i sar., 2013) vodni stres je postignut potapanjem listova 4h u 2,5% PEG<sub>6000</sub> pri čemu je došlo do intenzivnog uvrtanja listova. Vodeni rastvor SA je primenjen na listove kao pretretman u trajanju od 15h. Takva primena SA je dovela je do povećanja koncentracije Pro i povećanja aktivnosti antioksidativnih enzima (SOD, APX, CAT, GPX i NAPDH oksidaze).

U studiji Kang i saradnika (2012) klijanci pšenice (*T. aestivum*) su tretirani 15% PEG, 3 dana da bi se postigli uslovi vodnog stresa. 0,5 mM SA je korišćena kao pretretman u hranljivom rastvoru, u trajanju od 3 dana, pre primene PEG, da bi se ispitao uticaj SA na vodni stres. Vodni stres je uzrokovao smanjenje rasta, a primena SA je dovela do pojačane ekspresije proteina povezanih sa tolerancijom na vodni stres, dovodeći do poboljšanja rastenja klijanaca pšenice.

Kod banane (*Musa sp.*) (Bidabadi i sar., 2012) vodni stres je postignut korišćenjem PEG, a primenjena je i SA u tri koncentracije (1, 2, 3 mM). Vodni stres je doveo do smanjenja stope proliferacije, mase suvih izdanaka, RWC i sadržaja hlorofila, dok je SA uticala pozitivno dovodeći do povećanja sadržaja prolina, smanjenja H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i MDA.

Vodni stres kod *Oryza sativa* (Farooq i sar., 2009) dovodi do povećanja H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, MDA i relativne propustljivosti membrana. Primena SA u koncentraciji od 100 mgL<sup>-1</sup> uticala je na povećanje vodnog potencijala, sintezu fenola, antocijanina i prolina, i na povećanje aktivnosti antioksidativnog sistema.

Praćen je i uticaj egzogeno primenne SA na paradajz (*Lycopersicon esculentum*) pri vodnom stresu (Hayat i sar., 2008). Usled vodnog stresa dolazi do poremećaja procesa fotosinteze, stabilnosti membrana, aktivnosti nitratne reduktaze, smanjenja RWC, povećanja sadržaja prolina, kao i povećanja aktivnosti antioksidativnih enzima (CAT, POX, SOD). Primena niske koncentracije SA (10<sup>-5</sup>M) pri uslovima vodnog stresa dovela je do značajnog poboljšanja gore pomenutih praćenih parametara.

Rezultati studije Singh i Usha (2003) pokazuju da kada se klijanci pšenice koji su izloženi vodnom stresu, tretiraju SA, dolazi do povećanja sadržaja vlažnosti (eng. *Moisture content*), povećanja mase suvih klijanaca, karboksilazne aktivnosti RuBisCo, povećanja aktivnosti SOD, kao i sadržaja ukupnih hlorofila u odnosu na klijance koji su bili izloženi samo vodnom stresu.

Temperatura je jedan od ključnih faktora koji određuje rastenje, razviće i produktivnost biljaka. Zbog globalnih klimatskih promena koje vode povećanju prosečne globalne temperature i većim temperaturnim fluktuacijama ugrožen je opstanak velikog broja biljnih i životinjskih vrsta. Ekstremne temperature uključuju visoke i niske temperature koje mogu da dovedu do ozleda biljaka. Visoke temperature predstavljaju temperature iznad temperaturnog optimuma za biljku, koje mogu da ugroze rastenje i metabolizam biljke. Jako je bitno i koliko su vremenski biljke izložene visokim temperaturama. Visoke temperature i nedostatak vode najčešće deluju sinergistički tokom toplog dela godine, izazivajući združeni stres sa još težim posledicama po biljku. Visoka temperatura utiče na veliki broj fizioloških procesa kod biljaka kao što su klijanje, fotosinteza, respiracija, transpiracija itd. Visoka temperatura dovodi i do enzimske inaktivacije, denaturacije proteina, promene fluidnosti ćelijskih membrana što naravno utiče na rastenje biljaka (Hasanuzzaman i sar., 2017a). Pokazano je da visoka temperatura (30 °C) dovodi do značajne redukcije mase svežih izdaca i aktivnosti skrobne sintaze kod pšenice, dok folijarna primena SA utiče na povećanje mase svežih biljaka, količinu izolovane totalne RNK i aktivnost skrob sintaze (Kumar i sar., 2015). Kod kukuruza (*Zea mays*) visoke temperature (40° C) su dovele do oksidativnog oštećenja i smanjenja u suvoj biomasi, a primena egzogene SA dovela je do značajnog smanjenja negativnih efekata toplotnog stresa (Khanna i sar., 2016). SA je omogućila toleranciju ovih biljaka prema visokoj temperaturi tako što je dovela do povećanja aktivnosti SOD, CAT i POX.

Stres izazvan niskim temperaturama obuhvata stres zamrzavanja kada su temperature ispod 0 °C, i hlađenja kada su temperature između 0-15 °C. Stres hlađenjem kod biljaka dovodi do povreda bez formiranja leda, dok pri zamrzavanju dolazi do stvaranja leda u biljnom tkivu. Stres hlađenja dovodi do različitih štetnih posledica kod biljaka kao što su brža senescencija i propadanje, utiče na klijanje, propadanje ćelijskih membrana, fotosintezu, na balans uzimanja vode i hranljivih materija, reproduktivno razviće, kao i na rastenje i prinos (Hasanuzzaman i sar., 2013). Plodovi breskve (*Prunus persica*) su tretirani sa SA pre izlaganju povredama zamrzavanja (0 °C). SA je uticala tako što je dovela do povećanja aktivnosti antioksidativnih enzima i proteina toplotnog stresa (Wang i sar., 2006).

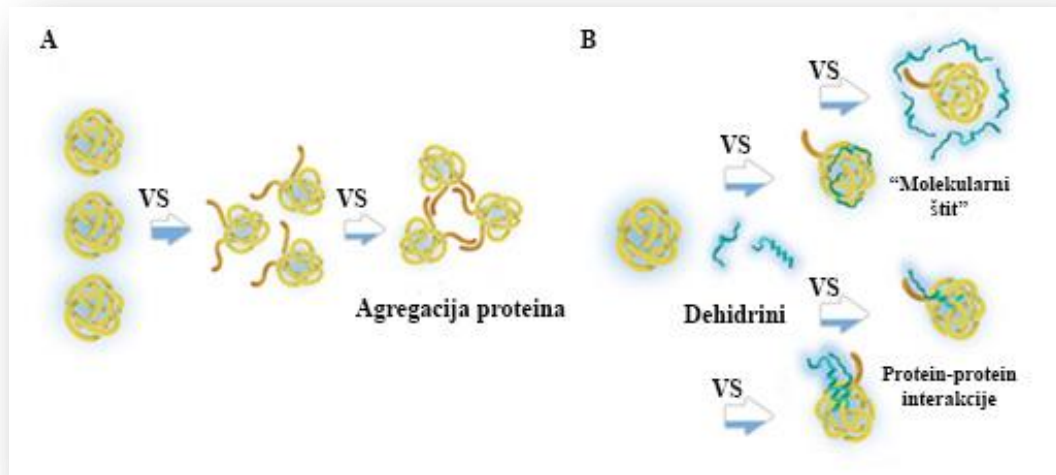
I visoke i niske temperature na molekularnom nivou dovode do oksidativnog stresa koji za posledicu ima povećanje proizvodnje ROS u ćelijama (Suzuki i Mittler, 2006). Upotreba SA u cilju ispitivanja tolerancije biljaka prema stresu ekstremnim temperaturama se često koristi u istraživanjima (Khan i sar., 2012).

#### 1.4. Dehidrini

Dehidrini predstavljaju porodicu proteina koja se eksprimira prilikom vodnog stresa. Dehidrini spadaju u grupu 2 LEA proteina i prisutni su kod velikog broja biljaka u različitim biljnim tkivima. Sastoje se iz različitih konzervativnih motiva poput K, Y i S (Goyal i sar., 2005; Tunnacliffe i Wise, 2007; Battaglia i sar., 2008). Dehidrini su hidrofilni proteini koji se karakterišu većim brojem polarnih aminokiselina i manjim brojem hidrofobnih aminokiselina. (Tunnacliffe i Wise, 2007; Battaglia i sar., 2008; Graether i Boddington, 2014).

Tačna funkcija dehidrina još uvek nije rasvetljena *in vivo*, ali *in vitro* eksperimenti pružaju uvid na koji način dehidrini vrše zaštitu biljnih ćelija. Dehidrini učestvuju u zaštiti proteina, ćelijskih membrana, a preliminarna istraživanja ukazuju i na potencijalnu ulogu u eliminaciji ROS (Goyal i sar., 2005; Hara i sar., 2005; Cuevas-Velazquez i sar., 2014; Riley i sar., 2019). Na **Slici 17.** su prikazani mogući mehanizmi delovanja dehidrina prilikom zaštite proteina tokom vodnog stresa. Kada su proteini izloženi vodnom stresu, njihovi hidrofobni regioni postaju izloženi usled nedostatka vode što u slučaju ozbiljne dehidracije dovodi do agregacije proteina (**Slika 17. A**).

Ukoliko su dehidrini prisutni u ćeliji pri nedostatku vode, oni vrše zaštitu proteina delujući kao “molekularni štit” (Slika 17. B). Pri ovom mehanizmu zaštite, dehidrini se ne vezuju direktno za proteine koje štite, već njihovo prisustvo i blizina omogućava funkcionalnost proteina jer hidrofobni regioni nisu izloženi, pa ne mogu interagovati sa hidrofobnim regionima drugih proteina. Drugi mogući mehanizam kojim dehidrini mogu da zaštite denaturisane proteine i spreče da dođe od njihove agregacije je vezivanje za izložene hidrofobne delove proteina kako ne bi došlo do hidrofobnih interakcija sa drugim denaturisanim proteinima (Slika 17. B).



**Slika 17.** Različiti molekularni mehanizmi delovanja dehidrina u uslovima vodnog stresa. A. Predstavljena je struktura proteina pri vodnom stresu kada dehidrini nisu prisutni u ćeliji. Braon repovi predstavljaju hidrofobne regione proteina koji pri vodnom stresu (VS) bivaju izloženi i stupaju u interakciju sa hidrofobnim regionima drugih denaturisanih proteina pri čemu se formiraju proteinski agregati. B. Struktura proteina pri VS i prisustvu dehidrina. Moguća su dva zaštitna mehanizma delovanja dehidrina: molekularni štit i protein-protein interakcije (preuzeto i modifikovano iz Cuevas-Velazquez i sar. 2014).

#### 1.4.1. Struktura dehidrina

Aminokiselinsku sekvencu dehidrina karakteriše varijabilan broj konzervativnih motiva, koji su ograničeni sa delovima koji su slabo konzervativni. Zato dehidrini variraju u svojoj molekularnoj masi, od 9,6 kDa (Labhili i sar., 1995), do 70 kDa (Kim i sar., 2012). U literaturi se često navodi da je relativna molekulska masa dehidrina i do 200 kDa, budući da je to relativna molekulska masa nekih dehidrina koja se očitava pri Westernu, a ovaj fenomen nastaje usled težeg kretanja dehidrinskih proteina u poliakridamidnom gelu upravo zbog njihove neuređene strukture (Receveur-Bréchet, i sar., 2005, Graether i Boddington, 2014).

Dehidrini se sastoje iz tri motiva, koji su označeni kao K, Y i S motiv. K motiv je bogat aminokiselinom lizin (K), predstavljen je sekvencom EKKGIMDKIKEKLPG koja je osnovna karakteristika strukture dehidrina. Najkonzervativniji ostaci predstavljaju deo sekvence K-I-K-E koja čini jezgro K motiva. Y motiv predstavljen je sekvencom (V/T)D(E/Q)YGNP. Treći najčešći dehidrinski motiv je S motiv koji se sastoji od 5-7 serinskih ostataka u nizu, a često mu prethode S-D (Graether i Boddington, 2014).

Pored navedenih konzervativnih motiva, dehidrini poseduju i  $\phi$ -segment, koji predstavlja sve aminokiselinske sekvence između Y-, S- i K-segmenata. Pretpostavlja se da dehidrini imaju i

druge motive pored K, Y i S, ali njihova sveprisutnost u familiji dehidrinskih proteina još uvek nije utvrđena. Motiv koji se nalazi kod nekih dehidrina je K bogat i označava se kao naelektrisani peptid (ChP) (Hara i sar., 2005; Mouillon i sar., 2006; Hundertmark i Hinch, 2008). Obično se sastoji od 1 ili 2 segmenta u kojima se nalazi 3-5 Lys u nizu, a prethode mu negativno naelektrisane aminokiseline (E ili D). Zanimljivo je što ovaj motiv pokazuje sličnost sa K motivom. Pretpostavljene uloge ChP motiva su: nuklearno targetiranje, mesto za fosforilaciju dehidrina ukoliko uključuje S ostatke (Graether i Boddington, 2014), vezivanje za DNK-a (Hara i sar., 2005), i šaperonska aktivnost (Mouillon i sar., 2006). Ni jedna uloga ChP motiva nije eksperimentalno dokazana.

Aranžman Y-, S- i K-motiva može da varira, ali najčešće se prema njemu dehidrini dele na pet grupa:  $K_n$ ,  $SK_n$ ,  $K_nS$ ,  $Y_nSK_n$ , i  $Y_nK_n$  (Graether i Boddington 2014, Riley i sar., 2019). Indeks n pokazuje koliko puta se neki motiv ponavlja, a redosled pokazuje kako su ti segmenti aranžirani u proteinskoj sekvenci dehidrina. S motiv se najčešće nalaze u jednoj kopiji, dok su Y i K motivi uglavnom prisutni u više kopija.

Dehidrini su najčešće prisutni u citoplazmi i jedru ćelije, mada se mogu naći i mitohondrijama, hloroplastima kao i u blizini ćelijske membrane za koju se najverovatnije vezuju. Cilj povezivanja YSK građe dehidrina i lokalizacije delovanja dehidrina u ćeliji je utvrđivanje funkcije svakog motiva dehidrina u zaštiti biljke. Uprkos brojnim studijama, koje se izvode na pojedinačnim dehidrinima ova veza nije u potpunosti jasna (Eriksson i Harryson, 2011). Dehidrini sa  $SK_n$  strukturom su lokalizovana u blizini ćelijske membrane, dok su dehidrini sa  $K_nS$  strukturom nađeni u mitohondrijama (Hara i sar., 2013). Dehidrini sa  $K_n$  strukturom i dehidrini sa  $Y_nK_n$  strukturom su detektovani i u jedru i u citoplazmi (Lin i sar., 2012). Dehidrini koji u svojoj strukturi imaju Y motiv nisu pronađeni u blizini ćelijske membrane, pa se smatra da nemaju ulogu u zaštiti ćelijske membrane. Ustanovljene su određene veze između YSK strukture dehidrina i odgovora biljaka na abiotički stres (Graether i Boddington, 2014). Dehidrini strukture  $K_n$ ,  $SK_n$ , i  $K_nS$  se uglavnom indukuju prilikom delovanja stresa izazvanog niskim temperaturama (Lin i sar., 2012; Graether i Boddington, 2014). Dehidrini strukturnog tipa  $Y_nSK_n$  se uglavnom sintetišu prilikom delovanja vodnog stresa i stresa soli na biljke (Graether i Boddington, 2014). Pretpostavlja se da dehidrini sa Y motivom imaju značajniju ulogu u odbrani ćelija prilikom delovanja vodnog stresa i stresa soli nego prilikom stresa izazvanog niskim temperaturama (Graether i Boddington, 2014). Postoji mogućnost da je Y motiv evolutivno favorizovan kako bi zaštitio biljnu ćeliju od oštećenja nastalih pri delovanju vodnog stresa i stresa izazvanog solima (Graether i Boddington, 2014).

#### 1.4.1.1. Intrinzično neuređena struktura dehidrina

Za dehidrine je karakterističan mali broj hidrofobnih aminokiselnih ostataka. Tipični globularni proteini se sastoje od hidrofobnog jezgra koje formiraju hidrofobni aminokiselinski ostaci, dok su hidrofilni aminokiselinski ostaci lokalizovani u spoljašnjem delu proteina omogućavajući im interakcije sa vodom. Kod dehidrina su prisutne uglavnom polarne i naelektrisane aminokiseline i mali broj hidrofobnih aminokiselina koji ne može da formira jezgro proteina, pa im nedostaje i sekundarna i stabilna terciarna struktura. Proteini kojima nedostaju sekundarna i terciarna struktura se nazivaju proteini intrinzično neuređene strukture (IDP, eng. *Intrinsically Disordered Proteins*). Neuređeni proteini najčešće predstavljaju signalne proteine i transkripcione faktore, ali često su takvi i proteini koji se sintetišu kao odgovor biljaka na stresne uslove sredine, poput LEA proteina (Tunnacliffe i Wise, 2007; Hinch i Thalhammer, 2012). Prednost neuređenosti dehidrina leži u tome da ovi proteini ne mogu da denaturišu. Do denaturacije globularnih proteina usled vodnog stresa dolazi jer hidrofobni regioni bivaju izloženi, nakon čega dolazi do interakcije sa hidrofobnim regionima drugih proteina i takvi proteini počinju da stvaraju agregate. U slučaju dehidrina njihova neuređena struktura ih sprečava da denaturišu tokom vodnog

stresa ili na temperaturama smrzavanja, jer imaju veoma malo hidrofobnih ostataka koji bi doveli do agregacije.

U većini studija u kojima je ispitivana mogućnost vezivanja dehidrina za membranske sisteme (micele deterdženta), dehidrini su nakon vezivanja za membranu formirali određenu terciarnu strukturu što ukazuje na to da dehidrini verovatno zauzimaju odgovarajuću strukturu kada se vežu za površinu ćelijske membrane (Ismail i sar., 1999; Hara i sar., 2001; Koag i sar., 2003, 2009; Soulgas i sar., 2003).

U studiji (Ismail i sar., 1999) ispitivano je ponašanje dehidrina (26,5kDa) izolovanog iz krastavca u prisustvu SDS micela. Utvrđeno je da u prisustvu micela dolazi do gubitka neuređenosti i pojave  $\alpha$ -heliks strukture. Mogućnost vezivanja dehidrina za membrane utvrđena je korišćenjem lipidnih vezikula (lipozoma) koje su imale hidrofilne glave sa različitim naelektrisanjem (Koag i sar., 2003). Rezultati su pokazali da se dehidrini vezuju za negativno naelektrisane fosfolipide kao što su fosfatidilserin (PS), fosfatidil glicerol (PG) i fosfatidinska kiselina (PA), a ne vezuju se za fosfatidil holin (PC). Biohemijske studije su pokazale da se dehidrini vezuju jače za PA, koja je manje prisutan lipid u ćelijskim membranama (1-2%). Dehidrini se ne vezuju za PC koji je najzastupljeniji lipid u plazma membrani. U radu Koag i sar. (2003), pretpostavljeno je da se koncentracija PA u ćelijskoj membrani povećava tokom vodnog stresa i stresa izazvanog solima, omogućavajući dehidrinima koji se vezuju za ćelijske membrane da ih zaštite očuvanjem fluidnosti ćelijskih membrana (Kovacs i sar., 2008; Eriksson i sar., 2011).

## 1.5. Proteini toplotnog stresa (HSP) i njihova uloga prilikom delovanja abiotičkih faktora stresa

HSP (eng. *Heat Shock Proteins*) proteini su prvo otkriveni kao proteini koji se sintetišu u odgovoru na toplotni stres, zatim je utvrđeno da se sintetišu i pri delovanju drugih stresogenih faktora. HSP proteini se sintetišu u ćelijama i kada na biljke ne deluju stresogeni faktori, jer imaju ulogu i u procesima rastenja i razvića biljaka (Singh i sar., 2016). Ovi molekuli funkcionišu kao molekularni šaperoni i prisutni su u svim živim organizmima (bakterije, biljke, životinje, ljudi). Poređenjem sekvenci HSP proteina između različitih biljnih vrsta, utvrđeno je da su aminokiselinske sekvence visoko konzervativne, pa se smatra da su HSP proteini evolutivno jedna od najstarijih klasa proteina (Ul Haq i sar., 2019).

Uloga HSP proteina biljaka je omogućavanje zauzimanja pravilne konformacije novosintetisanih proteina u ćelijama, sprečavanje novosintetisanih proteina da se pogrešno saviju ili da formiraju agregate, kao i targetiranje nepovratno oštećenih proteina u cilju njihove degradacije (Ul Haq i sar., 2019). HSP se mogu naći u različitim delovima ćelije kao što su citoplazma, jedro i ćelijske organele (mitohondrije, hloroplasti i endoplazmatični retikulum). HSP su grupisani u različite klase na osnovu njihove molekulske mase, sličnosti aminokiselinske sekvence i funkcije: HSP100 (100kDa), HSP90 (90kDa), HSP70 (70kDa), HSP60 (60kDa) i mali HSPn (sHSP – eng. *small*) sa molekularnom masom od 12-40kDa (Al-Whaibi, 2010; Ul Haq i sar., 2019). HSP100, HSP90, HSP70 i HSP60 spadaju u grupu proteina većih molekulskih masa.

### 1.5.1. Familija HSP100

Familija HSP100 predstavlja molekularne šaperone koji spadaju u veliku AAA ATP-aznu superfamiliju proteina koja je uključena u odgovor na različite tipove stresa. Obuhvataju proteine molekulske mase između 100 i 104 kDa. HSP100 vrši reaktivaciju agregiranih proteina resolubilizacijom nefunkcionalnih proteinskih agregata (Parsell i Lindquist, 1993), a takođe pomažu i u uklanjanju i reverzibilno oštećenih proteina (Bösl i sar., 2006). HSP100 deluju kooperativno sa HSP70 selektujući nepravilno “uvijene” agregirane proteine. HSP70 se vezuje za agregirani protein i time omogućava HSP100 da ga “prepozna”. Agregirani proteini mogu biti degradovani ili može doći do njihovog odvijanja uz pomoć HSP100, a zatim i otpuštanja sa HSP101 čime im se daje mogućnost da zauzmu pravilnu trodimenzionalnu strukturu (Doyle i sar., 2013). Pojedini članovi ove familije održavaju osnovne procese u ćeliji (tzv. “housekeeping” funkcije) i učestvuju u biogenezi hloroplasta (Lee i sar., 2007).

### 1.6. Karakteristike vrste *Impatiens walleriana*

Rod *Impatiens* (Balsaminaceae) obuhvata više od 1000 vrsta i predstavlja jedan od najbrojnih rodova među cvetnicama (Janssens i sar., 2009). Vrste roda *Impatiens* nisu tolerantne prema dugim sušnim periodima i izlaganju direktnoj sunčevoj svetlosti. Zato su uglavnom rasprostranjene u vlažnim staništima kao što su tropske kišne šume, mesta pored reka, potoka i močvara (Janssens i sar., 2009). Zbog svog prelepog izgleda i dugog perioda cvetanja, vrste roda *Impatiens* se gaje u celom svetu kao ukrasne biljke. Biljke roda *Impatiens* su jednogodišnje, zeljaste, sa sočnim nekada prozirnim stablima i u većini slučajeva sa zadebljalim nodusima. Među tropskim predstavnicima ima i višegodišnjih vrsta (Milošević i sar., 2012).

*Impatiens walleriana* (Lepi Jova) je najpopularnija među vrstama roda *Impatiens* sa mesnatim, sukulentnim listovima i različitim bojama cvetova koji se formiraju od ranog proleća do kasne jeseni (Fischer, 2004). *I. walleriana* je jednogodišnja zeljasta biljka, polužbunasta i veoma razgranata, visine od 30-70cm. Cvetovi su im zigomorfni, različite veličine i oblika, što predstavlja adaptaciju koja omogućava ovim biljkama da se oprašuju velikim brojem oprašivača (Fischer, 2004; Grey-Wilson, 1980).

*I. walleriana* se gaji zbog svojih dekorativnih osobina (**Slika 18.**). Cvetovi različitih boja omogućavaju postizanje izuzetnog vizuelnog efekta kada se sadi na javnim površinama ili u baštama. Ove biljke su veoma osetljive na nedostatak vode u supstratu i prilikom vodnog stresa dolazi do brze dehidracije tkiva što predstavlja veliki problem u komercijalnoj proizvodnji i prodaji ovih biljaka (Blanusa i sar., 2009; Andersson, 2011).

Umnožavanje biljaka roda *Impatiens* u kulturi *in vitro* postignuto je devedesetih godina prošlog veka korišćenjem različitih biljnih tkiva: kultura izdanaka (Han i Stephens, 1987; Nikolova i sar., 1996; Balakrishnan i sar., 2009), kultura ovule (Han i Stephens, 1992), kultura kotiledonih delova (Han, 1994; Taha i sar., 2009), kultura kalusa (He i Xi, 1989; Josekutty i sar., 1998, Panichazupakaranant, 2001) i kultura embriona (Arisumi, 1985). Biljne vrste koje su bile predmet istraživanja u ovim studijama su *I. hawkerii*, *I. balsamina*, *I. campanulata*. Uspešno umnožavanje vrste *I. walleriana* postignuto je *in vitro* kulturom aksilarnih izdanaka (Subotić i sar., 2008). Regeneracija aksilarnih izdanaka *in vitro* omogućava značajno poboljšanje proizvodnje ovih značajnih vrsta ukrasnih biljaka.



**Slika 18.** Prikaz dekorativnih osobina zbog kojih se *I. walleriana* gaji kao ukrasna biljka.

### 1.6.1. Gajenje i istraživanja na vrsti *I. walleriana* u Srbiji

Istraživanje i gajenje *I. walleriana* *in vitro* započeto je početkom dvehiljaditih u laboratorijama Odeljenja za fiziologiju biljaka na Institutu za biološka istraživanja “Siniša Stanković”, Univerzitet u Beogradu, Republika Srbija. Ispitivane su biljke *I. walleriana* zaražene virusom bronzavosti paradajza (TSWV – eng. *Tomato Spotted Wilt Virus*). Najčešće uočeni simptomi na listovima bili su lokalne hlorotične pege, hloroza duž nerava i druga hlorotična prošaranja, nekrotične pege, mrlje i hrastolika prošaranja, mozaik, lisna distorzija i deformacija, nekroza vrha liske i propadanje biljaka. Na zaraženim biljkama primećena je pojava nekroze stabla, cvetne drške, kao i čašičnih i kruničnih listića (Milošević i sar., 2012).

Vegetativno razmnožavanje biljaka nosi visok rizik i veliku verovatnoću prenosa virusa sa inficirane majke biljke na potomstvo (Gera i Zeidan, 2006; Anderson, 2006). Umnožavanje virusa je usko povezano sa metaboličkim procesima u samim biljkama, a njihovo suzbijanje je otežano jer su se inhibitori virusne replikacije pokazali toksičnim i za ćeliju domaćina. Efikasna eliminacija virusa i kontinualno umnožavanje bezvirusnog materijala je veoma važno za masovnu proizvodnju i kontrolu virusnih oboljenja. Glavni razlog korišćenja kulture meristema za eliminaciju patogena leži u činjenici da mnogi patogeni organizmi ne napadaju meristemski region izdanaka, jer je multiplikacija ćelija u meristemu brža od multiplikacije patogena. Druga prednost ovog tipa kulture je visoka genetička stabilnost regenerisanih biljaka sa minimalnim somaklonalnim variranjem, dok se klonalna propagacija odvija bez međufaze kalusa. Primenom kulture meristema *I. walleriana* uspešno je eliminisan virus iz 80% testiranih uzoraka (Milošević i sar., 2012).

Takođe, urađena je analiza antioksidativnih enzima (SOD, CAT, POX) zdravih, inficiranih i biljaka kod kojih je eliminisan virus kulturom meristema. Rezultati su pokazali da je dugotrajna infekcija indukovala nekoliko POX izoformi, uvećala ekspresiju MnSOD i dovela do smanjenja CAT aktivnosti *I. walleriana*. Ovo su ujedno bili i prvi rezultati koji su pokazali uticaj eliminacije virusa kulturom meristema na antioksidativne enzime kod *I. walleriana* (Milošević i sar., 2012).

Dalja istraživanja išla su u smeru primene krioterapije na eliminaciju virusa kod biljaka *I. walleriana*. Budući da je za uspešnu krioterapiju neophodna visoka dehidracija meristemskog tkiva, usledila su ispitivanja uticaja vodnog stresa na *I. walleriana* koji je i predmet ove disertacije.



## 2. Ciljevi rada

- Uspostavljanje *in vitro* i *ex vitro* sistema za ispitivanje uticaja vodnog stresa na biljke *I. walleriana*.
- Ispitivanje uticaja SA na rastenje i razviće biljaka *I. walleriana* praćenjem morfoloških parametara u uslovima vodnog stresa.
- Ispitivanje uticaja SA i vodnog stresa na nivo oštećenja u listovima (sadržaj H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ukupnih hlorofila i karotenoida, MDA) koji nastaju kao posledica sekundarnog oksidativnog stresa.
- Ispitivanje biohemijskih mehanizama delovanja SA u indukciji tolerancije na vodni stres praćenjem nivoa aktivnosti antioksidativnih enzima, sadržaja prolina, zastupljenosti HSP101 i ekspresije dehidrinskih gena.
- Identifikacija i karakterizacija sekvenci dehidrinskih gena na osnovu transkriptoma listova *I. walleriana* primenom bioinformatičkih metoda.

### 3. Materijal i metode

#### 3.1. Biljni materijal

Za uspostavljanje *in vitro* kulture *I. walleriana* kao polazni materijal korišćena su komercijalna semena Busy Lizzie Special Mixed F1 (*Johnson*, Safok, Velika Britanija). Biljni materijal korišćen za *ex vitro* eksperimente dobijen je uzgojem biljaka *I. walleriana* iz semena komercijalnog varijeteta Accent Premium Red (*Syngenta Flowers North America*, Gilroj, SAD).

#### 3.2. Hranljiva podloga za *in vitro* gajenje

Za isključavanje semena *I. walleriana* korišćena je MS hranljiva podloga, koja u svom sastavu sadrži makro i mikro elemente po Murashige i Skoog-u (1962) (**Tabela 2.**),  $30 \text{ gL}^{-1}$  saharoze,  $100 \text{ mgL}^{-1}$  mioinozitola (*Sigma-Aldrich*, Sent Luis, Misuri),  $7 \text{ gL}^{-1}$  agara (Torlak, Beograd, Srbija), i  $1 \text{ ml L}^{-1}$  MS vitamina. pH vrednost hranljive podloge je podešena pre sterilizacije u autoklavu (*Raypa*, Barselona, Španija) na 5,8 jedinica pomoću 1N NaOH i/ili HCl.

Za eksperimente ispitivanja uticaja SA (*Serva Electrophoresis*, Hajdelberg, Nemačka), pri uslovima PEG indukovano vodnog stresa kod *I. walleriana* korišćena je MS podloga standardnog sastava sa dodatkom PEG<sub>8000</sub> (*Erba Lachema s.r.o.*, Brno, Češka) u koncentracijama 1, 2 i 3% i SA u koncentracijama 1, 2 i 3 mM, uz postojanje kontrole odnosno hranljive podloge bez PEG<sub>8000</sub> i SA.

**Tabela 2.** Sastav MS rastvora mineralnih soli, gvožđa i vitamina (Murashige i Skoog, 1962).

MS makro mineralne soli	Koncentracija mgL <sup>-1</sup>
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650
KNO <sub>3</sub>	1900
CaCl <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O	440
MgSO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O	370
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170
MS mikro mineralne soli	Koncentracija mgL <sup>-1</sup>
Mn SO <sub>4</sub> X 2H <sub>2</sub> O	22,3
ZnSO <sub>4</sub> X 4H <sub>2</sub> O	8,6
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,2
KJ	0,83
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O	0,25
CuSO <sub>4</sub> x 5H <sub>2</sub> O	0,025
CaCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O	0,025
Kompleks gvožđa	Koncentracija mgL <sup>-1</sup>
Na <sub>2</sub> EDTA	37,2
FeSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	27,8
Vitamini	Koncentracija mgL <sup>-1</sup>
Vitamin B <sub>1</sub>	0,1
Vitamin B <sub>6</sub>	0,5
Nikotinska kiselna	0,5
Glicin	2,0

### 3.3. Uspostavljanje *in vitro* kulture *I. walleriana* i uslovi gajenja

Semena *I. walleriana* ispirana su 60 minuta pod mlazom tekuće vode, a u sud u kome su se nalazila semena sipano je par kapi deterdženta. Nakon toga semena su površinski sterilisana 15 minuta u 10% v/v rastvoru varikine (komercijalni preparat deklarisan da sadrži 4-6% NaOCl) u laminaru, uz blago mućkanje. Zatim su semena ispirana pet puta sterilnom dejonizovanom vodom. Nakon površinske sterilizacije, semena su postavljena na hranljivu podlogu za isključivanje (MS hranljiva podloga – **Tabela 2.**).

*In vitro* kulture izdanaka *I. walleriana* koje su korišćene za eksperimente, gajene su u klimatizovanoj prostoriji u kontrolisanim uslovima, na temperaturi od 25 ± 2 °C i u uslovima dugog dana (svetlosni režim 16 h svetlo, 8 h mrak). Kao svetlosni izvor korišćene su bele (6200 K) fluorescentne lampe jačine 58 W. Gustina svetlosnog fluksa na policama za gajenje kultura iznosila je 47 μmols<sup>-1</sup>m<sup>-2</sup> i izmerena je instrumentom LI-1400 DataLogger sa LI-190SA senzorom (LI-COR Biosciences, Hamburg, Nemačka).

### 3.4. Eksperiment uticaja SA i vodnog stresa na *in vitro* gajene biljke *I. walleriana*

Posle trideset dana gajenja, vrhovi izdanaka (10-12 mm) dobijeni iz prokljalih semena su isečeni i prebačeni na MS podlogu sa različitim kombinacijama i koncentracijama PEG<sub>8000</sub> (1, 2, 3%) i SA (1, 2, 3 mM). Posle 60 dana, određeni su parametri rasteња izdanaka (dužina glavnog izdanka, masa svežih i suvih izdanaka, broj izdanaka po biljci-indeks proliferacije, broj listova po biljci), relativni sadržaj vode u izdancima – RWC, gubitak vode u listovima – LWL (eng. *Leaf Water Loss*) i biohemijski parametri (koncentracija prolina, koncentracija malondialdehida – MDA, koncentracija H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, aktivnost antioksidativnih enzima).

Za izračunavanje vodnog potencijala hranljive podloge ( $\Psi_w$ ) u koju je dodat PEG<sub>8000</sub>, korišćen je softverski paket (Giba Z., IBISS, Beograd) baziran na Mišelovoj jednačini (Michel, 1983):

$$\Psi_w = 1,29 [\text{PEG}]^2 T - 140 [\text{PEG}]^2 - 4 [\text{PEG}],$$

gde je [PEG] – (g PEG/ g H<sub>2</sub>O); T = 25 °C

1,29; 140; 4 – predstavljaju konstante dobijene eksperimentalnim merenjem  $\Psi_w$  hranljive podloge u koju je dodat PEG<sub>8000</sub> na 25 °C.

Budući da hranljiva podloga sadrži saharozu i agar koji su osmotski aktivna jedinjenja koja utiču na  $\Psi_w$ , za izražavanje ukupnog vodnog potencijala podloge koji bi i tu vrednost uzeo u obzir, korišćene su vrednosti izračunate u radu Buah i sar., 1999. Za osnovnu hranljivu podlogu sa 30 gL<sup>-1</sup> saharoze i 7gL<sup>-1</sup> agara,  $\Psi_w$  iznosio je -0,55 MPa.  $\Psi_w$  hranljive podloge u koju je dodat PEG<sub>8000</sub> i dodatno uračunat  $\Psi_w$  osnovne hranljive podloge iznosio je u slučaju 1% PEG: -2,05 MPa; 2% PEG: -5,55 MPa; i 3% PEG: -11.45 MPa.

Za sve biohemijske analize prikupljeni su listovi sa petiolama, dok su za određivanje RWC i LWL korišćeni izdanci.

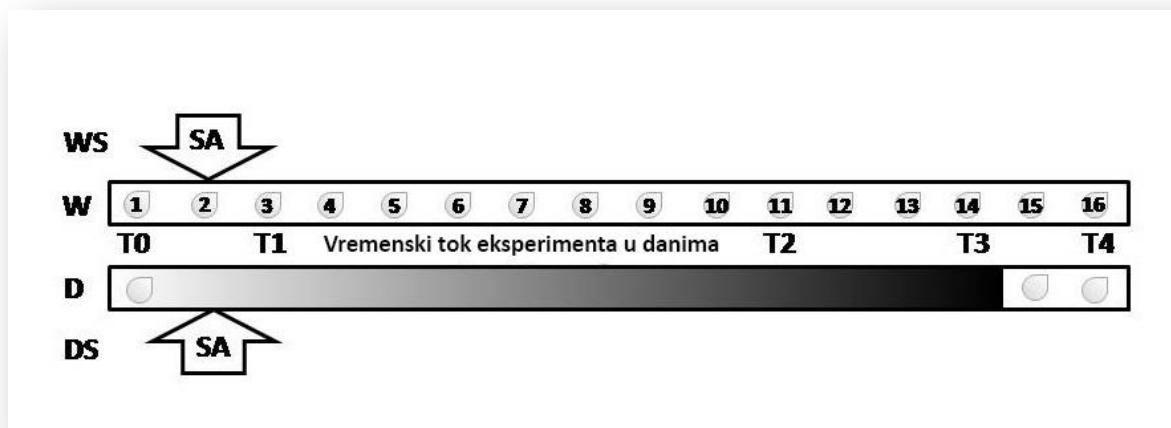
### 3.5. Uspostavljanje *ex vitro* kulture i uslovi gajenja

Kulture *I. walleriana* koje su korišćene za *ex vitro* eksperimente, gajene su u komori za gajenje biljaka - Fitoclima PLH 1200 (*Aralab*, Rio de Mouro, Portugal) u kontrolisanim uslovima, na temperaturi od 25 ± 2 °C, u uslovima dugog dana (svetlosni režim 16 h svetlo, 8 h mrak), sa 70% relativnom vlažnošću vazduha, temperaturnim režimom 20/18 °C (dan/noć) i gustom svetlosnog fluksa na policama za gajenje od 140 μmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>..

Semena iz kojih su dobijene kulture *I. walleriana* su posejana i gajena u komori za gajenje biljaka. Svako seme je zasejano u posebnu saksiju (3L) napunjenu komercijalnim hranljivim supstratom Floradur B Pot Medium-Coarse (*Floragard*, Oldenburg, Nemačka). Svaka saksija je prekrivena plastičnom folijom kako bi se postigla 100% relativna vlažnost koja je neophodna za iskljavanje semena *I. walleriana*. Semena su prokljala nakon četiri dana od zasejavanja. Saksije sa klijancima su i dalje bile prekrivene folijom periodu od sedam dana nakon iskljavanja. Folija je svakog dana uklanjana po nekoliko časova radi provetravanja i kako bi se biljke privikle na 70% relativnu vlažnost vazduha. Mlade biljke sa prvim potpuno razvijenim listovima su potom gajene sedam nedelja u uslovima 70% vlažnosti vazduha, i nakon toga su korišćene za *ex vitro* eksperimente.

### 3.6. Eksperiment uticaja SA i vodnog stresa na *ex vitro* gajene biljke *I. walleriana*

Biljke *I. walleriana*, stare osam nedelja podeljene su u četiri eksperimentalne grupe, sa po 12 biljaka u svakoj grupi. Pre eksperimenta, supstrat na kome su biljke rasle je potpuno zasićen vodom. Prvu i drugu grupu biljaka (W i WS, respektivno) činile su biljke koje su zalivane sve vreme trajanja eksperimenta sa po 75 ml destilovane vode svakodnevno, sa tom razlikom što su listovi biljaka WS grupe drugi dan eksperimenta isprskani sa 2 mM vodenim rastvorom SA, a listovi W grupe samo destilovanom vodom. Treća i četvrta grupa biljaka (D i DS, respektivno) nisu zalivane od drugog dana eksperimenta sve do rehidracije. Listovi DS grupe biljaka su drugi dan eksperimenta isprskani 2 mM vodenim rastvorom SA, a D grupe samo destilovanom vodom. Petnaestog dana eksperimenta biljke iz svih eksperimentalnih grupa su zalivane vodom do zasićenja supstrata u trajanju od 2h, time je u grupama D i DS izvršena rehidracija. Uzorkovanje biljnog materijala izvršeno je prvog dana eksperimenta, nakon zasićenja supstrata vodom (tačka T0), trećeg dana eksperimenta odnosno 24h nakon aplikacije salicilne kiseline (tačka T1), jedanaestog dana eksperimenta (kada su počeli da se naziru prvi simptomi suše u grupi D, tačka T2), četrnaestog dana eksperimenta (efekat suše je bio morfološki uočljiv u grupi D, tačka T3) i šesnaestog dana eksperimenta (24h nakon rehidracije, tačka T4). Na **Slici 19.** predstavljen je shematski prikaz eksperimenta.



**Slika 19.** Shematski prikaz eksperimenta. Kapljice predstavljaju dane kada su biljke zalivane. Intenzitet vodnog deficita je označen sve tamnijom bojom. Sterilice pokazuju da je SA primenjena drugog dana eksperimenta. T0-T4 su tačke uzorkovanja i prikazano je kog dana eksperimenta je urađeno uzorkovanje. Zalivane biljke (W), zalivane biljke tretirane sa SA (WS), biljke koje nisu zalivane (D), biljke koje nisu zalivane, a tretirane sa SA (DS).

### 3.7. Određivanje RWC i LWL

RWC je određen nakon 60 dana od postavke eksperimenta u *in vitro* kulturi korišćenjem formule Barrs i Weatherley (1962):

$$RWC (\%) = [(FW - DW)/(TW - DW)] \times 100$$

FW – masa svežih izdanaka na kraju eksperimenta

DW – masa suvih izdanaka merena nakon sušenja izdanaka na 75 °C, 24h

TW – masa turgescenčnih izdanaka posle inkubacije 2h u vodi.

LWL je izračunat na sledeći način, korišćenjem formule Xing i sar. (2004):

$$LWL = [(FW - W_2)/FW] \times 100$$

FW – masa svežih izdanaka na kraju eksperimenta

W<sub>2</sub> – masa izdanaka nakon evaporacije

RWC u eksperimentu *ex vitro* je takođe određen po formuli Barrs i Weatherley (1962), pri čemu je FW u ovom slučaju predstavljala masu deset svežih lisnih odsečaka, DW masu deset suvih lisnih odsečaka 24h nakon liofilizacije, a TW masu deset turgescenčnih odsečaka, odnosno odsečaka koji su inkubirani 24h u dejonizovanoj vodi. Za svaku eksperimentalnu grupu i tačku uzorkovanja RWC je određen četiri puta sa po deset odsečaka po ponavljanju.

### 3.8. Određivanje sadržaja hlorofila (Hlorofil a+b), karotenoida i ukupnih fotosintetičkih pigmenata u listovima

Za izolaciju hlorofila i karotenoida korišćeno je 20 mg listova *I. walleriana*. Za ekstrakciju je korišćeno 2 ml 96% etanola. Mikrotube sa biljnim materijalom i etanolom su zagrevane u vodenom kupatilu na 70 °C u trajanju od 10 minuta. Sadržaj hlorofila i karotenoida određivan je spektrofotometrijski na tri talasne dužine: 470, 648 i 664 nm (*Agilent 8453*, Santa Klara, Kalifornija, SAD) i beležena je apsorbanca (A). Koncentracija ukupnih hlorofila (hlorofil a+b) je izračunata po formuli (Lichtenhaler, 1987) i izražena je u mg/g mase svežeg uzorka:

$$C_{(a+b)} = 5,24A_{664} + 22,24A_{648}$$

A<sub>664</sub> – apsorbanca merena na 664 nm talasne dužine

A<sub>648</sub> – apsorbanca merena na 648 nm talasne dužine

Koncentracija karotenoida izračunata je po formuli (Lichtenhaler, 1987) i izražena je u mg/g mase svežeg uzorka:

$$C_{\text{karotenoida}} = (1000A_{470} - 2,13C_a - 97,64C_b) / 209$$

A<sub>470</sub> – apsorbanca merena na 470 nm talasne dužine

C<sub>a</sub> – koncentracija hlorofila a, izražena u mg/g mase svežeg uzorka

C<sub>b</sub> – koncentracija hlorofila b, izražena u mg/g mase svežeg uzorka

Sadržaj ukupnih pigmenta (hlorofil (a+b) i karotenoida) izračunat je sabiranjem sadržaja ukupnih hlorofila i sadržaja karotenoida.

$$C_{\text{ukupnih pigmenata}} = C_{(a+b)} + C_{\text{karotenoida}}$$

Sve ekstrakcije ponovljene su tri puta.

### 3.9. Određivanje koncentracije H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, malondialdehida (MDA) i prolina u listovima

Koncentracija H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> je određena po metodi koja je opisana u radu Velikova i saradnici (2000). Tkivo listova (150 mg) je usitnjeno pomoću tečnog azota uz dodatak 0,1% (w/v) TCA (3,75 ml). Tako homogenizovano biljno tkivo je centrifugirano pri brzini od 15000 g u trajanju od 5 minuta na 4 °C. Supernatantu (0,2 ml) je dodato 0,2 ml 10 mM kalijum-fosfatnog pufera pH 7 i 0,4 ml 1M KJ. Iz opisane smeše, 0,2 ml je nalivano u bunariće mikrotitar ploče i merena je apsorbanca na 390 nm (ELISA Micro Plate Reader, LKB 5060–006, Vinuski, Vermont, SAD), dok je koncentracija H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> izračunata korišćenjem formule:

$$\text{H}_2\text{O}_2 (\mu\text{M g}^{-1} \text{ mase svežeg uzorka}) = [(A_{390}) / 0,28] \times 1000 \times$$

$$(\text{zapremina uzorka/zapremina reakcione smeše}) \times (1/\text{masa svežeg uzorka})$$

A<sub>390</sub> – apsorbanca merena na 390 nm  
0,28 mM<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> – ekstinkcioni koficijent (ε) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>  
Analize za svaki uzorak su ponovljene tri puta.

Za određivanje nivoa lipidne peroksidacije u listovima urađen je test kojim se meri nivo MDA u listovima po metodi Health i Packer (1968). Tkivo listova (100 mg) je usitnjeno pomoću tečnog azota, a ekstrakcija je urađena pomoću 0,1% TCA (1 ml). Homogenizovano biljno tkivo je centrifugirano na 15000 g, 10 minuta pri temperaturi od 4 °C. U 0,25 ml supernatanta je dodato 0,5 ml mešavine 20% TCA + 0,5% TBA. Tako dobijeni materijal je inkubiran 30 minuta na 95 °C u vodenom kupatilu. Mikro tube su brzo ohlađene na ledu i centrifugirane na 15000 g, 10 minuta na 4 °C. Supernatant je analiziran spektrofotometrijski na dve talasne dužine: 532 i 600 nm na mikrotitar ploči, a u bunarić je sipano 0,1 ml supernatanta. Koncentracija MDA je izračunata korišćenjem sledeće formule:

$$\text{MDA} (\mu\text{M g}^{-1} \text{ sveže mase}) = [(A_{532} - A_{600}) / 155] \times 1000 \times$$

$$(\text{zapremina uzorka/zapremina reakcione smeše}) \times (1/\text{sveža masa uzorka})$$

A<sub>532</sub> – apsorbanca merena na 532 nm talasne dužine  
A<sub>600</sub> – apsorbanca merena na 600 nm talasne dužine  
155mM<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> – ekstinkcioni koeficijent (ε) MDA  
Analize za svaki uzorak su ponovljene tri puta.

Koncentracija prolina u listovima *I. walleriana* određena je na osnovu modifikovane ninhidrinske metode (Bates i sar., 1973). Reakcijom između prolina i ninhidrina se dobija žuto obojeno jedinjenje koje ima maksimum apsorpcije na 350 nm (Friedman, 2004). Tkivo listova (250 mg) je usitnjeno pomoću tečnog azota uz dodatak metanola (0,5 ml). Homogenat je centrifugiran na 14000 g u trajanju od dva minuta, a zatim je u supernatant dodato 0,5 ml hloroforma i 0,75 ml vode. Ova smeša je pomešana obrtanjem mikrotube i kratko centrifugirana da bi se odvojile faze. Gornja vodena faza je izdvojena i koncentrovana na vakuum koncentratoru (Eppendorf, Hamburg, Nemačka) na sobnoj temperaturi u trajanju od 5h. Koncentrovani uzorci su rastvoreni u 125 μl vode. Za ninhidrinsku reakciju je potrebno 20 μl uzorka i 50 μl ninhidrin reagensa koji su potom inkubirani 4 minuta na 95 °C. Nakon toga je dodato 930 μl etanola i merena je apsorpcija na 350 nm (ELISA Micro Plate Reader, LKB 5060–006, Vinuski, Vermont, SAD). Pošto mnoge druge

supstance, izuzev prolina, apsorbuju na 350 nm, bilo je potrebno uraditi i paralelnu reakciju bez ninhidrina i izmeriti apsorbancu. Koncentracija prolina u uzorku je određena iz standardnih krivi korišćenjem sledeće formule:

$$\text{Prolin } (\mu\text{M g}^{-1} \text{ mase svežeg uzorka}) = [(A_{350} \text{ sa ninhidrinom} - A_{350} \text{ bez ninhidrina}) / a] \times (\text{zapremina uzorka} / \text{zapremina reakcione smeše}) \times (1 / \text{mase svežeg uzorka})$$

$A_{350}$  – apsorbancu merena na 350 nm talasne dužine

a = regresioni koeficijent, dobijen na osnovu standardne krive prolina

### 3.10. Izolacija i kvantifikacija proteina

Tkivo listova mase oko 1g, usitnjeno je u avanu u tečnom azotu radi izolacije ukupnih rastvorljivih proteina. U uzorke je dodato 1ml pufera za izolaciju proteina (PEB) koji je sadržao: 50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 30% glicerol, 1,5% polivinilpolipirrolidon (PVPP), 10 mM ditiotritol (DTT) i 1mM fenilmetilsulfonil fluorid (PMSF). Homogenizovano biljno tkivo je centrifugirano na 14000 g u trajanju od 15 minuta na 4 °C. Supernatant koji sadži ukupne, rastvorljive ćelijske proteine, je odvojen i alikvoriran. Koncentracija ukupnih proteina u uzorcima određena je spektrofotometrijskom metodom po Bradford-u (Bradford, 1976) merenjem apsorpcije smeše na 595 nm (*Agilent 8453*, Santa Klara, Kalifornija, SAD). Merena je i apsorpcija različitih koncentracija standarda koji je predstavljao goveđi serum albumin - BSA (eng. *Bovine Serum Albumin*) i tako je napravljena standardna kriva na osnovu koje su izračunate koncentracije ukupnih proteina u uzorcima.

### 3.11. Spektrofotometrijska analiza aktivnosti SOD, CAT i GPOX

Spektrofotometrijski je praćena antioksidativna aktivnost enzima SOD, CAT i POX u eksperimentima ispitivanja uticaja SA na vodni stres nametnut PEG u kulturama *I. walleriana*.

Aktivnost SOD određivana je po modifikovanoj metodi Beyer i Fridovich (1987). Reakciona smeša (1 ml) sadržala je: 2 mM EDTA, 260 mM metionin, 1,5 mM nitroblue tetrazolium hlorid (NBT), 0,04 mM riboflavin u 100 mM K-P pufer, K-P pufer (pH 7,8) i uzorak (**Tabela 3**).

Reakciona smeša je osvetljavana od 30-60 minuta, na temperaturi od 25 °C u mikrotitar ploči. SOD aktivnost je određena na osnovu mogućnosti proteinskog ekstrakta da inhibira fotohemijisku redukciju NBT do formazana. Merenje apsorbance je vršeno na 540 nm (*ELISA Micro Plate Reader*, LKB 5060-006, Vinuski, Vermont, SAD). Kontrolna reakciona smeša nije sadržala uzorak proteina. Jedna jedinica SOD (U) je definisana kao količina enzima koja može da inhibira 50% NBT fotoredukcije u poređenju sa kontrolnom smešom i izražava se u odnosu na koncentraciju ukupnih solubilnih proteina (U/mg mase svežeg uzorka). Sva merenja ponovljena su tri puta.



**Tabela 3.** Zapremine rastvora ( $\mu\text{l}$ ) potrebne za 1 ml reakcione smeše

K-P pufer (pH 7,8)	2 mM EDTA	260 mM metionin	Uzorak	1,5 mM NBT	0,04 mM riboflavin
800	50	50	-	50	50
795	50	50	5	50	50
790	50	50	10	50	50
785	50	50	15	50	50
780	50	50	20	50	50
775	50	50	25	50	50

Aktivnost katalaza određivana je spektrofotometrijski, praćenjem kinetike nestajanja vodonik peroksida ( $\epsilon_{240}=0,0436 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ), prema metodi Aebi (1984). Korišćeni su 50 mM K-Na-P pufer pH 7,0 i 30%  $\text{H}_2\text{O}_2$  sa apsorbancom od  $0,85 \pm 0,02$ . Aktivnost CAT je merena na 240nm u periodu od tri minuta, na temperaturi od  $20^\circ\text{C}$ , na svakih 20 s. Jedinica (U) aktivnosti katalaza se definiše kao količina enzima koja razgradi 1  $\mu\text{mol}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  za jedan minut. Aktivnost CAT (A) je izražena u U/ml ( $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2\text{min}^{-1}\text{ml}^{-1}$ ) izračunavana je prema formuli (Aebi, 1984):

$$V = [(\Delta A - \Delta A_0) \times V_k] / (0,0436 \times V_e)$$

V – aktivnost katalaza (U/mg mase svežeg uzorka)

$\Delta A$  – promena apsorbance u minutu

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

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

$V_e$  – zapremina uzorka u kivetu (ml)

0,0436 – milimolarni ekstinkcioni koeficijent ( $\epsilon$ )  $\text{H}_2\text{O}_2$  na 240 nm izražen u  $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$

Sva merenja ponovljena su po tri puta.

Aktivnost ukupnih peroksidaza praćena je spektrofotometrijski merenjem promene apsorbance na 430 nm. Reakciona smeša je sadržala 2,9 ml 0,05 M K-P pufera, pH 6,5, 60  $\mu\text{l}$  1 M pirogalola (*Sigma-Aldrich*, Sent Luis, Misuri) kao supstrata za enzim i 10  $\mu\text{l}$  uzorka, uz dodatak 30  $\mu\text{l}$  1 M  $\text{H}_2\text{O}_2$  posle prvih 20 s reakcije. Aktivnost peroksidaza je merena tri minuta, na svakih 20 s, a izražena je u U/ml. Reakcija se dešava između pirogalola i  $\text{H}_2\text{O}_2$ , a katalizovana je peroksidazama i vodi do oksidacije pirogalola do purpurogalina koji je žućkasto-smeđe boje. Purpurogalin ima maksimum apsorpcije na 430 nm. Aktivnost enzima izračunata je prema formuli (Kukavica i Veljović, 2004):

$$V = [(\Delta A - \Delta A_0) \times V_k] / (2,47 \times V_e)$$

V – aktivnost ukupnih peroksidaza (U/mg mase svežeg uzorka)

$\Delta A$  – promena apsorbance u minutu,

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

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

$V_e$  – zapremina uzorka u kivetu (ml),

2,47 – milimolarni ekstinkcioni koeficijent pirogalola na 430 nm i izražava se u  $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ .

Sva merenja ponovljena su po tri puta

### 3.12. SDS-PAGE i imunoblot analiza proteina

Za razdvajanje proteina 1D natrijum-dodecil sulfat poliakrilamid gel elektroforezom (1D SDS-PAGE) (eng. *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) korišćeni su diskontinuirani poliakrilamidni gelovi (5% gel za koncentrovanje proteina i 10% gel za razdvajanje proteina). Nativni ekstrakt proteina pomešan je u odnosu 1:1 sa puferom za pripremu uzoraka (v/v) po Lemli metodi (Laemmli, 1970). Pripremljeni uzorci koji su sadržali po 10 µg proteina, nanošeni su na poliakrilamidni gel. Elektroforeza je izvedena u Mini Protean Tetracell (*Bio-Rad*, Herkjuliz, Kalifornija, SAD) sistemu. Po završenoj elektroforezi, urađen je transfer proteina sa gelova na poliviniliden difluorid membrane (PVDF) (*Bio-Rad*, Herkjuliz, Kalifornija, SAD) metodom „mokrog” transfera (eng. *wet transfer*). Transfer proteina sa gelova na membrane, obavljen je u Mini Protean Tetracell (*Bio-Rad*, Herkjuliz, Kalifornija, SAD). Nakon završenog transfera, blotovi su blokirani potapanjem u 10% rastvoru nemasnog mleka u fosfatnom puferu (PBS) (eng. *phosphate buffered saline*), pH 7,5 sa 0,05 % Tween deterdženta (T-PBS pufer) i ostavljene preko noći na +4 °C. Nakon blokiranja blotova, usledilo je ispiranje sa T-PBS puferom i ovako pripremljeni blotovi inkubirani su sa primarnim antitelima. Za analizu su korišćena poliklonalna anti-HSP101 antitela (*Agrisera*, Vännäs, Švedska). Anti-HSP101 antitela razblažena su u odnosu 1:2000, u rastvoru 5% nemasnog mleka u T-PBS puferu (v/v). Nakon inkubacije sa primarnim antitelima, membrane su ispirane u T-PBS puferu i potom inkubirane sa sekundarnim antitelom, anti-rabbit IgG-HRP Ab (*Sigma-Aldrich*, Sent Luis, Misuri). Sekundarno antitelo razblaženo je u odnosu 1:20000 u 5 % rastvoru nemasnog mleka u T-PBS puferu (v/v). Nakon reakcije sa sekundarnim antitelom, blotovi su ispirani u T-PBS puferu, a potom je detekcija ciljanog proteina izvršena metodom pojačane hemiluminiscencije (ECL) (eng. *Enhanced Chemiluminescence*). Blotovi su inkubirani u smeši rastvora A (0,43 % p-kumarna kiselina, 1% luminol u 100 mM Tris-HCl) i rastvora B (0,017 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u 100 mM Tris-HCl) u trajanju od 5 minuta. Proteinske trake vizualizovane su korišćenjem X-Omat LS filma (*Carestream Health*, Ročester, Njujork, SAD). Volumen proteinskih traka određen je uz pomoć TotalLab120 kompjuterskog softvera (*TotalLab Ltd.*, Njukasl, Ujedinjeno Kraljevstvo).

### 3.13. Nativna gel-elektroforeza i analiza aktivnosti enzima

Za determinaciju izoformi enzima gel-elektroforezom u nenedenaturišućim uslovima upotrebljeni su 7% poliakrilamidni gelovi za razdvajanje i 5% poliakrilamidni gelovi za koncentrovanje proteinskih uzoraka. Korišćeni su gelovi 1,5 mm debljine. Za razdvajanje proteina upotrebljen je sistem za vertikalnu elektroforezu SE 600 Rubi (*Amersham Biosciences*, Bakimgamšir, Ujedinjeno Kraljevstvo). Prilikom elektroforeze korišćen je pufer koji je sadržao 25 mM Tris-HCl i 192 mM glicina, pH 8,3. Na gelove su nanošeni uzorci proteina koji su prethodno mešani sa Lemli puferom (Laemmli, 1970) u odnosu 1:1 (v/v). Proteini su na gelove naneti u sledećim količinama: 40 µg za analizu SOD, 35 µg za analizu CAT, 100 µg za analizu gvajakol peroksidaza.

### 3.13.1. Određivanje aktivnosti superoksid-dismutaza

Izoenzimske forme SOD razdvojene su po modifikovanoj metodi Beauchamp i Fridovich (1971) gel-elektroforezom u trajanju od 2,5 h na 100V, na 4 °C. Nakon gel-elektroforeze gelovi su ispirani vodom i inkubirani 30 minuta u mraku, u reagensu za enzimski test koji je sadržao 250 mM EDTA, 0,098 mM nitrotetrazolijum hlorid (NBT), 0,03 M riboflavin i 2 ml N,N,N',N'-tetrametiletan-1,2-diamin (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. Različite izoforme SOD su identifikovane tako što su gelovi sa identičnim uzorcima pre bojenja inkubirani u 100 mM K-P puferu, pH 7,8 koji je korišćen kao kontrola ili u puferu koji je sadržao inhibitore izoformi SOD 1 mM KCN ili 3 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u trajanju od 30 min. Vodonik-peroksid inhibira Cu/ZnSOD i FeSOD, kalijum cijanid inhibira Cu/ZnSOD, dok su u kalijum fosfatnom puferu aktivne sve izoforme SOD.

### 3.13.2. Određivanje aktivnosti katalaza

Izoforme katalaza su razdvojene prema modifikovanoj metodi Woodbury i sar. (1971), elektroforezom na 150 V u trajanju od 24h. Nakon elektroforeze gelovi su ispirani dejonizovanom vodom, zatim su inkubirani u 0,01% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10 minuta. Posle toga ispirani su dejonizovanom vodom i inkubirani su u 2% rastvoru K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> tokom 30 s, zatim je u taj rastvor dodata ista zapremina 2% rastvora FeCl<sub>3</sub> pri čemu nastaje jedinjenje KFeIII(FeII(CN)<sub>6</sub>), koje boji gel plavo-zelenom bojom. Na mestima na kojima je prisutna katalaza, koja katalizuje degradaciju H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, dolazi do obezbojavanja nakon nekoliko minuta. Kada su se trake najbolje uočile, reakcija je zaustavljena ispiranjem gelova u vodi.

### 3.13.3. Određivanje aktivnosti peroksidaza

Razdvajanje izoenzima gvajakol peroksidaza izvršeno je prema modifikovanoj metodi Rothe (2002), elektroforezom na 150 V u trajanju od 5h. Ispiranje gelova vršeno je u 100 mM citratnom puferu (pH 4) a potom su inkubirani 30 minuta u reakcionom puferu (100 mM citratni pufer pH 4 sa 80 μl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i 40 μl gvajakola) do pojave crvenih traka. Reakcija nastaje između H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i gvajakola, pri čemu nastaje crveno obojeni tetrahidrogvajakol. Nakon ove inkubacije, gelovi su ispirani vodom, skenirani i analizirani primenom grafičkog paketa TotalLab 120 (TotalLab Ltd., Njukasl, Ujedinjeno Kraljevstvo).

## 3.14. Izolacija RNK

Za RNK sekvenciranje korišćena je ukupna RNK izolovana iz listova nestresiranih biljaka starosti 12 nedelja, dok je za kvantitativni PCR (qRT-PCR) korišćena totalna RNK izolovana iz listova W, WS, D i DS biljaka u vremenskim tačkama T0, T1, T3 i T4. Izolacija RNK je urađena po modifikovanom protokolu Gasic i sar. (2004).

U uzorke listova (300 mg) je dodato po 1ml ekstrakcionog pufera čiji je sastav prikazan u **Tabeli 4.**, sa dodatkom 15  $\mu$ l  $\beta$ -merkaptoetanol. Uzorci su vorteksovani i inkubirani 15 minuta u vodenom kupatilu na 60 °C. U svaki uzorak je dodato 1ml smeše hloroform: izoamil alkohol (24:1). Uzorci su zatim centrifugirani 10 minuta na 10000 g na 4 °C. Ekstrakcija hloroformom: izoamil alkoholom je ponovljena. U supernatant (oko 700  $\mu$ l) je dodato 166  $\mu$ l 7,5 M LiCl i uzorci su inkubirani na 4 °C preko noći. Narednog dana uzorci su centrifugirani 45 minuta na 12000 g na 4°C. Supernatant je odbačen, a pelet je ispran sa 1 ml 70% etanola i uzorci su centrifugirani 10 minuta na 12000 g na 4 °C. Supernatant je odbačen i pelet osušen tokom 5 min u komori sa laminarnim strujanjem vazduha. Pelet je zatim rastvoren u 100  $\mu$ l vode i dodato je 10  $\mu$ l Na-acetata (pH 5,5) i 275  $\mu$ l 70% etanola. Uzorci su inkubirani 60 minuta na -70 °C, a zatim su centrifugirani 45 min na 12000 g na 4 °C. Supernatant je odbačen, a pelet ispran 70% etanolom i osušen kao što je prethodno opisano. Osušena RNK je rastvorena u 50  $\mu$ l vode i do upotrebe čuvana na -70 °C.

**Tabela 4.** Sastav pufera za ekstrakciju RNK (Gasic i sar., 2004).

2 x CTAB ekstrakcioni pufer	Finalne koncentracije
CTAB	2% (w/v)
PVP K- solubilni	2% (w/v)
Tris HCl pH 8	100 mM
EDTA	25 mM
NaCl	2 M
spermidin	0,5 g/l
H <sub>2</sub> O (DEPC tretirana)	

Kvantitet i kvalitet izolovane RNK proveren je spektrofotometrijski i elektroforetski na agaroznom gelu uz korišćenje aparata za horizontalnu elektroforezu (*Serva, BlueMarine 100*, Hajdelberg, Nemačka). Koncentracija RNK je određena spektrofotometrijskim merenjem apsorpcije na 260 nm na aparatu NanoPhotometer N60 (*Implen, Minhen, Nemačka*). Čistoća izolovanih RNK je procenjena na osnovu odnosa  $A_{260}/A_{280}$  koji se za čiste izolate RNK kreće u intervalu od 1,8 do 2,2. Integritet RNK je određen elektroforetskim razdvajanjem 1  $\mu$ g uzorka RNK na 1,2% (w/v) agaroznom gelu.

### 3.15. Reverzna transkripcija RNK

Pre same reakcije reverzne transkripcije (RT) RNK molekula, 1 $\mu$ g ukupne izolovane RNK tretiran je enzimom DNK-azom I (*Fermentas, Voltam, Masačusets*) kako bi se izvršilo uklanjanje genomske DNK (sastav reakcione smeše prikazan je u **Tabeli 5.**). Inkubacija je trajala 30 minuta na 37 °C, a enzim je zaustavljen dodavanjem 1  $\mu$ l EDTA u svaki izolat i inkubiranjem 10 minuta na 65 °C.

**Tabela 5.** Sastav reakcione smeše za uklanjanje genomske DNK iz izolovane RNK

Komponenta	Zapremina ( $\mu$ l)
RNK uzorak 1 $\mu$ g	do 7,75
10 x reakcioni pufer $MgCl_2$	1
DNKaza I (1 U/ $\mu$ l)	1
Inhibitor RNKaze <i>RiboLock RI</i> (40 U/ $\mu$ l)	0,5
H <sub>2</sub> O	do 10

RT reakcija urađena je kako bi se RNK prevela u komplementarne jednolančane DNK (cDNK). Za RT reakciju korišćen je Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kit-a (*Fermentas*, Voltam, Masačusets, SAD). Komponente za RT reakciju prikazane su u **Tabeli 6**. Smeša je inkibirana na sobnoj temperaturi 5 minuta. Uslovi reakcije u PCR mašini bili su 42 °C u trajanju od 60 minuta i 70 °C u trajanju od 5 minuta. RT reakcija je urađena na aparatu Mastercycler® Nexus Gradient (*Eppendorf*, Hamburg, Nemačka).

**Tabela 6.** Komponente reakcione smeše za reverznu transkripciju

Komponente	Zapremina ( $\mu$ l)
RNK-a iz prethodnog koraka (1 $\mu$ g)	11
Nasumični heksamerni-prajmeri (15-20 pmol)	1
5 x reakcioni pufer	4
Inhibitor RNK-aze (20 U/ $\mu$ l)	1
Reverzna transkriptaza (200 U/ $\mu$ l)	2
dNTP-ovi (10mM)	1
Ukupno	20

### 3.16. RNK sekvenciranje, *de novo* sklapanje transkriptoma i funkcionalna anotacija

RNK sekvenciranje (RNK Seq) je urađeno u kompaniji Genomix4Life (Salerno, Italija) korišćenjem HiSeq 2500 Illumina platforme, sekvencioniranjem sa oba kraja fragmenata (eng. *standard paired-end mode*). Kontrola kvaliteta sirovih sekvenci je izvedena pomoću FastQC programa (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>), a adapterske sekvence su uklonjene korišćenjem Cutadapt softverskog alata (Haas i sar., 2013). Očitane sekvence visokog kvaliteta su korišćene kao polazne sekvence za *de novo* sastavljanje transkriptoma korišćenjem Trinity softverskog alata (Haas i sar., 2013). Potencijalno kodirajući regioni su identifikovani i urađena je translacija u proteine (sekvence dužine od minimum 100 aminokiselina) korišćenjem TransDecoder (Haas i sar., 2013). Funkcionalna anotacija je urađena korišćenjem Trinotate (eng. *Transcriptome Functional Annotation and Analysis*) softverskog alata koji kombinuje više bioinformatičkih baza: potrage za homologim sekvencama korišćenjem do sada poznatih sekvenci

(Blast+/SwissProt), identifikaciju proteinskih domena (HMMER/PFAM), baza protein signalnih peptida i transmembranskih domena (signalP/tmHMM), i različite baze podataka povezanih sa anotacijom (eggNOG/GO/Kegg). Na ovaj način su određene glavne karakteristike transkriptoma *I. walleriana* koje su prikazane su u **Tabeli 7**.

**Tabela 7.** Glavne karakteristike transkriptoma *I. walleriana*

Kolona 1	Očitavanja	Transkripti	Geni	Transkriptom
Broj	28042416	109176	66984	
Srednja ocena kvaliteta	34			
Veličina (Mbp)				122
% GC				41,2
Prosečna dužina (bp)		1126		
Srednja dužina (bp)		728		
N50 (bp)		1857		
Sekvence sa $\geq 2$ TPM		18492	12269	
BLAST poklapanja		64236		
PFAM poklapanja		60721		
Gena anotirano		33631		

### 3.17. Dizajniranje prajmera za praćenje ekspresije *de novo* sekvenci dehidrina

Za identifikovane sekvence dehidrinskih gena kreirani su specifični prajmeri korišćenjem Primer-BLAST softverskog alata (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) (**Tabela 8**). Specifičnost prajmera, kao i temperature vezivanja prajmera ( $T_a$ ), su testirani gel elektroforezom RT-PCR produkata. Za testiranje je korišćena cDNK kontrolnih uzoraka (izdanci biljaka koji su bili potopljeni u vodi) i dehidriranih uzoraka (izdanci biljaka potopljeni u rastvor PEG<sub>8000</sub>, vodnog potencijala od -3MPa).

**Tabela 8.** Sekvence prajmera korišćene za amplifikaciju sekvenci *Dhn* gena *I. walleriana*

Naziv prajmera	Sekvenca (5'-3')	Dužina amplikona (bp)	$T_a$ (°C)
F: <i>IwDhn1</i>	AAGCCCTCTCTTTTCACCTCC	177	55,6
R: <i>IwDhn1</i>	CGTGGAGACACAGGACAGAG		
F: <i>IwDhn2.1</i>	ATAAGGCTTGCCACCATCA	234	54,5
R: <i>IwDhn2.1</i>	CAAAGAATTGCGAACTTCAGA		
F: <i>IwDhn2.2</i>	TGGAGGTGGAGGAGGACTG	187	54,7
R: <i>IwDhn2.2</i>	CGTACCCTGACCCTGCTGAT		

### 3.18. PCR amplifikacija

Za testiranje dizajniranih prajmera korišćena je cDNK kontrolnih uzoraka (izdanci biljaka koji su bili potopljeni u vodi) i dehidriranih uzoraka (izdanci biljaka potopljeni u rastvor PEG<sub>8000</sub>, vodnog potencijala od -3MPa).

Tako dobijena cDNK je umnožena pomoću gen specifičnih prajmera u reakciji lančanog umnožavanja (PCR) (eng. *Polymerase Chain Reaction*). Sve PCR reakcije su bile ukupne zapremine 23,5 µl i postavljene su korišćenjem AmpliTaq Gold® PCR Kit (*Applied Biosystems*, Voltam, Masačusets, SAD), a sastav jedne takve reakcione smeše je prikazan u **Tabeli 9**.

**Tabela 9.** Sastav reakcione smeše za PCR

Komponente	Zapremina (µl)
H <sub>2</sub> O	15,5
10 x PCR pufer sa dodatim MgCl <sub>2</sub>	2,5
dNTP (10mM)	1,5
Forward (F) prajmer (5 µM)	1,25
Reverse (R) prajmer (5 µM)	1,25
Taq polimeraza (5 U/µl)	0,5
Odgovarajuća cDNK	1
Ukupno po reakciji	23,5

Program za PCR umnožavanje je sadržao inicijalnu denaturaciju na 95 °C u trajanju od 10 minuta, zatim 36 ciklusa denaturacije (95 °C, 30 s), vezivanja prajmera (gradijent temperature 56±3 °C, 30 s) i elongacije (72 °C, 1 minut), kao i finalnu elongaciju na 72 °C tokom 10 minuta. Temperatura vezivanja korišćenih prajmera je bila različita (*Dhn1* – 55,3 °C, *Dhn2.1* – 54,5 °C, *Dhn2.2* – 58,2 °C). PCR reakcije su se odvijale u mašini Mastercycler® nexus Gradient (*Eppendorf*, Hamburg, Nemačka).

### 3.19. Pripremanje standarda za apsolutnu kvantifikaciju prečišćavanjem PCR produkata iz gela

Prečišćavanjem PCR produkata nakon agarozne gel elektroforeze pripremljeni su standardi za qPCR. Za ekstrakciju iz gela i prečišćavanje PCR produkata korišćen je GeneJET Gel Extraction kit (*Fermentas*, Voltam, Masačusets, SAD) prema uputstvu proizvođača. Trake na gelu su vizualizovane pod UV svetlom, isečene sterilnim skalpelom i prebačene u sterilne mikrotube od 1,5 ml nakon čega je dodat vezivni pufer (eng. *Binding buffer*) u zapremini koja odgovara izmerenoj masi isečene trake 1:1 (v/m). Uzorci su inkubirani u vodenom kupatilu na 60 °C do otapanja gela. Kada se gel otopio, dodat je 100% izopropanol u odnosu 1:2 (v/v) i uzorci su mućkani na vorteksu 5 s, a zatim naneti na kolone za prečišćavanje (eng. *Purification column*) i centrifugirani 1 minut na 12000 g. Filtrat je odbačen, a na vrh kolone je dodato 700 µl pufera za ispiranje (eng. *Wash buffer*) i centrifugirano je 1 minut na 12000 g. Filtrat je odbačen, a kolone su još jednom centrifugirane u trajanju od 1 minuta na 12000 g. Prečišćeni PCR fragmenti su eluirani sa kolone dodatkom 50 µl

elucionog pufera (eng. *Elution buffer*) i centrifugiranjem 1 minut na 12000 g. Koncentracija prečišćenih PCR produkata je određena spektrofotometrijski i na osnovu nje su napravljena odgovarajuća razblaženja DNK za standardnu krivu (od  $10^9$ - $10^2$  kopija).

### 3.20. Određivanje nivoa ekspresije gena metodom kvantitativnog RT-PCR (qRT-PCR)

Nivo ekspresije analiziranih gena određivan je metodom kvantitativnog RT-PCR (qRT-PCR), korišćenjem Maxima SYBR Green/Rox qPCR Master Mix-a (*Thermo Fisher Scientific, Voltam, Masačusets, SAD*) u mašini QuantStudio™ 3 Real-Time PCR (*Thermo Fisher Scientific, Voltam, Masačusets, SAD*). Ovaj Master Mix predstavlja smešu Taq-DNK polimeraze, dNTP-ova, SYBR Green boje, kao i referentne ROX boje, u odgovarajućem puferu. U reakcione smeše (**Tabela 10.**) dodato je po 1  $\mu$ l odgovarajuće cDNK. Ova cDNK dobijena je po prethodno opisanom protokolu reverznom transkripcijom 100 ng ukupnih RNK. Za svaki gen postavljena je kontrola bez cDNK (NTC) (eng. *Non Template Control*), koja je umesto cDNK sadržala 1  $\mu$ l H<sub>2</sub>O.

**Tabela 10.** Sastav reakcione smeše za qRT-PCR

Komponente	Zapremina ( $\mu$ l)
H <sub>2</sub> O	2,8
SYBR Master Mix	5
F prajmer (5 $\mu$ M)	0,6
R prajmer (5 $\mu$ M)	0,6
cDNK/standard	1
Ukupno	10

Sve qPCR reakcije su se odvijale po sledećem postupku:

- inicijalna denaturacija (10 minuta, 95 °C),
- denaturacija – 36 ciklusa (30 s, 95 °C),
- vezivanje prajmera 36 ciklusa (30 s, temperatura vezivanja zavisi od prajmera),
- elongacija – 36 ciklusa (30 s, 72 °C),
- analiza krive topljenja.

Sve qRT-PCR reakcije su nanošene na ploču u tri biološka ponavljanja na sistemu QuantStudio™ 3 Real-Time PCR (*Thermo Fisher Scientific, Voltam, Masačusets, SAD*). Specifičnost prajmera je utvrđena analizom topljenja produkata amplifikacije. Standardi za apsolutnu kvantifikaciju su pripremljeni serijskim razblaživanjem prečišćenih PCR produkata u rasponu od  $10^9$ - $10^2$  kopija dsDNK/ $\mu$ l. Dobijeni rezultati su analizirani softverskim programom QuantStudio™ Design&Analysis (*Thermo Fisher Scientific, Voltam, Masačusets, SAD*).



### 3.21. Statistička obrada podataka

Svi eksperimenti koji su urađeni sa *I. walleriana* gajenim *in vitro* su ponovljeni tri puta i korišćeno je po pet biljaka za svaki tretman, a rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška (SE). Brojčani podaci su obrađeni primenom softverskog programa Statistica 10 (*StatSoft*, Hamburg, Nemačka). Za određivanje statistički značajnih razlika između srednjih vrednosti korišćena je analiza varijanse (ANOVA), a srednje vrednosti su upoređene korišćenjem Fišerovog (Fisher) LSD post hoc testa (eng. *Least Significant Difference*) ( $p \leq 0,05$ ). Grafičko predstavljanje rezultata urađeno je pomoću računarskog programa Microsoft Office Excel 2010 (*Microsoft Corporation*, Redmond, Vašington, SAD).

Broj cvetova i pupoljaka *I. walleriana* gajenih *ex vitro* je analiziran Poasonovom regresijom. U okviru svakog vremena uzorkovanja (T0, T1, T2, T3 i T4) korišćen je osnovni linearni Poasonov model, a ispitivan je uticaj faktora dehidracije i SA, kao i njihove međusobne interakcije. Utvrđeno je da dehidracija ima statistički značajan efekat u okviru T2, T3 i T4. Upoređivanje srednjih vrednosti broja cvetova i pupoljaka urađeno je u ovim vremenskim tačkama (W+WS grupa je upoređena sa D+DS grupom); p-vrednosti dobijene iz ovih poređenja su prilagođene korišćenjem FDR (eng. *False Discovery Rate*) metode (Benjanini i Hocheberg, 1995).

RWC, MDA i koncentracija prolina u *I. walleriana* gajenih *ex vitro* analizirana je korišćenjem trofaktorijalne analize varijanse (eng. *Three-way ANOVA*), a ispitivani su uticaji faktora dehidracije, SA i vremena, kao i njihove interakcije na nivou značajnosti  $p < 0,05$ . Srednje vrednosti upoređene su pomoću Njuman-Kelsovog (Newman-Keul) post-hoc testa ( $p < 0,05$ ). Grafičko predstavljanje rezultata urađeno je pomoću računarskog programa Microsoft Office Excel 2010 (*Microsoft Corporation*, Redmond, Vašington, SAD).

Na osnovu dobijenih prosečnih Ct vrednosti triplikata uzoraka (svi uzorci su nanošeni na mikrotitar ploču u triplikatu iz tri biološka ponavljanja) i endogene kontrole (gen za 18S rRNK) izračunata je razlika u ekspresiji dehidrinskih gena korišćenjem  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  metode (Livak i Schmittgen, 2001). Za gene sa detektovanom ekspresijom u većini uzoraka, relativne Ct vrednosti su statistički upoređene korišćenjem trofaktorijalne analize varijanse (eng. *Three-way ANOVA*), analizirana je značajnost faktora dehidracije, SA i vremena, kao i njihove interakcije. Utvrđeno je da na ekspresiju *IwDhn1* gena samo dehidracija imala statistički značajan efekat pa poređenje srednjih vrednosti između tretmana nije rađeno. Na ekspresiju *IwDhn2.1* uticaj sva tri ispitivana faktora je statistički značajan, pa je urađeno poređenje srednjih vrednosti u okviru svakog vremena uzorkovanja (T0-T4) korišćenjem Takijevoog testa. Za *IwDhn2.2* zbog nehomogenosti varijanse između uzoraka korišćena je Velšova analiza varijanse (Welch, 1947).

Arhitektura dehidrina shematski je prikazana korišćenjem ragp R paketa (R core team; Dragičević i sar., 2019) koji koristi hmmscan predviđanja kako bi odredila domene (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/hmmer/search/hmmscan>), i Esprit web server (Walsh i sar., 2013) kako bi se utvrdile pozicije neuređenih regiona proteina. Specifični motivi dehidrina su identifikovani pretraživanjem u R ili korišćenjem obrazaca podudaranja u Biostrings paketu (Pagés i sar., 2019).

## 4. Rezultati

### 4.1. Uticaj egzogene primene SA na biljke *I. walleriana* gajene *in vitro* u uslovima PEG indukovanog vodnog stresa

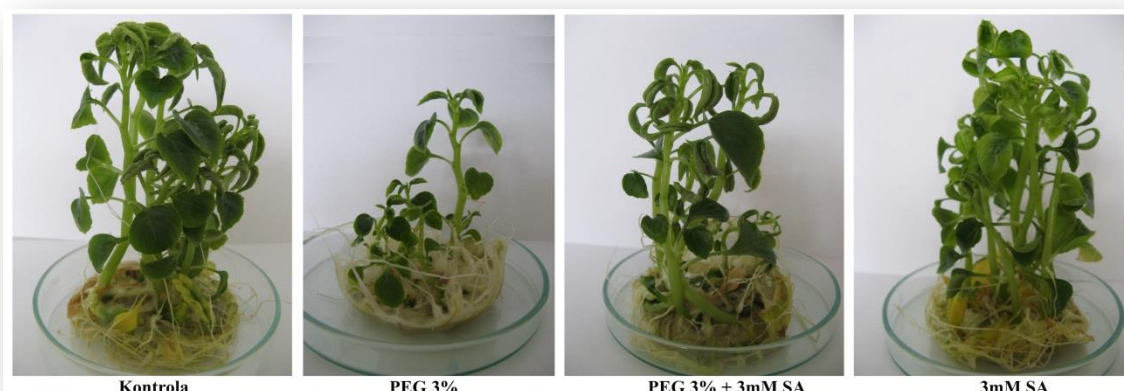
U okviru ove disertacije ispitan je efekat egzogene primene SA na biljke *I. walleriana* gajene *in vitro* u uslovima vodnog stresa.

Vodni stres kod biljaka *I. walleriana* izazvan je dodavanjem PEG (1, 2 ili 3%) u hranjivu podlogu. Takođe, u hranjivu podlogu dodavana je i SA (1, 2 ili 3 mM). Kontrolu su predstavljale biljke koje su gajene na hranljivoj podlozi bez PEG i SA.

Biljne kulture su gajene u uslovima dugog dana i nakon 60 dana određeni su morfološki parametri: visina, masa svežih izdanaka, broj izdanaka i listova po biljci. Određeni su i sledeći fiziološki parametri: RWC, LWL, sadržaj hlorofila, kao i ukupan sadržaj fotosintetičkih pigmenata. Da bi se utvrdio nivo oksidativnog i osmotskog stresa, kao sekundarnih stresova koji prate vodni stres, u listovima biljaka *I. walleriana* određen je sadržaj H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, MDA i prolina, kao i aktivnost antioksidativnih enzima (SOD, CAT i POX).

#### 4.1.1. Uticaj SA na morfologiju izdanaka biljaka *I. walleriana* gajenih *in vitro* u uslovima vodnog stresa

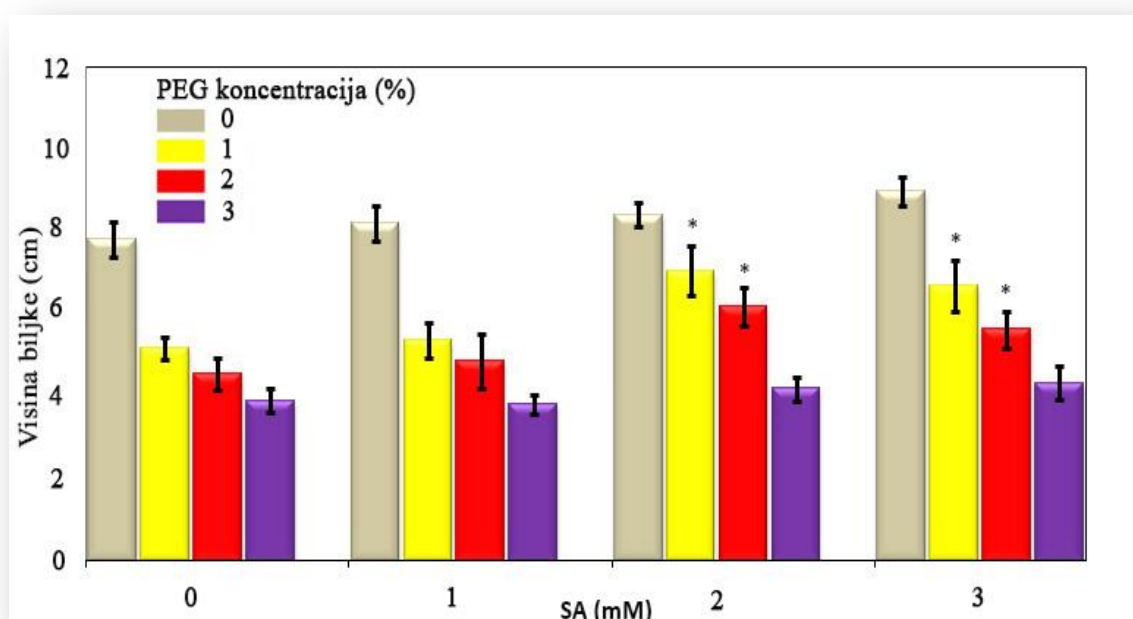
Uticaj PEG i SA na rastenje biljaka *I. walleriana* nakon 60 dana gajenja u kulturi *in vitro* prikazan je na **Slici 20**.



**Slika 20.** Efekat PEG i SA na rastenje i morfologiju *in vitro* gajenih biljaka *I. walleriana*

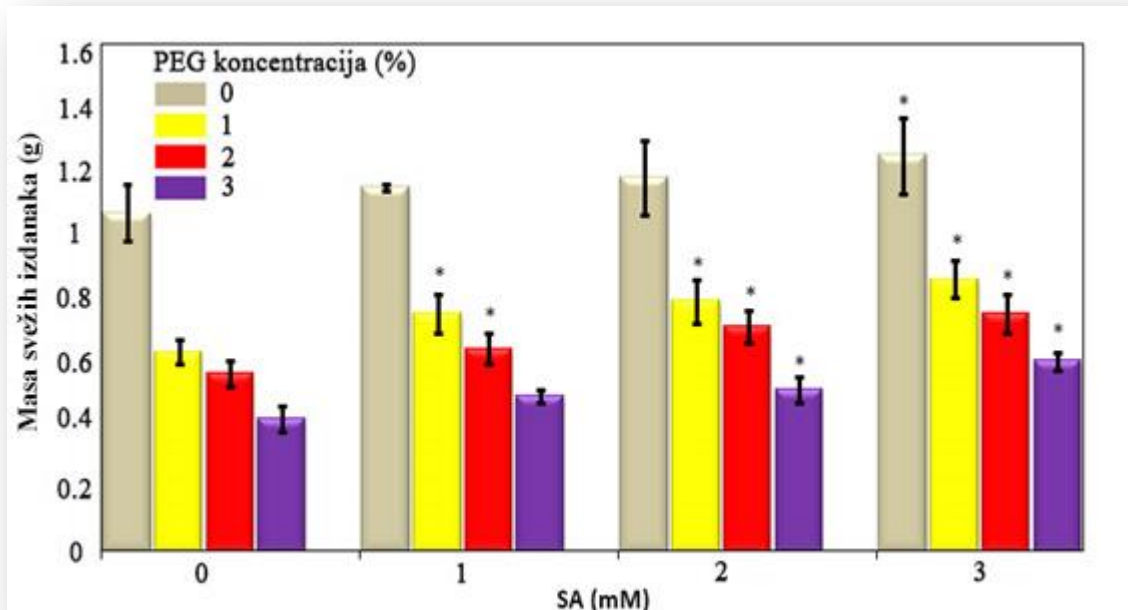
Ispitan je uticaj različitih koncentracija PEG i SA pojedinačno, kao i njihovo zbirno delovanje na morfološke parametre rastenja i razvića biljaka *I. walleriana* starih 60 dana određivanjem visine izdanaka i biomase svežeg nadzemnog dela biljaka, kao i broja novoformiranih izdanaka i listova.

Povećanje koncentracije PEG u hranljivoj podlozi koje je ekvivalentno sniženju  $\Psi_w$  u podlozi, odnosno intenziviranju vodnog stresa, dovodi do značajnog smanjenja visine biljaka *I. walleriana* (Slika 20. i Slika 21.). U kontrolnim uslovima visina izdanaka iznosila je 7,81cm dok je na medijumu sa 3% PEG iznosila 3,89 cm, što predstavlja smanjenje visine izdanaka biljaka od skoro 50%. U odsustvu vodnog stresa, dodatak SA u hranljivu podlogu nije doveo do značajnih razlika u visini biljaka u odnosu na kontrolu, bez obzira na primenjene koncentracije SA (8,19 cm – 1 mM SA; 8,39 cm – 2 mM SA; 8,97 cm – 3 mM SA). Sa dodatkom PEG (1 i 2%) u kombinaciji sa SA (1 mM) u hranljivu podlogu, dolazi do neznatnog povećanja prosečne visine izdanaka biljaka u odnosu na prosečnu visinu kada se u hranljivoj podlozi nalazi samo PEG (1 i 2%). Najbolji efekat se postiže u prisustvu 2 mM SA, pri blagom i umerenom vodnom stresu (PEG 1 i 2%). Na ovim hranljivim podlogama dolazi do povećanja prosečne visine izdanaka biljaka za oko 35% u odnosu na kontrolu (Slika 21.). Pri koncentraciji PEG od 3%, dodatak SA bilo koje koncentracije nije ublažilo efekte vodnog stresa kada je ovaj morfološki parametar u pitanju.



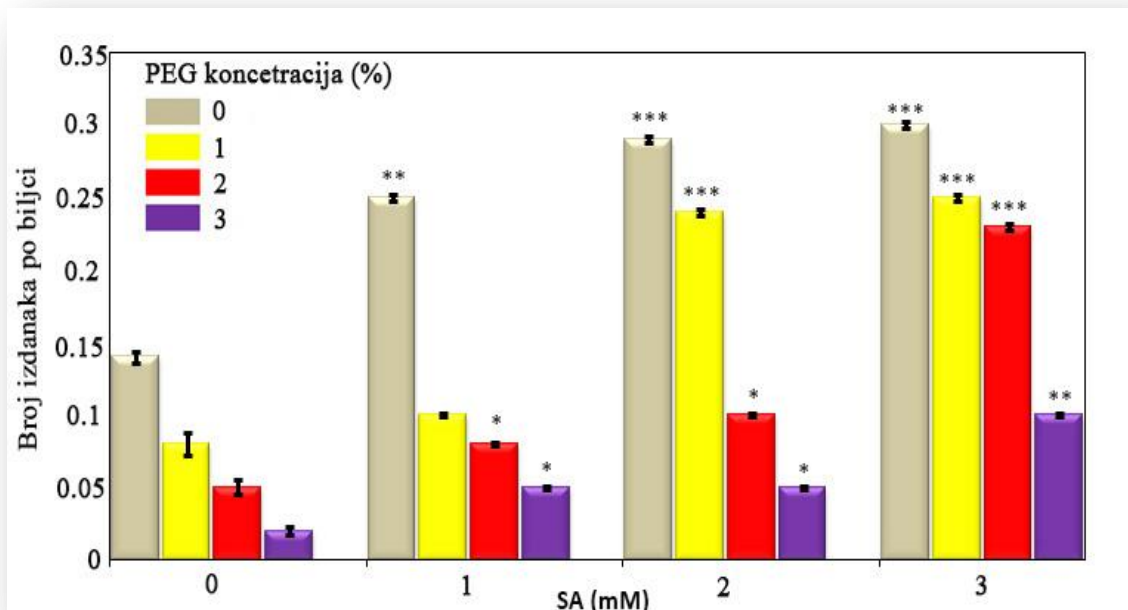
**Slika 21.** Efekat PEG i SA na visinu izdanaka biljaka *I. walleriana* gajenih *in vitro*. Podaci prikazani na grafiku predstavljaju srednje vrednosti  $\pm$  SE. Statistički značajne razlike u odnosu na kontrolne vrednosti (LSD test), u okviru istog PEG tretmana su obeležene zvezdicom (\* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$ ).

Kod biljaka *I. walleriana* gajenih *in vitro* u uslovima PEG indukovano vodnog stresa i u prisustvu SA, praćena je i masa izdanaka čija je prosečna vrednost na osnovnoj podlozi bez dodatka PEG i SA iznosila 1,07 g (Slika 22.). Sa dodatkom PEG u hranljivu podlogu dolazi do proporcionalnog smanjenja mase svežih izdanaka. Što je veća koncentracija PEG u podlozi, biljke su tako izložene jačem vodnom stresu, te dolazi i do većeg smanjenja mase izdanaka. Na hranljivoj podlozi sa 3% PEG prosečna masa svežih izdanaka iznosila je 0,42 g što je smanjenje od oko 60% u odnosu na prosečnu masu svežih izdanaka biljaka gajenih na osnovnoj podlozi bez dodatka PEG. Dodatak samo SA u hranljivu podlogu pri nižim koncentracijama nije imalo značajnijeg uticaja na masu svežih izdanaka, izuzev u koncentraciji od 3 mM, pri kojoj je došlo do značajnog povećanja prosečne mase izdanaka (približno 17%) u odnosu na prosečnu masu svežih izdanaka biljaka gajenih na osnovnoj podlozi bez dodatka SA. Primećeno je da na hranljivim podlogama koje su sadržale kombinacije PEG i SA, SA tada dovodi do povećanja mase svežih izdanaka kada se rezultati uporede sa onim dobijenim na hranljivim podlogama koje su u svom sastavu imale samo PEG, osim u kombinaciji 1 mM SA i 3% PEG u odnosu na 3% PEG bez SA.



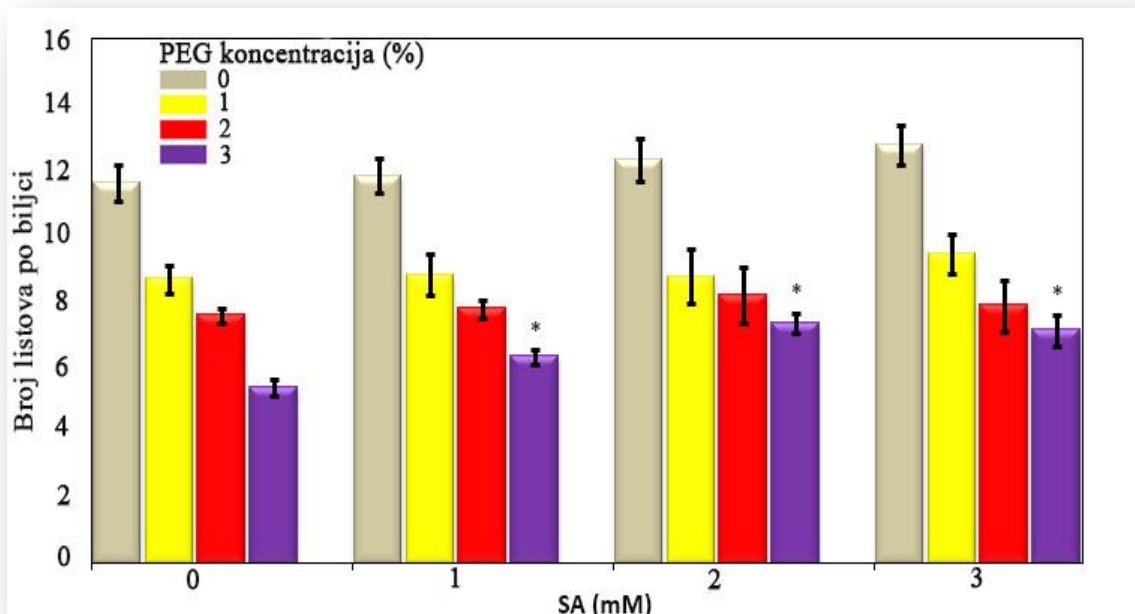
**Slika 22.** Efekat PEG i SA na masu svežih izdanaka biljaka *I. walleriana* gajenih *in vitro*. Podaci prikazani na grafiku predstavljaju srednje vrednosti  $\pm$  SE. Statistički značajne razlike u odnosu na kontrolne vrednosti (LSD test), u okviru istog PEG tretmana su obeležene zvezdicom (\* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$ ).

Kod biljaka *I. walleriana* gajenih *in vitro* na hranljivoj podlozi sa različitim koncentracijama PEG konstatovano je smanjenje broja novoformiranih izdanaka po biljci (**Slika 23.**). Pri višim koncentracijama PEG u hranljivoj podlozi, odnosno u uslovima intenzivnijeg vodnog stresa, dolazi i do većeg smanjenja prodečnog broja izdanaka po biljci. Na hranljivoj podlozi sa 3% PEG prosečan broj izdanaka po biljci se smanjio 7 puta u odnosu na kontrolu. SA tretmani doveli su do značajnog povećanja prosečnog broja izdanaka po biljci u odnosu na kontrolu; na podlozi sa 3 mM SA dolazi do najvećeg povećanja broja izdanaka po biljci od 2 puta u odnosu na kontrolu. U tretmanima sa SA i PEG u hranljivoj podlozi, SA u većini primenjenih koncentracija dovodi do povećanja broja novoformiranih izdanaka u odnosu na tretmane gde je u hranljivoj podlozi dodavan samo PEG, izuzev tretmana sa 1 mM SA i 1% PEG u odnosu na hranljivu podlogu samo sa 1% PEG. Dodavanje SA u koncentraciji od 3 mM hranjivim podlogama sa 1 i 2% PEG (blag i umeren vodni stres), kao i dodavanje 2 mM SA hranljivoj podlozi sa 1% PEG dovodi do povećanja prosečnog broja izdanaka u odnosu na kontrolu i to za oko 1,8 puta.



**Slika 23.** Efekat PEG i SA na broj izdanaka biljaka *I. walleriana* gajenih *in vitro*. Podaci prikazani na grafiku predstavljaju srednje vrednosti  $\pm$  SE. Statistički značajne razlike u odnosu na kontrolne vrednosti (LSD test), u okviru istog PEG tretmana su obeležene zvezdicom (\* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$ ).

U kulturi izdanaka *I. walleriana* koje su 60 dana gajene na hranljivoj podlozi sa različitim koncentracijama PEG, uočeno je linearno smanjenje broja listova po izdanku (**Slika 24.**). Sa povećanjem koncentracije PEG, povećava se i intenzitet vodnog stresa, što proporcionalno dovodi do smanjenja broja listova po biljci. U kontroli prosečan broj listova po biljci iznosio je 11,60, dok je na hranljivoj podlozi sa 1% PEG, prosečan broj listova po biljci bio 8,67 (smanjenje od 25,3% u odnosu na kontrolu), sa 2% PEG je bio 7,55 (smanjenje od 34,9%), dok je prosečan broj listova po biljci iznosio 5,35 na hranljivoj podlozi sa 3% PEG, što je predstavljalo najveće smanjenje prosečnog broja listova od 53,8% u odnosu na kontrolu. Dodatak SA u hranljivu podlogu bez PEG nije doveo do značajne promene u prosečnom broju listova po biljci, bez obzira na primenjenu koncentraciju SA. Dobijeni rezultati ukazuju da je do značajne promene u prosečnom broju listova došlo na hranljivoj podlozi pri intenzivnom vodnom stresu indukovanim 3% PEG uz primenu sve tri koncentracije SA (1, 2 i 3 mM) u odnosu na broj listova biljaka *I. wallerijana* gajenih na hranljivoj podlozi sa 3% PEG bez SA.



**Slika 24.** Efekat PEG i SA na broj listova biljaka *I. walleriana* gajenih *in vitro*. Podaci prikazani na grafiku predstavljaju srednje vrednosti  $\pm$  SE. Statistički značajne razlike u odnosu na kontrolne vrednosti (LSD test), u okviru istog PEG tretmana su obeležene zvezdicom (\* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$ ).

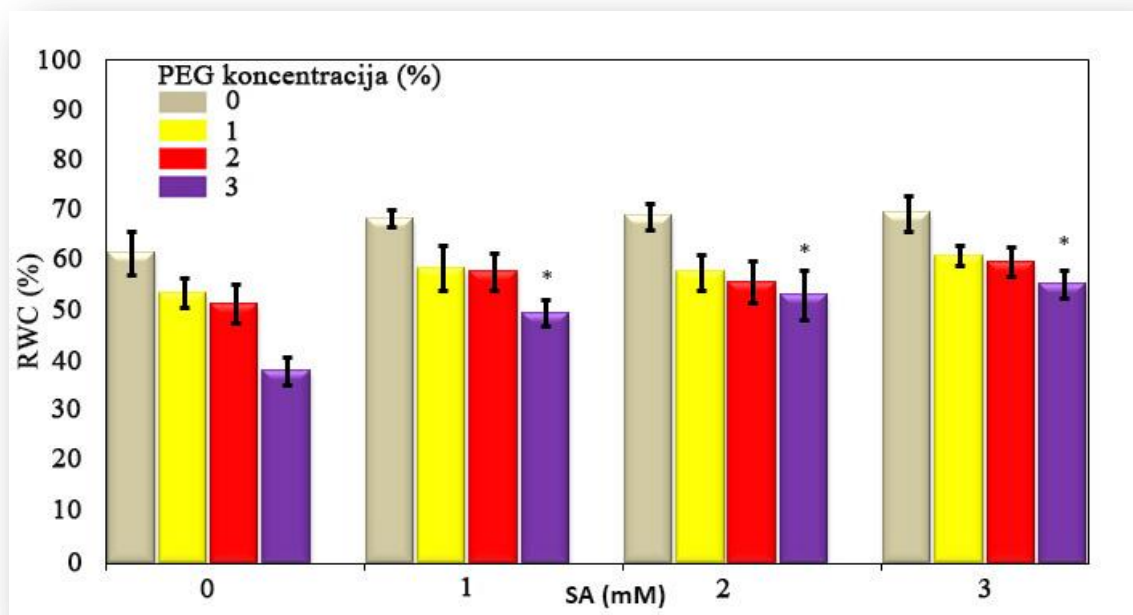
Kod biljaka *I. walleriana* gajenih *in vitro* primenjeni PEG tretmani su uticali na većinu praćenih morfolometrijskih parametara, generalno sa porastom intenziteta vodnog stresa dolazi do smanjenja visine biljke, mase svežih biljaka, broja izdanaka i listova po biljci. Egzogeno primena SA je u većini slučajeva smanjila negativni uticaj vodnog stresa na biljke, pri čemu je SA u koncentraciji od 2 i 3 mM pokazala najdelotvorniji efekat. Sama SA u odsustvu vodnog stresa dovodi jedino do značajnog povećanja broja izdanaka po biljci u svim primenjenim koncentracijama.

#### 4.1.2. Efekat SA na nivo hidratacije izdanaka i sadržaj fotosintetskih pigmenata u listovima biljaka *I. walleriana* gajenih *in vitro* u uslovima PEG indukovnog vodnog stresa

Pored rastenja i razvića biljaka, proučavan je i efekat egzogene primene SA na nivo hidratacije biljaka i fotosintetske pigmente u listovima *I. walleriana* u uslovima vodnog stresa. Praćeni su sledeći parametri: RWC u izdancima, kao i LWL, a sadržaj ukupnih hlorofila i karotenoida u listovima.

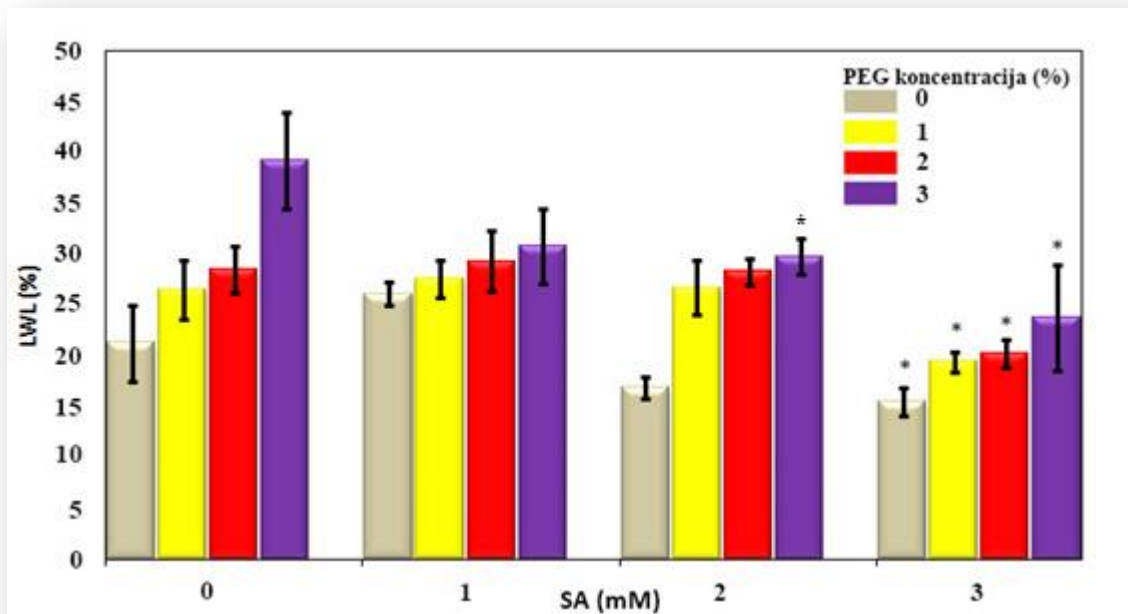
RWC predstavlja parametar koji može ukazati na intezitet vodnog stresa kojem je biljka izložena. Dodatak PEG u hranjivu podlogu doveo je do smanjenja RWC u izdancima biljaka *I. walleriana* i to na hranljivoj podlozi sa 1% PEG za 8%, 2% PEG za 10% i 3% PEG za 23% u odnosu na kontrolu (**Slika 25.**). Ovi rezultati ukazuju da sa snižavanjem  $\Psi_w$  podloge dolazi do sve značajnijeg smanjenja RWC u izdancima biljaka *I. walleriana*. Primena SA u hranljivoj podlozi, u odsustvu vodnog stresa, ne dovodi do značajnih promena RWC u izdancima (**Slika 25.**). Međutim, egzogeno primena SA u uslovima intenzivnog vodnog stresa (3% PEG) dovodi do povećanja RWC

u izdancima i to pri svim primenjenim koncentracijama SA; zabeleženo je povećanje RWC u izdancima od 38,16% do 55,3% u odnosu na kontrolu. Ovi rezultati ukazuju da SA ima pozitivan uticaj na RWC u izdancima biljaka *I. walleriana* kada su izložene vodnom stresu.



**Slika 25.** Efekat PEG i SA na RWC u izdancima biljaka *I. walleriana* gajenih *in vitro*. Podaci prikazani na grafiku predstavljaju srednje vrednosti  $\pm$  SE. Statistički značajne razlike u odnosu na kontrolne vrednosti (LSD test), u okviru istog PEG tretmana su obeležene zvezdicom (\* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$ ).

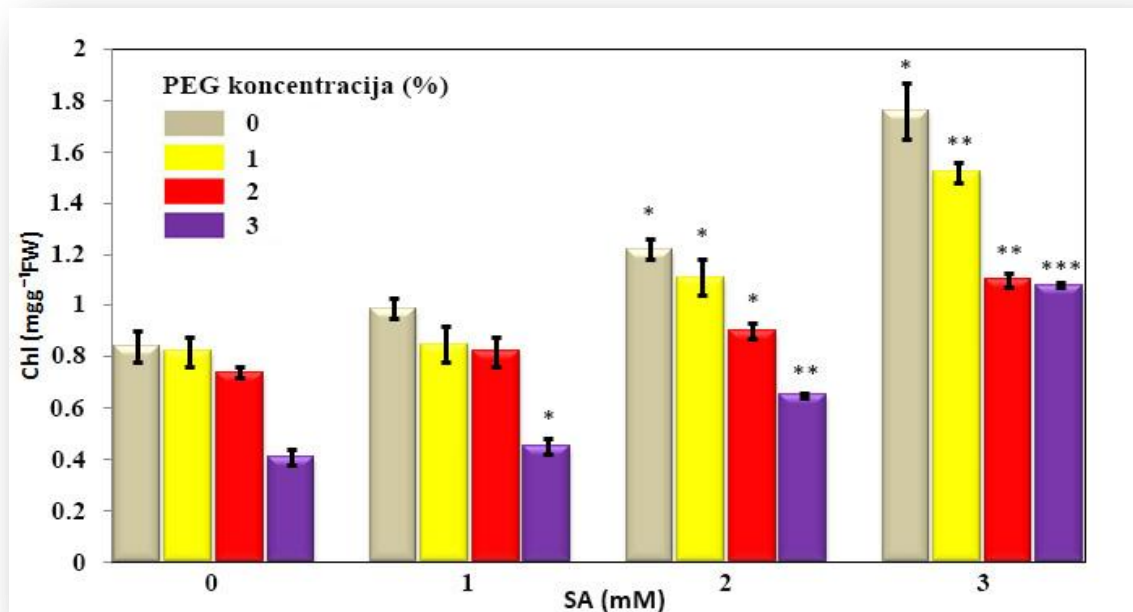
LWL predstavlja još jedan značajan parametar nivoa hidratisanosti biljaka kao i pokazatelj u kakvim stresnim uslovima se nalaze ispitivane biljke. U slučaju ovog parametra, dodatak PEG u hranljivu podlogu dovodi do linearnog povećanja LWL sa povećanjem koncentracije PEG, od početnih 21,27% koliko je iznosio LWL na osnovnom medijumu (kontrola) do 39,23% na podlozi sa 3% PEG) (**Slika 26.**). Dodatak 3 mM SA u hranljivu podlogu u odsustvu PEG indukovano vodnog stresa dovodi do smanjenja LWL za 15,53% u odnosu na kontrolu. U uslovima PEG indukovano vodnog stresa uz prisustvo SA, SA ima pozitivan efekat na biljke i dovodi do smanjenja LWL u svim ispitivanim koncentracijama, a najveći efekat ima u koncentraciji od 3 mM. Na osnovu ovih rezultata možemo reći da SA ima efekta u zaštiti od PEG indukovano vodnog stresa kada je ovaj parametar u pitanju.



**Slika 26.** Efekat PEG i SA na LWL kod biljaka *I. walleriana* gajenih *in vitro*. Podaci prikazani na grafiku predstavljaju srednje vrednosti  $\pm$  SE. Statistički značajne razlike u odnosu na kontrolne vrednosti (LSD test), u okviru istog PEG tretmana su obeležene zvezdicom (\* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$ ).

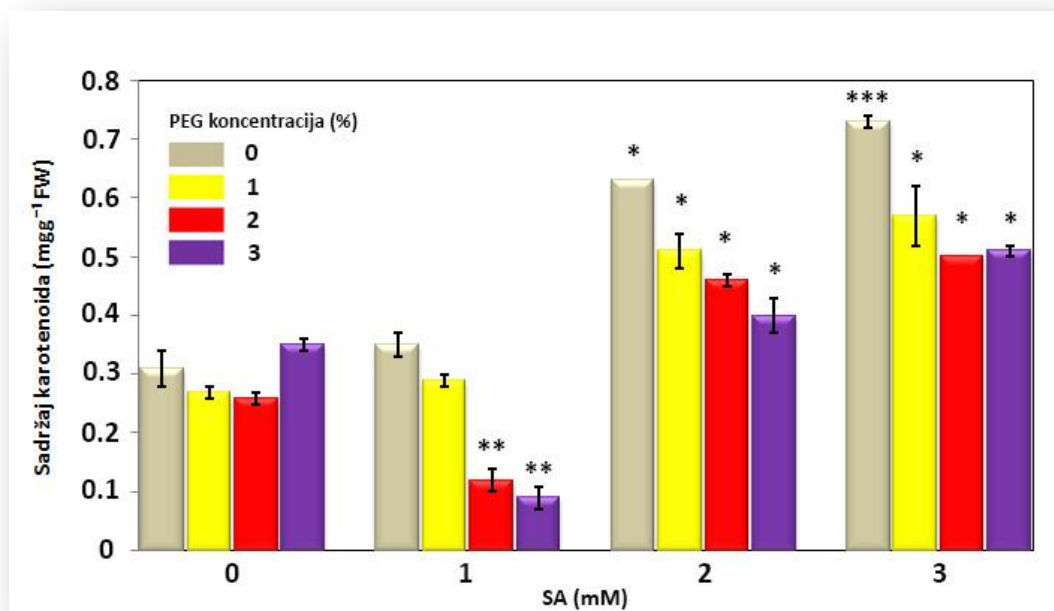
Vodni stres ima negativan uticaj na fotosintezu kod biljaka, često i na zastupljenost fotosintetskih pigmenata, pa je ispitivan uticaj PEG-indukovanog vodnog stresa i SA na sadržaj ukupnih hlorofila (chl a i chl b), karotenoida, kao i na sadržaj ukupnih fotosintetskih pigmenata (ukupni hlorofili + karotenoidi) u listovima biljaka *I. walleriana* gajenih *in vitro* (**Slika 27.**). Sadržaj fotosintetskih pigmenata varirao je u zavisnosti od primenjenog tretmana. U uslovima PEG indukovanog vodnog stresa došlo je do smanjenja koncentracije ukupnih hlorofila u listovima u odnosu na sadržaj ovih pigmenata u listovima biljaka gajenih na hranljivoj podlozi bez dodatka PEG i SA (kontrolu). Najveći efekat PEG na sadržaj ukupnih hlorofila u listovima je zabeležen pri koncentraciji od 3%. Kod biljaka *I. walleriana* gajenih na hranljivoj podlozi bez dodatka PEG i SA sadržaj ukupnih hlorofila u listovima iznosio je  $0,84 \text{ mg g}^{-1}$  svežeg biljnog materijala, dok je na hranljivoj podlozi sa 3% PEG-a iznosila  $0,41 \text{ mg g}^{-1}$  svežih listova, što je smanjenje od 50%. Dodatak samo SA u hranljivu podlogu dovodi do linearnog povećanja sadržaja ukupnih hlorofila koje prati povećanje koncentracije SA. Značajno povećanje sadržaja ukupnih hlorofila je uočeno na koncentracijama SA od 2 i 3 mM i to za 1,3, odnosno 2 puta u odnosu na kontrolu. SA je imala efekat i na povećanje sadržaja ukupnih hlorofila i kada je u podlozi prisutan PEG i to u svim primenjenim koncentracijama SA, a najveći efekat je uočen pri koncentraciji SA od 3 mM.





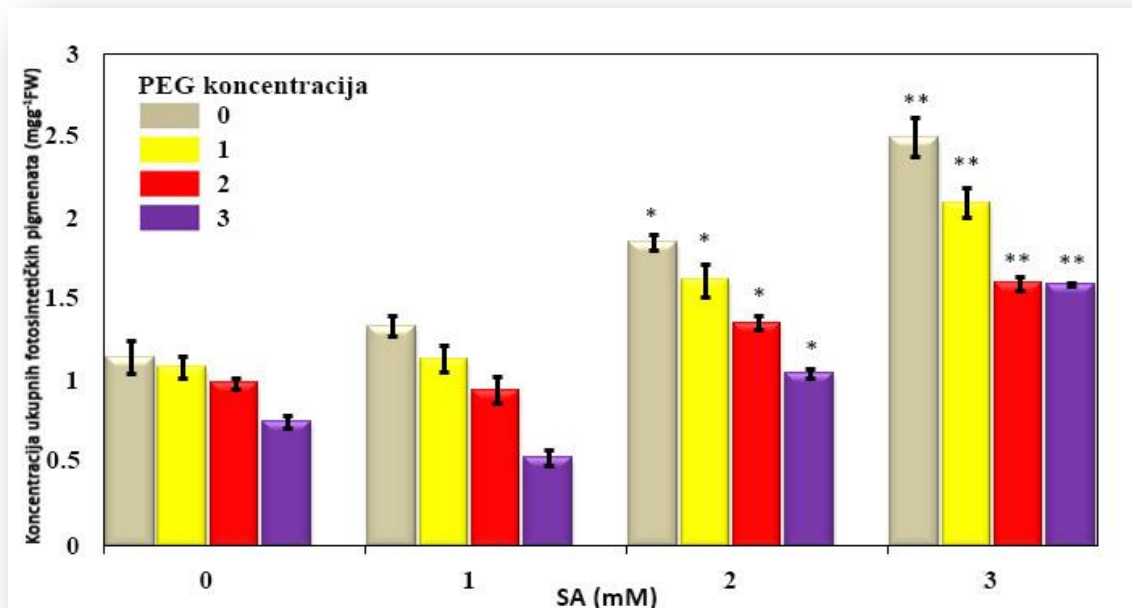
**Slika 27.** Efekat PEG i SA na sadržaj ukupnih hlorofila u listovima biljaka *I. walleriana* gajenih *in vitro*. Podaci prikazani na grafiku predstavljaju srednje vrednosti  $\pm$  SE. Statistički značajne razlike u odnosu na kontrolne vrednosti (LSD test), u okviru istog PEG tretmana su obeležene zvezdicom (\* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$ ).

PEG indukovani vodni stres nema efekta na sadržaj karotenoida (**Slika 28.**). Dodatak SA u hranljivu podlogu u odsustvu vodnog stresa dovodi do značajnog povećanja ukupnih karotenoida za 43% pri primeni 2 mM SA i za 57% pri primeni 3 mM SA u odnosu na kontrolu. Primena SA u uslovima PEG indukovano vodnog stresa dovela je do značajnog povećanja sadržaja karotenoida jedino pri većim koncentracijama, 2 i 3 mM. Generalno sa povećanjem koncentracije PEG u podlozi, a u okviru jedne primenjene koncentracije SA, dolazi do smanjenja sadržaja karotenoida što ukazuje na to da se efekat primenjene koncentracije SA smanjuje sa povećanjem intenziteta vodnog stresa. Pri primeni 3 mM SA i 3% PEG sadržaj karotenoida se povećao 1,8 puta u odnosu na kontrolu, dok se na podlozi sa 3 mM SA sadržaj karotenoida povećao 2,35 puta u odnosu na kontrolu. Na osnovu rezultata možemo da kažemo da primena SA u koncentracijama od 2 i 3 mM dovodi do povećanja sadržaja karotenoida, koji predstavljaju zaštitne fotosintetske pigmente.



**Slika 28.** Efekat PEG i SA na sadržaj karotenoida u listovima biljaka *I. walleriana* gajenih *in vitro*. Podaci prikazani na grafiku predstavljaju srednje vrednosti  $\pm$  SE. Statistički značajne razlike u odnosu na kontrolne vrednosti (LSD test), u okviru istog PEG tretmana su obeležene zvezdicom (\* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$ ).

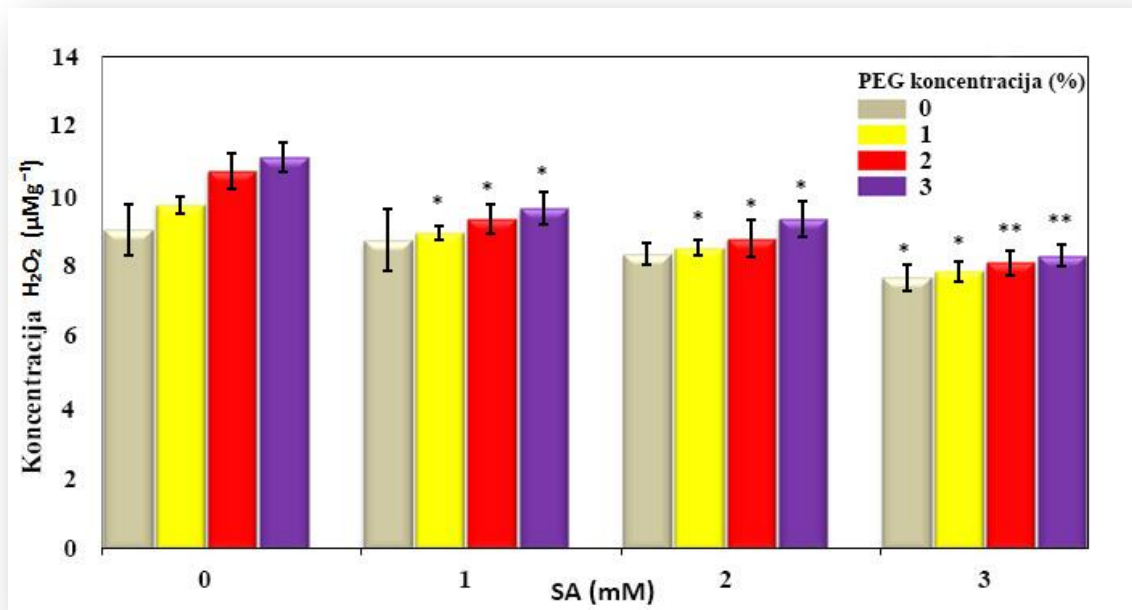
Vodni stres koji je u *in vitro* eksperimentu postignut dodatkom PEG u hranljivu podlogu doveo je do smanjenja koncentracije ukupnih fotosintetskih pigmenata, i to najviše na hranljivoj podlozi sa 3% PEG, za čak 34% u odnosu na kontrolu (**Slika 29.**). Dodatak SA u hranljivu podlogu u odsutvu stresa dovodi do povećanja koncentracije ukupnih fotosintetskih pigmenata i to značajno pri koncentracijama od 2 mM za 1,6 puta i 3 mM za 2,7 puta u odnosu na kontrolu. Primena SA u uslovima PEG indukovaniog vodnog stresa dovela je do značajnog povećanja koncentracije ukupnih fotosintetskih pigmenata jedino pri koncentracijama od 2 i 3 mM SA na svim ispitivanim koncentracijama PEG u odnosu na kontrolu. SA je suprimirala efekat PEG-indukovanog vodnog stresa na zastupljenost fotosintetskih pigmenata, a pri primeni viših koncentracija (2 i 3 mM) SA je dovela i do povećanja njihovog sadržaja. U odsustvu stresa SA je dovela do povećanja koncentracije ukupnih fotosintetskih pigmenata tako da se može reći da SA pozitivno utiče na proces fotosinteze.



**Slika 29.** Efekat PEG i SA na koncentraciju ukupnih fotosintetskih pigmenata u listovima biljaka *I. walleriana* gajenih *in vitro*. Podaci prikazani na grafiku predstavljaju srednje vrednosti  $\pm$  SE. Statistički značajne razlike u odnosu na kontrolne vrednosti (LSD test), u okviru istog PEG tretmana su obeležene zvezdicom (\* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$ ).

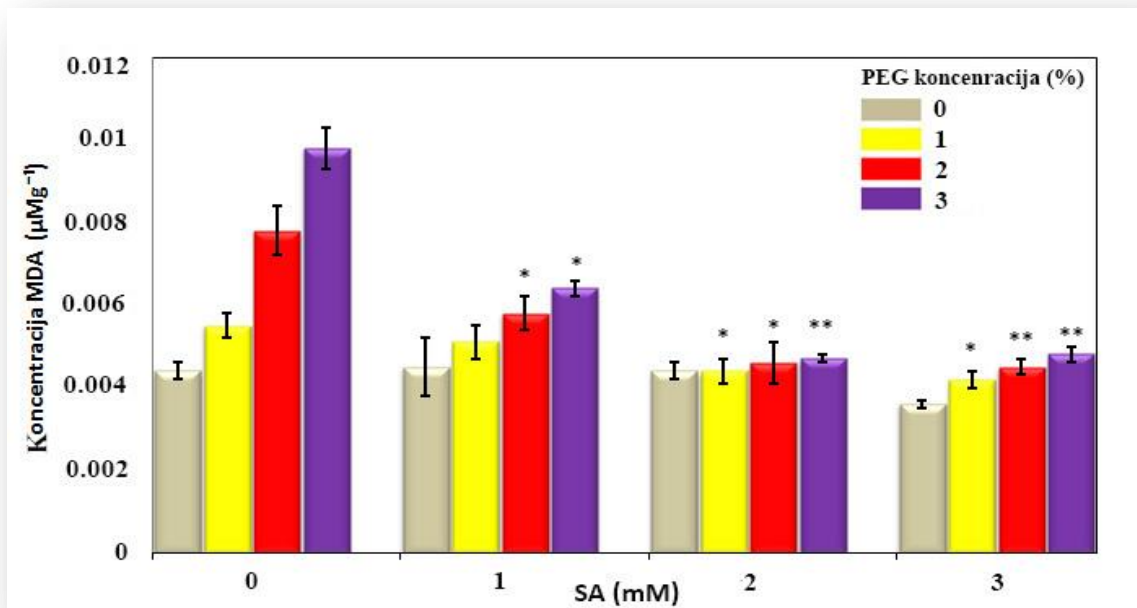
#### 4.1.3. Efekat SA na produkciju $H_2O_2$ i LP u listovima biljaka *I. walleriana* gajenih *in vitro* u uslovima PEG indukovanog vodnog stresa

Da bi se ispitaio uticaj egzogene primene SA i vodnog stresa na pojavu i intezitet sekundarnog, oksidativnog stresa u listovima biljaka *I. walleriana*, praćena je produkcija  $H_2O_2$  i nivo LP (**Slika 30.**). Na osnovu dobijenih rezultata možemo uočiti da vodni stres koji je postignut dodavanjem PEG u koncentracijama od 2 i 3% u hranjivu podlogu dovodi do povećanja koncentracije  $H_2O_2$  u listovima *I. walleriana*. U kontrolnim uslovima koncentracija  $H_2O_2$  iznosi  $9,07 \mu\text{Mg}^{-1}$  mase svežih listova, dok na tretmanima sa 2% PEG iznosi  $10,75 \mu\text{Mg}^{-1}$ , a na 3% PEG-u  $11,5 \mu\text{Mg}^{-1}$ . Dodatak samo SA u hranjivu podlogu u koncentracijama od 1 i 2 mM nije uticao na nivo  $H_2O_2$  kod biljaka, osim u slučaju koncentracije od 3 mM SA koja je dovela do smanjenja za oko 15% u odnosu na kontrolu. Međutim, u uslovima vodnog stresa sve primenjene SA koncentracije dovode do značajnog smanjenja nivoa  $H_2O_2$ . Najbolji rezultat postignut je sa 3 mM SA koji je doveo do smanjenja koncentracije  $H_2O_2$  od 15-30% u zavisnosti od primenjene koncentracije PEG.



**Slika 30.** Efekat PEG i SA na koncentraciju H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, u listovima biljaka *I. walleriana* gajenih *in vitro*. Podaci prikazani na grafiku predstavljaju srednje vrednosti ± SE. Statistički značajne razlike u odnosu na kontrolne vrednosti (LSD test), u okviru istog PEG tretmana su obeležene zvezdicom (\*P<0,05; \*\*P<0,01; \*\*\*P<0,001).

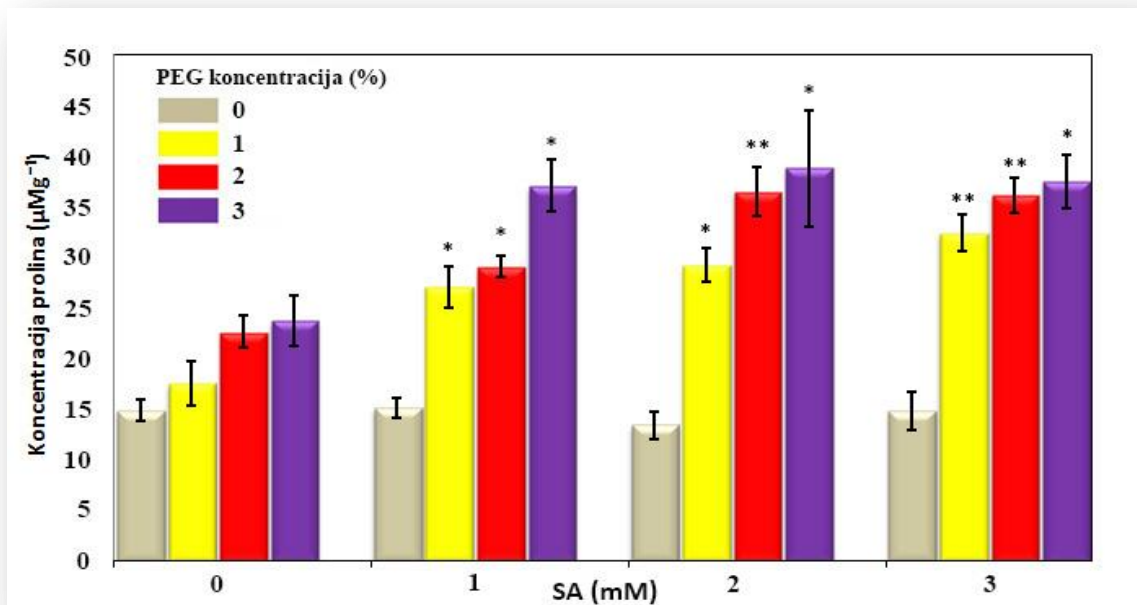
MDA je parametar koji se koristi za procenu nivoa lipidne peroksidacije, a samim tim i nivoa oksidativnog stresa. Kada je koncentracija MDA povećana, veći je nivo oksidativnog stresa i veće je oštećenje ćelijskih membrana. U korišćenom eksperimentalnom sistemu, dodatak PEG u hranljivu podlogu dovodi do povećanja MDA i to sa povećanjem koncentracije PEG raste i nivo MDA (**Slika 31.**). Na podlozi sa 3% PEG povećanje iznosi čak 2,22 puta u odnosu na kontrolu. Dodatak SA u hranljivu podlogu u odsustvu stresa ne dovodi do značajne promene nivoa MDA, bez obzira na primenjene koncentracije SA. Međutim, SA u uslovima PEG-indukovanog vodnog stresa u koncentracijama od 2 i 3 mM značajno utiče na smanjenje sadržaja MDA do nivoa uočenog u kontroli. Prilikom primene 1mM došlo je do smanjenja nivoa MDA, ali ne na nivo kao u kontrolnim uslovima. Na osnovu dobijenih rezultata, može se reći da SA ima pozitivan efekat na smanjenje nivoa MDA, samim tim smanjuje i oksidativni stres kod biljaka koji se javlja kao posledica vodnog stresa i to u koncentracijama od 2 i 3 mM.



**Slika 31.** Efekat PEG i SA na koncentraciju MDA u listovima biljaka *I. walleriana* gajenih *in vitro*. Podaci prikazani na grafiku predstavljaju srednje vrednosti  $\pm$  SE. Statistički značajne razlike u odnosu na kontrolne vrednosti (LSD test), u okviru istog PEG tretmana su obeležene zvezdicom (\* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$ ).

#### 4.1.4. Uticaj SA na koncentraciju prolina u listovima biljaka *I. walleriana* gajenih *in vitro* u uslovima PEG indukovnog vodnog stresa

Pri uslovima vodnog stresa biljke akumuliraju kompatibilne osmolite, među kojima je prolin. Analiza sadržaja prolina u listovima biljaka *I. walleriana* gajenih *in vitro* ukazuje na znatno veću akumulaciju ove aminokiseline sa povećanjem koncentracije PEG u hranljivoj podlozi (**Slika 32.**). SA ne dovodi do povećanja koncentracije prolina u listovima biljaka *I. walleriana* kada one nisu izložene vodnom stresu. Primena SA u kombinovanim tretmanima sa PEG doprinosi akumulaciji prolina u biljkama i koncentracija prolina dostiže plato od  $37 \mu\text{gg}^{-1}$  mase svežih listova na podlozi sa 3% PEG bez obzira na primenjenu koncentraciju SA, što je 2,7 puta viša od koncentracije u listovima biljaka gajenih na samo osnovnoj podlozi. Prolin kao osmotski aktivan molekul omogućava osmotsko prilagođavanje biljaka u uslovima nedostatka vode i jedan je od načina na koji biljke prevazilaze vodni stres, što potvrđuju i ovi rezultati.

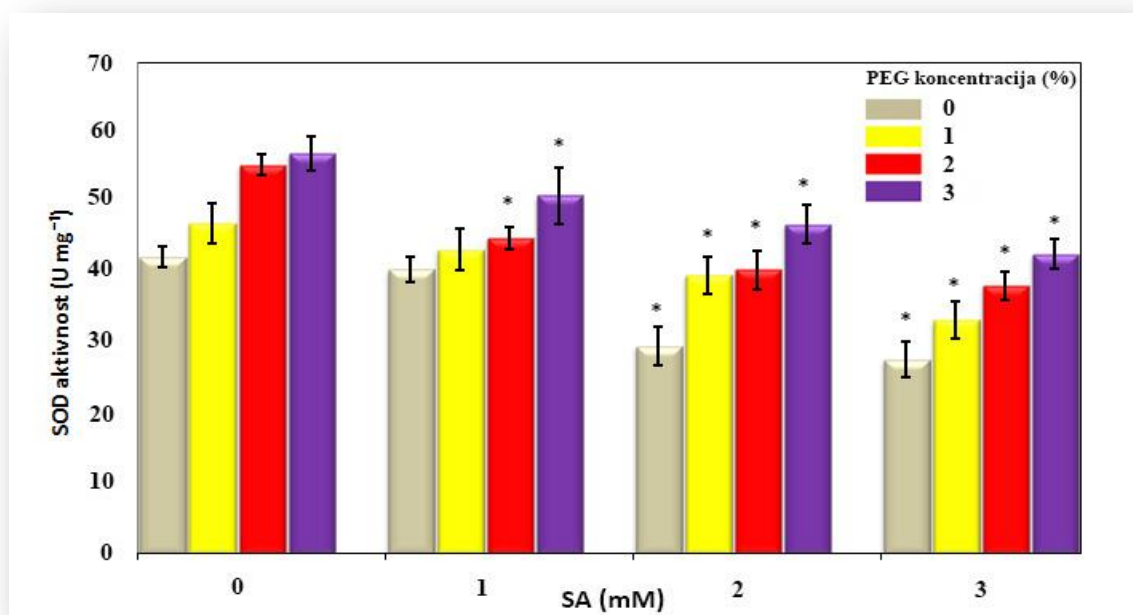


**Slika 32.** Efekat PEG i SA na koncentraciju prolina u listovima biljaka *I. walleriana* gajenih *in vitro*. Podaci prikazani na grafiku predstavljaju srednje vrednosti  $\pm$  SE. Statistički značajne razlike u odnosu na kontrolne vrednosti (LSD test), u okviru istog PEG tretmana su obeležene zvezdicom (\* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$ ).

#### 4.1.5. Efekat PEG i SA na aktivnost antioksidativnih enzima u listovima biljaka *I. walleriana* gajenih *in vitro*

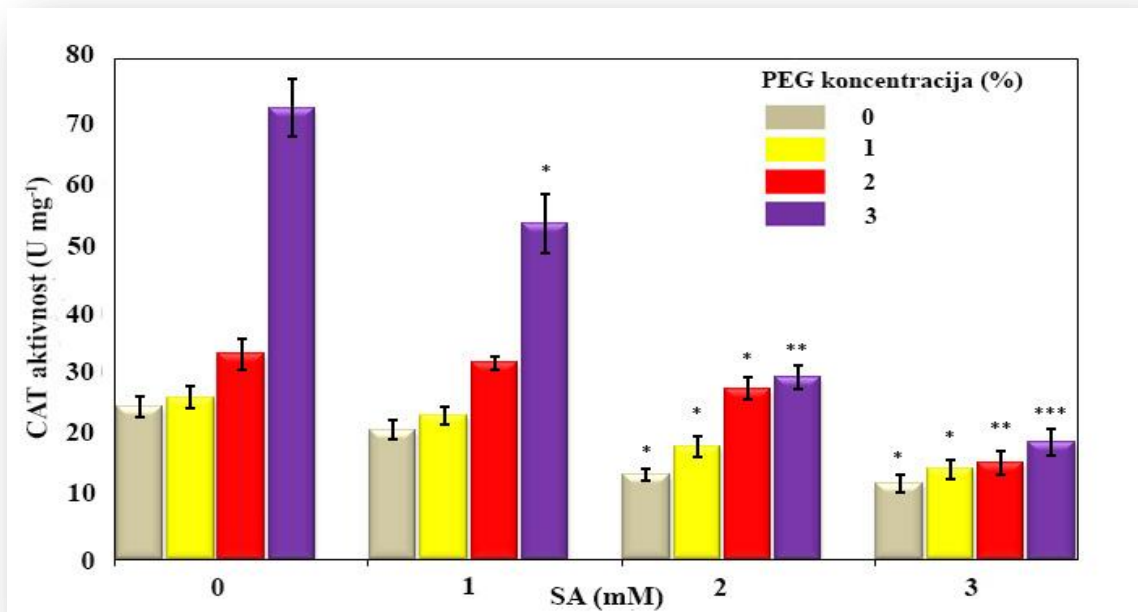
Često su vodni stres i isušivanje praćeni oksidativnim stresom kod biljaka, jer dolazi do poremećaja u elektron transportnim lancima, te tako dolazi do stvaranja ROS u ćelijama. Mitohondrije i hloroplasti su glavna mesta nastanka ROS. Do oksidativnog stresa dolazi kao rezultat poremećene ravnoteže između procesa produkcije ROS i aktivnosti antioksidativnih sistema koji su odgovorni za uklanjanje reaktivnih međuprodukata i/ili sistema koji vrše popravljavanje nastalih oštećenja. Vodni stres povećava koncentraciju ROS i time posredno dovodi do oksidativnog stresa. Aktivnost antioksidativnih enzima može da ukaže na efikasnost odbrane biljaka od oksidativnog stresa koji nastaje kao posledica vodnog stresa.

Aktivnost SOD merena je spektrofotometrijski i sa povećanjem koncentracije PEG u hranljivoj podlozi dolazi do značajnog povećanja aktivnosti ovog enzima (**Slika 33.**). Pri koncentraciji PEG od 3%, aktivnost SOD se povećava za 1,35 puta u odnosu na kontrolu. Primena SA u uslovima vodnog stresa izazvanog PEG, dovodi do smanjenja aktivnosti SOD u odnosu na kontrolu. Tako pri primeni 2 i 3 mM SA u uslovima vodnog stresa dolazi do smanjenja aktivnosti SOD u odnosu na nivo aktivnosti kada su biljke izložene samo vodnom stresu, dok je na tretmanu sa 3 mM SA i 1% PEG aktivnost SOD manja za 25% nego na osnovnoj podlozi. Primena SA u koncentraciji od 2 i 3 mM dovodi do smanjenja aktivnosti SOD pri vodnom stresu, smanjujući koncentraciju ROS što se vidi i iz rezultata produkcije H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (**Slika 30.**).



**Slika 33.** Efekat PEG i SA na aktivnost SOD u listovima biljaka *I. walleriana* gajenih *in vitro*. Podaci prikazani na grafiku predstavljaju srednje vrednosti  $\pm$  SE. Statistički značajne razlike u odnosu na kontrolne vrednosti (LSD test), u okviru istog PEG tretmana su obeležene zvezdicom (\* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$ ).

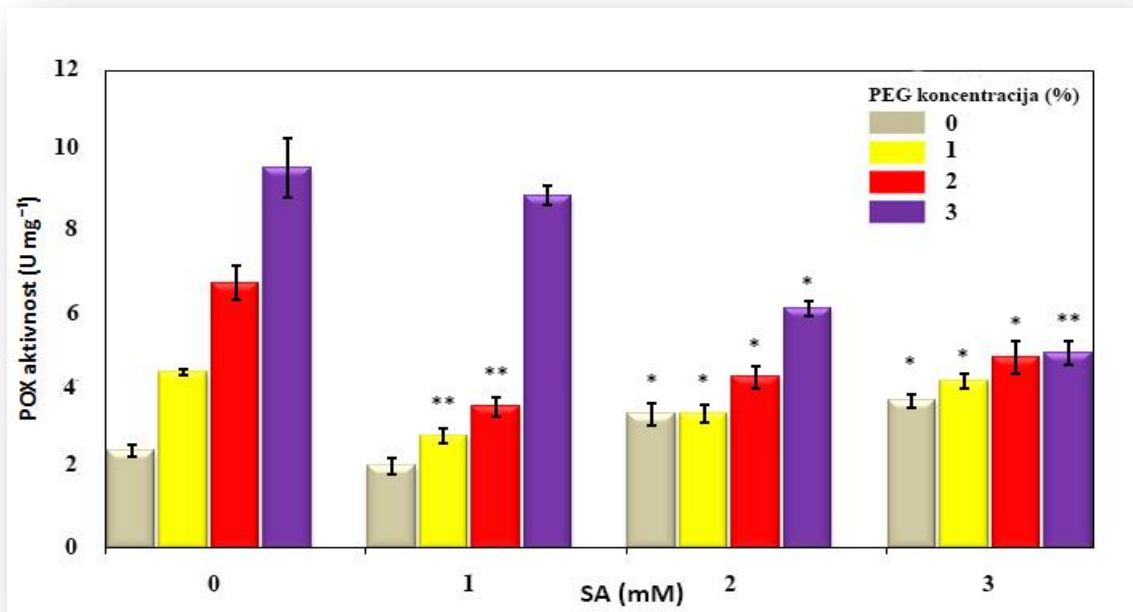
Dalji rezultati su pokazali da sa intenziviranjem vodnog stresa dolazi do povećanja aktivnosti katalaza (**Slika 34.**). Na tretmanu sa 2% PEG dolazi do povećanja aktivnosti CAT od 1,4 puta u odnosu na kontrolu, dok na tretmanu sa 3% PEG to povećanje iznosi čak 3 puta. Dodatak SA u hranjivu podlogu u odsustvu vodnog stresa izazvanog PEG, dovodi do smanjenja aktivnosti CAT u listovima biljaka *I. walleriana* u odnosu na kontrolu, i to pri koncentraciji SA od 2 mM za 42,7%, a pri 3 mM za 48,2%. Na ispitivanim podlogama koje su u svom sastavu sadržale SA, pri delovanju vodnog stresa indukovano PEG, primećeno je da SA već pri najnižoj koncentraciji od 1 mM u uslovima najintenzivnijeg vodnog stresa (3% PEG), dovodi do značajnog smanjenja aktivnosti CAT. Pri koncentraciji od 2 i 3 mM SA, pri bilo kojoj jačini vodnog stresa, dolazi do značajnog smanjenja aktivnosti CAT do nivoa koji je izmeren kod biljaka u kontrolnim uslovima ili čak i ispod tog nivoa. Na hranljivoj podlozi sa 3 mM SA i 3% PEG dolazi do smanjenja aktivnosti CAT od 20% u odnosu na kontrolu. SA u koncentraciji od 2 i 3 mM je izuzetno efikasna u smanjenju aktivnosti katalaza, što se vidi i iz rezultata nivoa H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, nastalog kao posledica vodnog stresa u listovima biljaka *I. walleriana* gajenih *in vitro*.



**Slika 34.** Efekat PEG i SA na aktivnost CAT u listovima biljaka *I. walleriana* gajenih *in vitro*. Podaci prikazani na grafiku predstavljaju srednje vrednosti  $\pm$  SE. Statistički značajne razlike u odnosu na kontrolne vrednosti (LSD test), u okviru istog PEG tretmana su obeležene zvezdicom (\* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$ ).

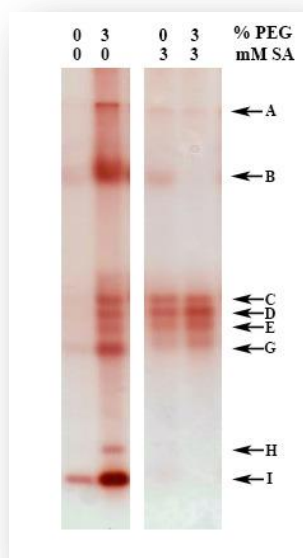
Aktivnost ukupnih POX raste sa povećanjem intenziteta vodnog stresa, odnosno sa povećanjem koncentracije PEG u podlozi (**Slika 35.**). Porast aktivnosti POX je linearan, na koncentraciji od 1% PEG dolazi do povećanja od 1,8 puta, dok na koncentraciji od 3% PEG dolazi do povećanja aktivnosti od čak 3,9 puta u odnosu na kontrolu. Primena SA dovela je do povećanja POX aktivnosti kod biljaka koje nisu bile izložene vodnom stresu i to za 37,7% pri aplikaciji 2 mM SA, odnosno za 51,6% na 3 mM SA. Sa druge strane kod biljaka koje su bile izložene vodnom stresu indukovanim PEG, SA dovodi do smanjenja aktivnosti ukupnih peroksidaza i to na tretmanu sa 3% PEG i 3 mM SA za 50% u odnosu na tretman samo sa 3% PEG. U zavisnosti od uslova koji deluju na biljke, najverovatnije dolazi do aktivacije različitih izoformi peroksidaza, odnosno vodni stres i SA najverovatnije imaju uticaj na različite izoforme peroksidaza. Zbog toga je urađena i Native-PAGE elektroforeza za odabrane uzorke, kako bi se detektovala aktivnost pojedinačnih POX izoformi (**Slika 36.**).





**Slika 35.** Efekat PEG i SA na aktivnost totalnih POX u listovima biljaka *I. walleriana* gajenih *in vitro*. Podaci prikazani na grafiku predstavljaju srednje vrednosti  $\pm$  SE. Statistički značajne razlike u odnosu na kontrolne vrednosti (LSD test), u okviru istog PEG tretmana su obeležene zvezdicom (\* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$ ).

Na osnovu zimograma aktivnosti peroksidaza (**Slika 36.**) pokazalno je da PEG izazvana suša pospešuje aktivnost osam izoformi POX kod biljaka *I. walleriana* gajenih *in vitro*, a posebno aktivnost izoformi B i I, dok tretman 3 mM SA pospešuje aktivnost izoformi C, D, E i G, a inhibira A, B, H i I, bez obzira na prisustvo PEG u podlozi.



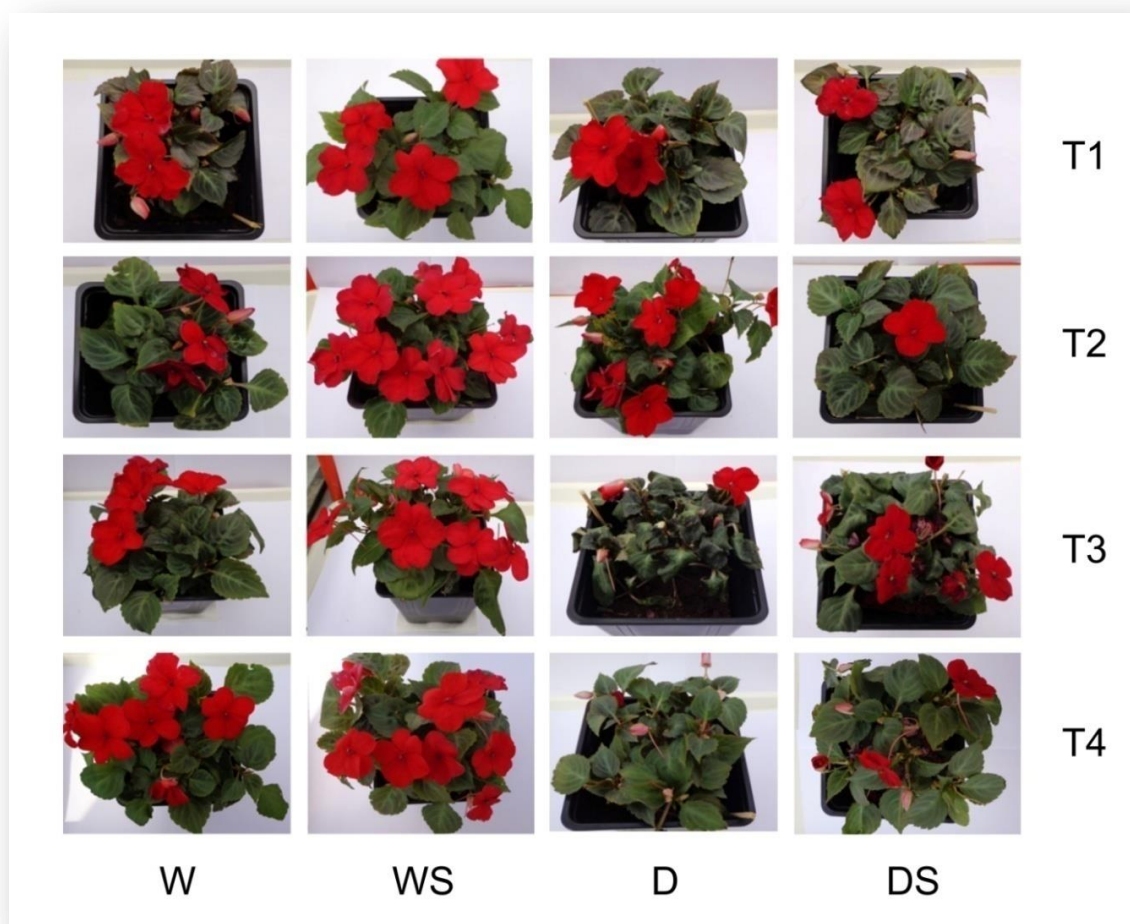
**Slika 36.** Zimogram POX izoformi kod biljaka *I. walleriana* gajenih *in vitro*. Izoforme su obeležene slovima od A do I (slovo F je izostavljeno iz obeležavanja kako bi izoforme odgovarale obeleženim izoformama u ranijim publikacijama).

## 4.2. Efekat vodnog stresa i SA na biljke *I. walleriana* gajene *ex vitro*

Uticaj egzogene primene SA na biljke *I. walleriana* gajene *ex vitro* ispitivan je u uslovima nedostatka vode u podlozi, odnosno suše. U eksperimentu utvrđivan je uticaj folijarne primene 2 mM SA na cvetanje (broj cvetova i cvetnih pupoljaka); određeni su RWC, sadržaj prolina i MDA kao bitnih parametara koji ukazuju na nivo vodnog stresa kojima su biljke izložene. Dalje je urađena i analiza aktivnosti antioksidativnih enzima (SOD, CAT i POX) kao i zastupljenost HSP101 proteina, koji su takođe pogodni parametri za ispitivanje nivoa vodnog i oksidativnog stresa kome su biljke izložene. Na kraju je praćena ekspresija tri dehidrinska gena kod *I. walleriana* (*IwDhn1*, *IwDhn2.1* i *IwDhn2.2*) u uslovima vodnog stresa i primene SA. Ova istraživanja imala su za cilj da ukažu na određene mehanizme delovanja SA kod ove biljne vrste, u *ex vitro* eksperimentalnom sistemu koji oponaša uslove spoljašnje sredine uz kontrolu određenih faktora (osvetljenje, temperatura, relativna vlažnost vazduha).

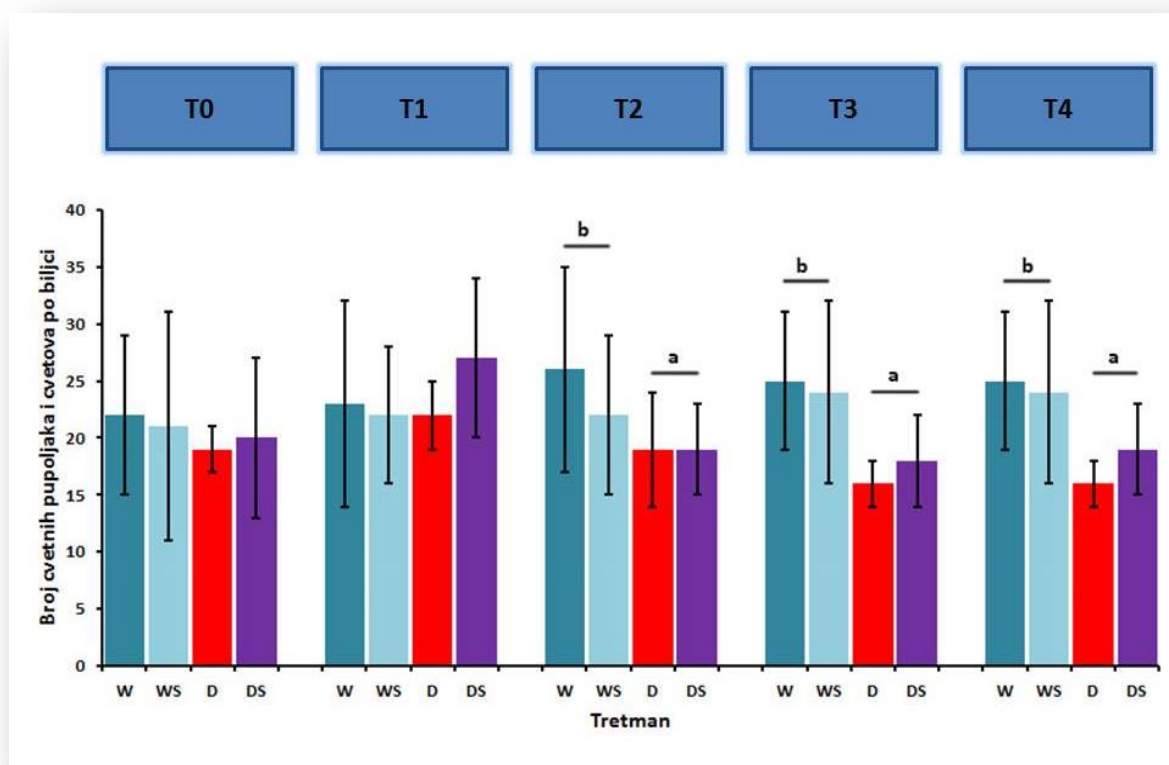
### 4.2.1. Efekat vodnog stresa i SA na cvetanje biljaka *I. walleriana* gajenih *ex vitro*

Na **Slici 37.** prikazan je izgled četiri testirane grupe biljaka u različitim vremenskim tačkama u kojima je urađeno uzorkovanje. Vremenska tačka T0 odnosi se na prvi dan eksperimenta kada su prikupljeni uzorci četiri ispitivane grupe biljaka, nakon zasićenja supstrata vodom i nije prikazana na **Slici 37.**



**Slika 37.** Izgled četiri testirane grupe biljaka u različitim vremenskim tačkama: W – zalivane biljke, WS – zalivane biljke koje su tretirane sa SA, D – biljke izložene vodnom stresu, DS – biljke izložene vodnom stresu koje su tretirane sa SA. T1-T4 su vremenske tačke obeležene kada je urađeno uzorkovanje: trećeg dana eksperimenta – 24h nakon aplikacije SA (tačka T1), jedanaestog dana eksperimenta (kada su počeli da se naziru prvi simptomi suše u grupi D, tačka T2), četrnaestog dana eksperimenta (efekat suše je bio morfološki uočljiv u grupi D, tačka T3) i šesnaestog dana eksperimenta (24h nakon rehidratacije, tačka T4).

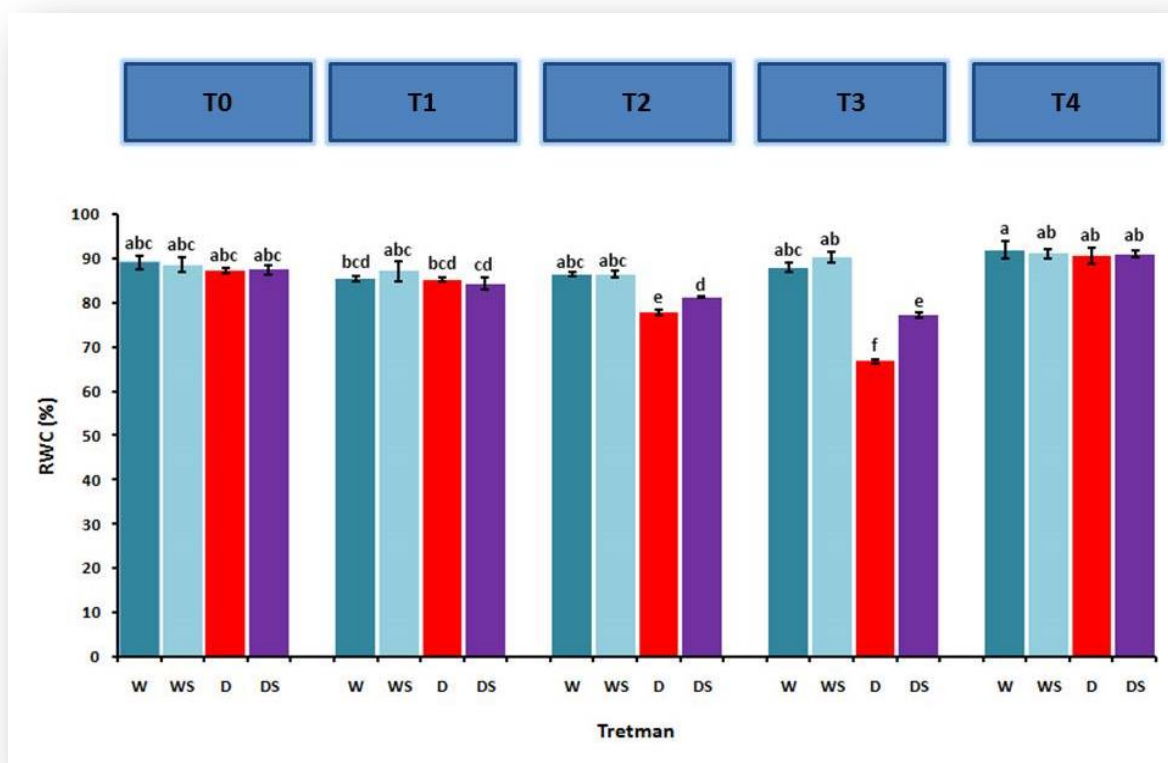
Analiza rezultata je pokazala da upotreba SA nema uticaja na cvetanje i da je nedostatak vode jedini faktor koji utiče na broj cvetova uključujući i cvetne pupoljke (**Slika 38.**). Suša je imala statistički značajan efekat jedino u tačkama T2, T3 i T4. Vodni stres značajno dovodi do smanjenja broja cvetova i cvetnih pupoljaka u grupama biljaka D i DS u odnosu na biljke koje su zalivane (grupe W i WS). Nakon rehidratacije (vremenska tačka T4) došlo je do skoro trenutnog oporavka uvelih listova biljaka u grupama D i DS, ali nije bilo efekta na broj cvetova i cvetnih pupoljaka.



**Slika 38.** Prosečan broj cvetova i cvetnih pupoljaka po biljci. Greške prikazane na histogramima predstavljaju standardnu devijaciju četiri biološka ponavljanja (četiri biljke), T0-T4 su različita vremena uzorkovanja. W – zalivane biljke, WS – zalivane biljke tretirane sa SA, D – biljke izložene vodnom stresu (biljke koje nisu zalivane), DS – biljke izložene vodnom stresu koje su tretirane sa SA. Rezultati su obrađeni Poasonovom regresijom unutar svake vremenske tačke. Urađeno je poređenje srednjih vrednosti u ovim vremenskim tačkama za faktor dehidracije (W+WS grupe su upoređene sa D+DS grupama); p – vrednosti dobijene prilikom ovih poređenja su obrađene FDR metodom i statistički značajne razlike između grupa ( $p < 0,05$ ) su obeležene različitim malim slovom iznad barova.

#### 4.2.2. Uticaj SA na RWC u listovima biljaka *I. walleriana* gajenih *ex vitro* u uslovima vodnog stresa

Kao što je već napomenuto RWC predstavlja značajan faktor koji ukazuje hidracioni status biljaka. Analizom varijanse (ANOVA) dobijenih rezultata utvrđeno je da postoji statistički značajna interakcija ispitivanih faktora: dehidracija, SA, vreme uzorkovanja. ANOVA ukazuje da se uticaj SA razlikuje između zalivanih i nezalivanih biljaka u određenom vremenskom trenutku (**Slika 39**).

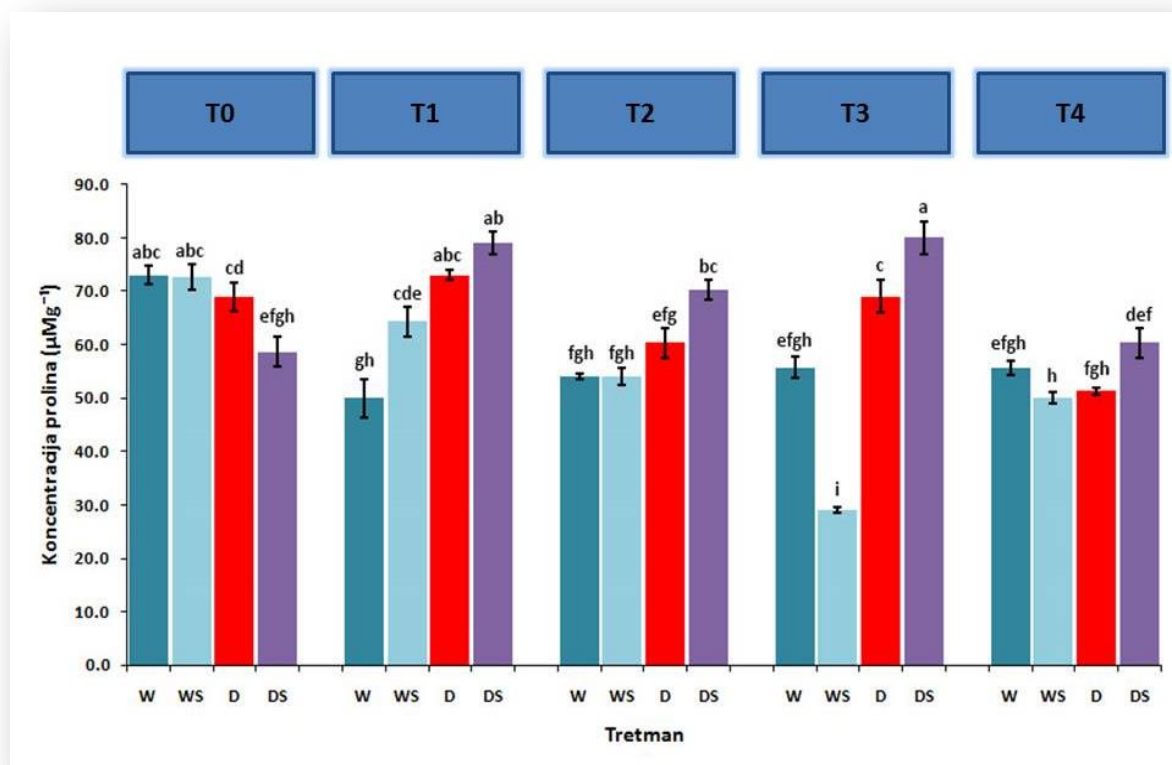


**Slika 39.** Promena RWC u listovima biljaka *I. walleriana* pri vodnom stresu i odgovor biljaka na SA. W – zalivane biljke, WS – zalivane biljke tretirane sa SA, D – biljke izložene vodnom stresu (biljke koje nisu zalivane), DS – biljke izložene vodnom stresu koje su tretirane sa SA. T0-T4 su različita vremena uzorkovanja. Svaki stubić histograma predstavlja srednju vrednost RWC dobijenu iz tri biološka ponavljanja. Varijansa između bioloških ponavljanja koja je prikazana kao standardna greška, predstavlja standardnu devijaciju. Ispitivani su uticaji faktora dehidracije, SA i vremena kao i njihove interakcije na nivou značajnosti  $p < 0,05$ . Srednje vrednosti su upoređene pomoću Njuman-Kelsovog post-hoc testa ( $p < 0,05$ ). Vrednosti na grafiku obeležene istim slovom nisu statistički značajne prema Njuman-Kelsovom testu na nivou značajnosti od  $p < 0,05$ .

Kod zalivanih biljaka na početku eksperimenta (T0) RWC je iznosio preko 87% (87,2-89,1%) što se nije menjalo u toku eksperimenta ni u W, ni u WS grupi (**Slika 39.**). Kod biljaka koje su bile izložene dehidraciji (grupa D) došlo je do značajnog smanjenja RWC nakon deset dana od početka dehidracije (77,8% u vremenskoj tački T2), u poređenju sa biljkama iz grupe W. Posle trinaest dana uskraćivanja vode i intenziviranju suše, biljke grupe D u vremenskoj tački T3 imale su RWC od 66,8%, trinaestog dana uskraćivanja vode. Zaštitna uloga SA je vidljiva tek posle 13 dana suše, s obzirom da je RWC DS grupe biljaka u proseku veći za 10,4% u odnosu na biljke iz grupe D. Nakon rehidracije (vremenska tačka T4), kod obe grupe dehidratiranih biljaka RWC se vratio na nivo iz tačke T0.

#### 4.2.3. Uticaj suše i SA na promenu sadržaja prolina u listovima biljaka *I. walleriana* gajenih *ex vitro*

U listovima biljaka *I. walleriana* gajenih *ex vitro* praćena je promena sadržaja prolina, u sve četiri eksperimentalne grupe biljaka tokom trajanja eksperimenta (vremenske tačke T0-T4). Analiza sadržaja prolina pokazala je značajnu interakciju ispitivanih faktora: dehidratacija, SA, vreme uzorkovanja (**Slika 40.**). Sadržaj prolina kod zalivanih biljaka je niži u vremenskim tačkama T1-T4 u odnosu na početak eksperimenta T0.

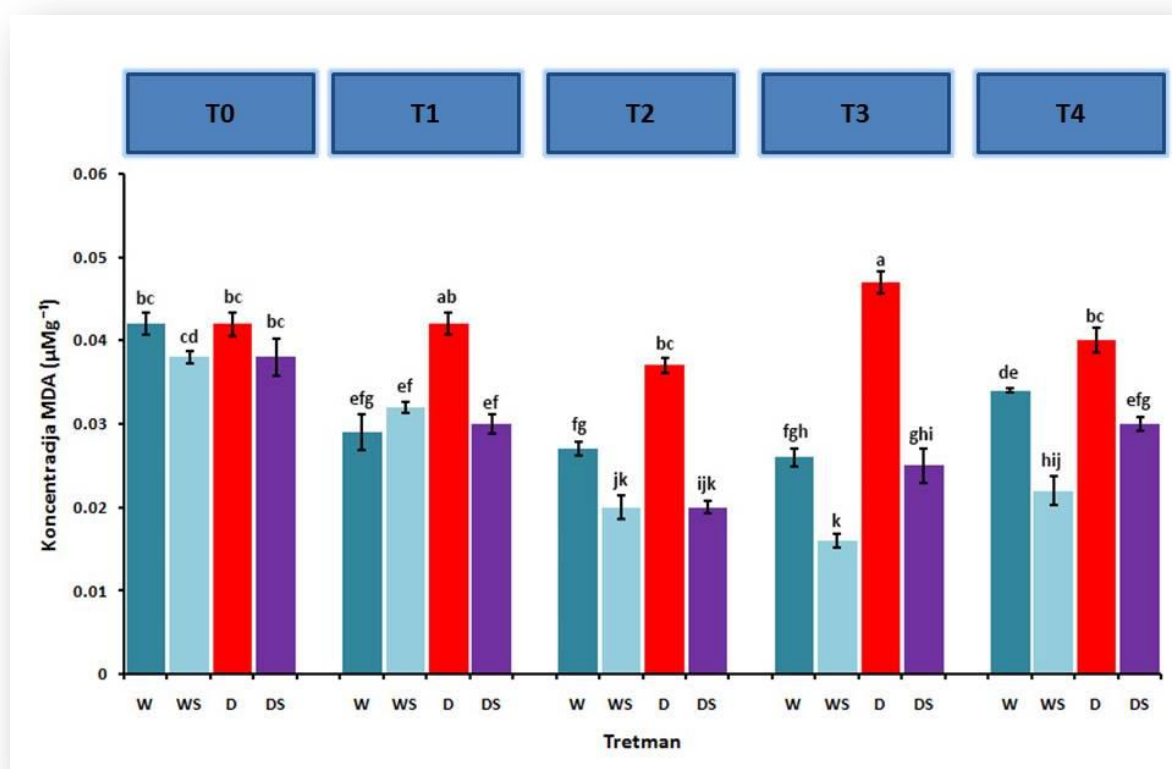


**Slika 40.** Promena u koncentraciji prolina u listovima biljaka *I. walleriana* gajenih *ex vitro*. W – zalivane biljke, WS – zalivane biljke tretirane sa SA, D – biljke izložene stresu suše (biljke koje nisu zalivane), DS – biljke izložene suši koje su tretirane sa SA. T0-T4 su različita vremena uzorkovanja. Svaki stubić histograma predstavlja srednju vrednost RWC dobijenu iz tri biološka ponavljanja. Varijansa između bioloških ponavljanja je prikazana kao standardna greška koja predstavlja standardnu devijaciju. Ispitivani su uticaji faktora dehidratacije, SA i vremena kao i njihove interakcije na nivou značajnosti  $p < 0,05$ . Srednje vrednosti su upoređene pomoću Njuman-Kelsovog post-hoc testa ( $p < 0,05$ ). Vrednosti na grafiku obeležene istim slovom nisu statistički značajne prema Njuman-Kelsovom testu na nivou značajnosti od  $p < 0,05$ .

Do akumulacije prolina došlo je u D i DS grupama biljaka u tački T3 (**Slika 40.**). Upotreba SA je imala mali efekat na zalivane biljke, ali je imala izuzetan efekat na biljke koje nisu zalivane (DS grupa biljaka). Zato možemo reći da SA ima veliki uticaj na sintezu prolina u uslovima suše i moguće je da se kroz sintezu ovog značajnog osmolita ostvaruje pozitivan efekat koji SA ima u prevazilaženju suše kod biljaka *I. walleriana* gajenih *ex vitro*.

#### 4.2.4. Uticaj vodnog stresa i SA na promenu sadržaja MDA u listovima biljaka *I. walleriana* gajenih *ex vitro*

MDA je jedan od proizvoda peroksidacije lipida u membranama i predstavlja indikator oštećenja ćelijskih membrana prilikom oksidativnog stresa. Statistička analiza rezultata ovog *ex vitro* eksperimenta je pokazala da postoji značajan uticaj interakcije sva tri faktora: dehidracija, SA i vreme, što ukazuje na to da u određenim vremenskim tačkama, biljke koje su zalivane i biljke koje su bile izložene stresu suše reaguju drugačije, odnosno postoji značajna razlika u nivou MDA (Slika 41.). Sadržaj MDA kod biljaka koje nisu bile izložene dejstvu vodnog stresa (W grupa biljaka) je opadao tokom eksperimenta. Biljke izložene vodom stresu (D grupa) akumulirale su značajno više MDA u odnosu na grupu W u svim ispitivanim vremenskim tačkama izuzev tačke T0; ove razlike su bile najizraženije u tački T3, kada je vodni stres bio najintenzivniji. Rehidracija (vremenska tačka T4) je dovela do pada sadržaja MDA u grupi D, ali ne i u kontrolnoj grupi biljaka (W grupa). Upotreba SA je uticala na biljke koje nisu bile izložene suši, na šta posebno ukazuju biljke iz grupe WS koje su imale u proseku za 39% manji sadržaj MDA u vremenskoj tački T3. Primena SA je zaštitila membranske lipide biljnih ćelija pri izlaganju biljaka suši (DS grupa), s obzirom da je nivo MDA kod DS biljaka bio na istom nivou ili niži u odnosu na kontrolnu grupu biljaka (W) u svim vremenskim tačkama.



**Slika 41.** Promena sadržaja MDA kod biljaka *I. walleriana* gajenih *ex vitro*. W – zalivane biljke, WS – zalivane biljke isprskane sa SA, D – biljke izložene stresu suše (biljke koje nisu zalivane), DS – biljke izložene suši koje su tretirane sa SA. T0-T4 su različita vremena uzorkovanja. Svaki stubić histograma predstavlja srednju vrednost RWC dobijenu iz tri biološka ponavljanja. Varijansa između bioloških ponavljanja prikazana je kao standardna greška i predstavlja standardnu devijaciju. Ispitivani su uticaji faktora dehidracije, SA i vremena kao i njihove interakcije na nivou značajnosti  $p < 0,05$ . Srednje vrednosti su upoređene pomoću Njuman-Kelsovog post-hoc

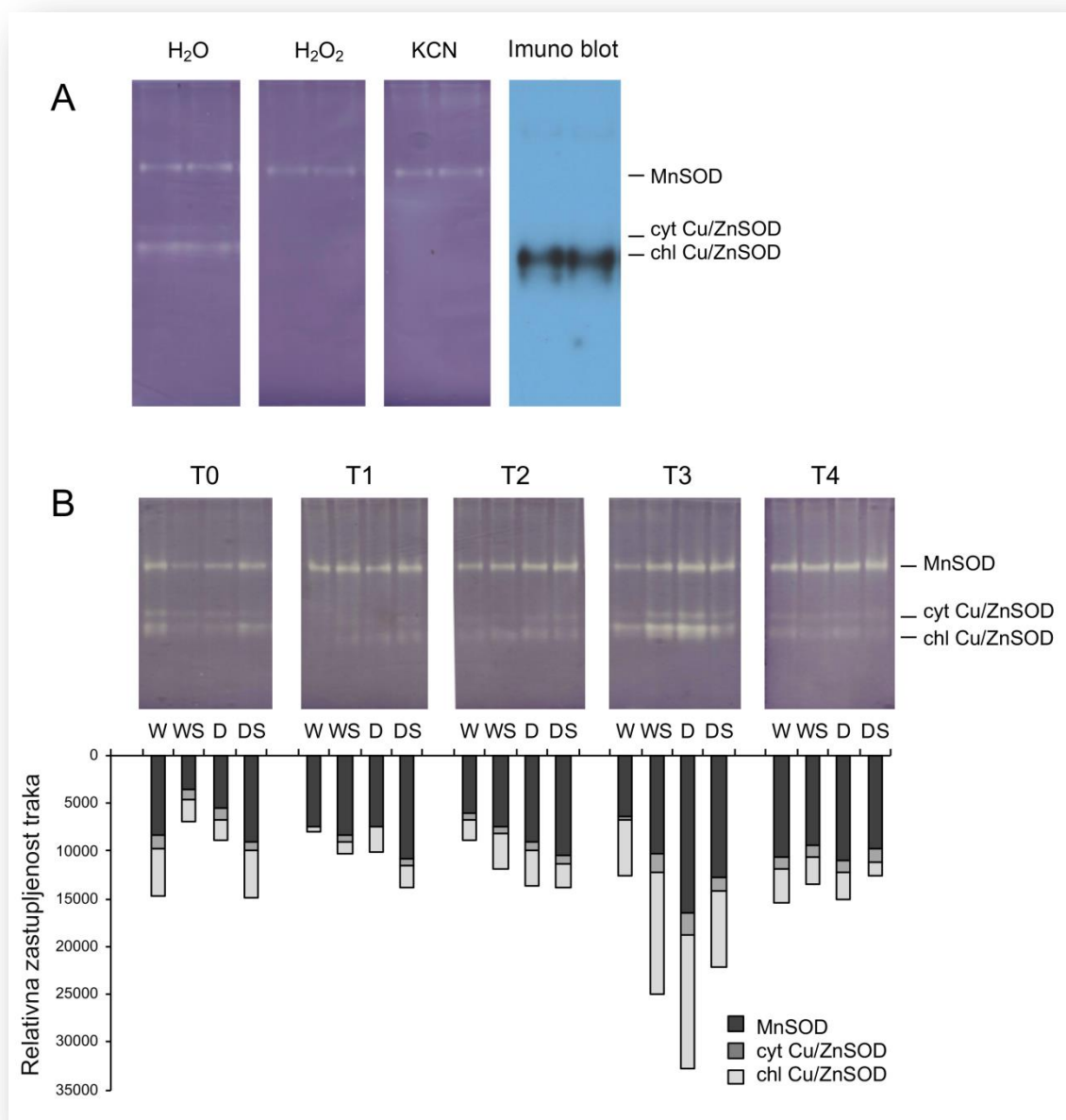
testa ( $p < 0,05$ ). Vrednosti na grafiku obeležene istim slovom nisu statistički značajne prema Njuman-Kelsovom testu na nivou značajnosti od  $p < 0,05$ .

#### 4.2.5. Uticaj vodnog stresa i SA na aktivnost antioksidativnih enzima (SOD, CAT i POX) kod biljaka *I. walleriana* gajenih *ex vitro*

Povećanje aktivnosti antioksidativnih enzima kod biljaka ukazuje na oksidativni stres koji često nastaje kao posledica delovanja brojnih stresogenih faktora na biljke. Vodni stres i isušivanje su uvek praćeni oksidativnim stresom, usled stvaranja velike količine ROS i poremećene ravnoteže između produkcije ROS i aktivnosti antioksidativnih enzima koji ih eliminišu. Aktivnost antioksidativnih enzima pokazuje u kakvom se stanju biljke nalaze i kakav je njihov kapacitet odbrane od stresnih činioca koji na njih deluju.

U ovoj disertaciji ispitivan je uticaj 2 mM SA na aktivnost SOD kod biljaka koje su bile izložene suši, kao i kod biljaka koje su zalivane. U listovima *I. walleriana*, detektovane su: jedna MnSOD (neosetljiva i na KCN i na  $H_2O_2$ ) i dve Cu/ZnSOD (osetljive na oba inhibitora) (**Slika 42.A**). Imunoblot analizom proteina, korišćenjem antitela za hloroplastnu Cu/ZnSOD utvrđeno je da je traka koja je brže migrirala na gelu hloroplastna Cu/ZnSOD, dok je druga najverovatnije citoplazmatska Cu/ZnSOD.



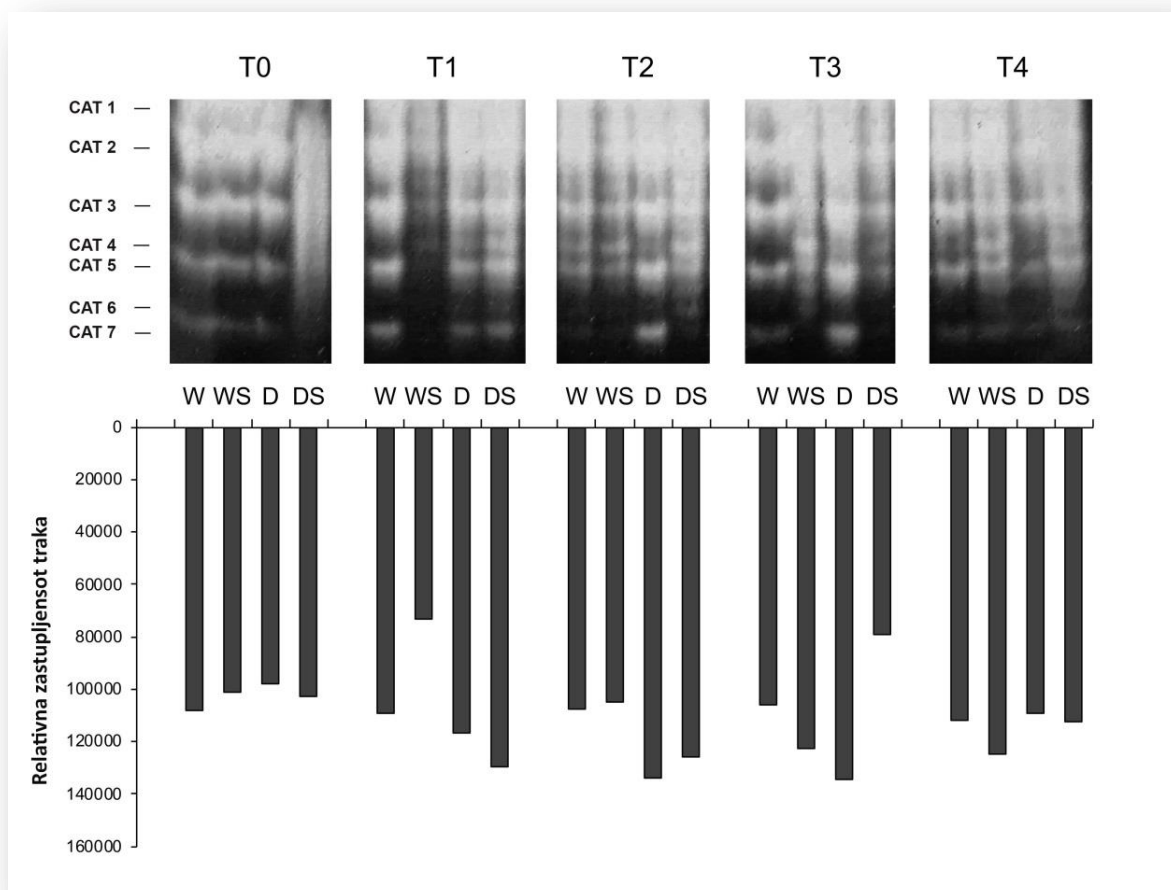


**Slika 42.** A. Identifikacija izoformi SOD nativnom gel-elektroforezom. Različite izoforme SOD su identifikovane pomoću inhibitora SOD – 1 mM KCN ili 3 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; proteini razdvojeni Native-PAGE elektroforezom su imunoblot analizom testirani na hloroplastni Cu/ZnSOD. B. Zimogrami SOD izoformi. T0-T4 su različita vremena uzorkovanja, W – zalivane biljke, WS – biljke koje su zalivane i tretirane sa SA, D – biljke koje nisu zalivane, DS – biljke koje nisu zalivane a tretirane su sa SA. Relativna zastupljenost traka individualnih SOD izoformi predstavljena je barovima na histogramu.

Kumulativna aktivnost tri izoforme se nije značajno promenila kod zalivanih biljaka tokom eksperimenta, pa je bila gotovo identična i prvog i šesnaestog dana eksperimenta, sa manjim fluktuacijama aktivnosti kod individualnih izoformi (**Slika 42.B**). Kod biljaka koje nisu zalivane, odnosno koje su bile izložene suši (grupa D), kumulativna SOD aktivnost je postepeno rasla, da bi dostigla svoj maksimum u vremenskoj tački T3 (tačka u kojoj je vodni stres morfološki bio najuočljiviji), da bi pala nakon rehidracije na kontrolni nivo (vremenska tačka T4).

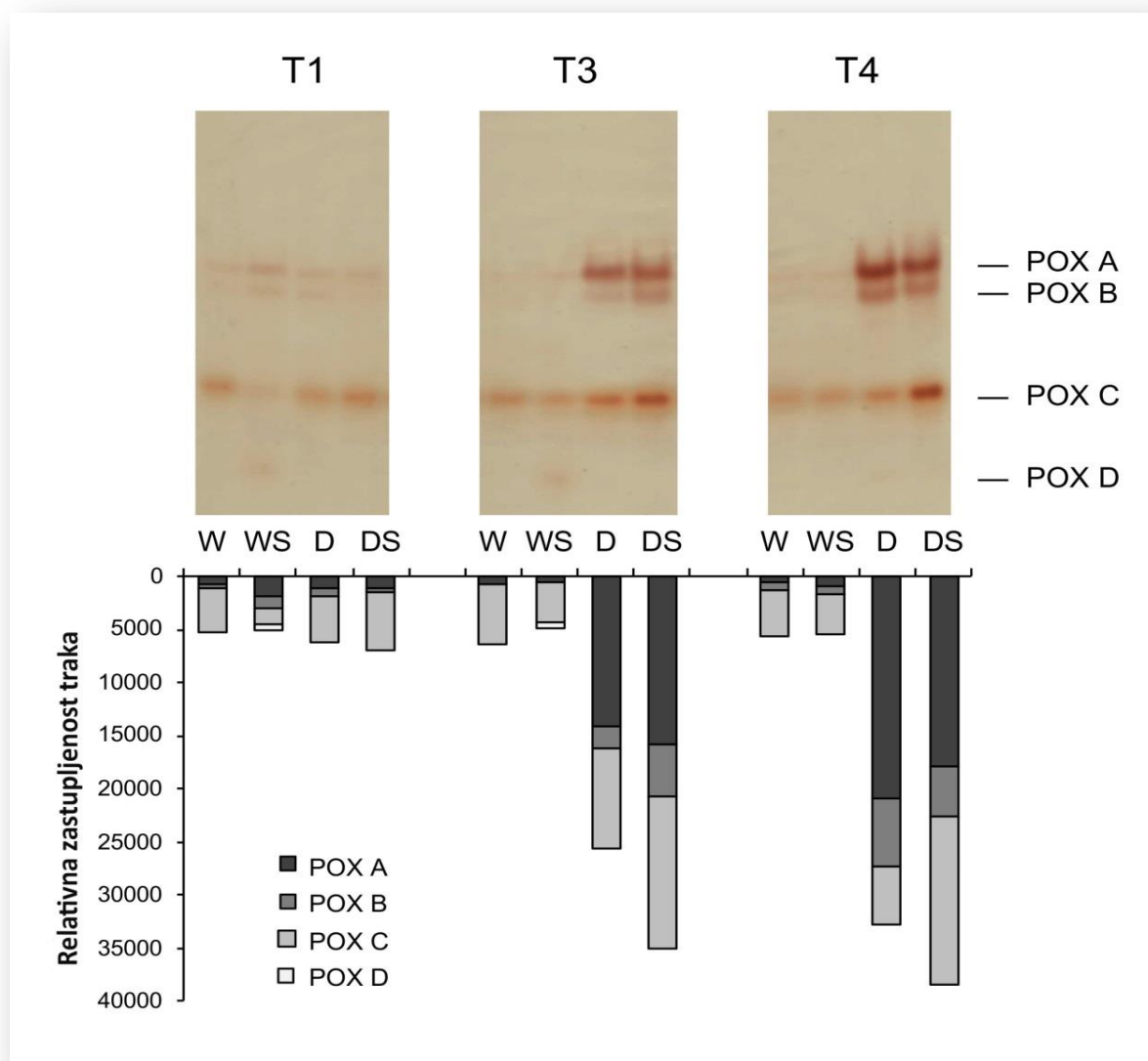
Aktivnost hloroplastne Cu/ZnSOD izoforme je indukovana sušom, ali i druge izoforme su značajno doprinele ukupnoj aktivnosti SOD (**Slika 42.B**). Najizraženiji efekat koji je SA imala je značajno smanjenje totalne SOD aktivnosti kod biljaka koje su bile pod najjačim stresom (DS grupa, vremenska tačka T3), u poređenju sa netretiranim biljkama grupe D. Kod WS grupe biljaka SA je dovela do malih promena u SOD aktivnosti (WS i DS grupe u vremenskim tačkama T1 i T2) i nešto većih promena kod WS grupe biljaka u vremenskoj tački T3.

CAT kod biljaka *I. walleriana* poseduju najmanje sedam izoformi što se može zaključiti na osnovu gela enzimskog eseja (**Slika 43**). Glavne izoforme su CAT1, CAT2, CAT3, CAT5, kao i CAT7, koje su prisutne u svim uzorcima. Slabo izražena CAT4 izoforma nije prisuta u T0, kao i kod većine uzoraka biljaka iz grupe W (osim jako slabo u T2 vremenskoj tački), pa je možda povezana sa vodnim stresom i/ili SA tretmanom. Moguće je da je slaba CAT6 indukovana sušom jer se javlja kod svih uzoraka iz grupa D i DS izuzev u T0. Kod nestresiranih biljaka (grupa W), totalna CAT aktivnost se nije menjala tokom eksperimenta. Vodni stres doveo je do postepenog povećanja ukupne CAT aktivnosti u D grupi biljaka u vremenskim tačkama od T1-T3, a zatim i do smanjenja CAT aktivnosti na nivo kontrole (W grupe biljaka) nakon rehidracije u tački T4. Primena SA je imala malo efekta na CAT aktivnost, izuzev pada u CAT aktivnosti kod WS grupe biljaka odmah nakon SA aplikacije (vremenska tačka T1) i kod DS biljaka u odnosu na D grupu biljaka nakon produžene suše (tačka T3).



**Slika 43.** Zimogrami CAT izoformi. T0-T4 su različita vremena uzorkovanja, W – zalivane biljke, WS – biljke koje su zalivane i tretirane sa SA, D – biljke koje nisu zalivane, DS – biljke koje nisu zalivane a tretirane su sa SA. Relativna zastupljenost traka individualnih CAT izoformi predstavljena je barovima na histogramu.

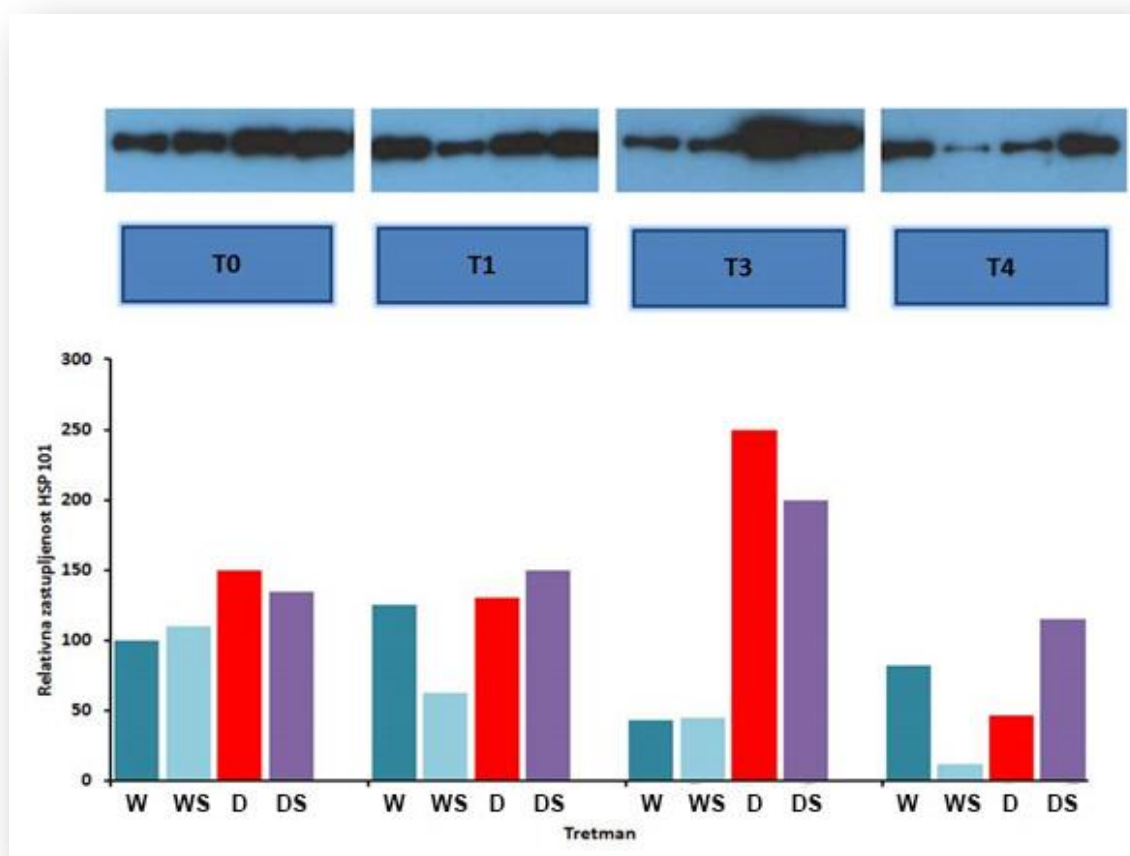
Zimogrami peroksidazne aktivnosti pokazali su prisustvo tri aktivnije izoforme (POX A, B, i C) i jedne slabije aktivne izoforme (POX D, **Slika 44.**). Zalivane biljke (grupa W) pokazale su nisku POX aktivnost i to prvenstveno uz dominaciju POX C izoforme dok su POX A i B pokazale blagu aktivnost. Upotreba SA kod zalivanih biljaka nije promenila ukupnu POX aktivnost, ali je indukovala slabu POX D aktivnost, čije prisustvo nije zabeleženo u ostalim tretmanima. Intenzivan vodni stres je značajno pojačao aktivnosti sve tri glavne izoforme u poređenju sa W grupom biljaka, a naročito POX A izoforme (D grupa biljaka, vremenska tačka T3) i ta aktivnost se uvećala i nakon rehidracije (T4). Upotreba SA kod biljaka koje su bile izložene vodnom stresu je značajno povećala totalnu POX aktivnost, a naročito izoformu POX C (biljke grupe DS, vremenska tačka T3) i ta aktivnost se uvećala i nakon rehidracije u poređenju sa D grupom biljaka.



**Slika 44.** Zimogram POX izoformi kod biljaka *I. walleriana*. T0-T4 su različita vremena uzorkovanja, W – zalivane biljke, WS – biljke koje su zalivane i tretirane sa SA, D – biljke koje nisu zalivane, DS – biljke koje nisu zalivane, a tretirane su sa SA. Relativna zastupljenost traka individualnih POX izoformi predstavljena je barovima na histogramu.

#### 4.2.6. Uticaj vodnog stresa i SA na ekspresiju HSP101 kod biljaka *I. walleriana* gajenih *ex vitro*

Praćen je uticaj vodnog stresa i primene SA na ekspresiju HSP101 u listovima biljaka *I. walleriana* gajenih *ex vitro*. Kod biljaka koje su zalivane sve vreme trajanja eksperimenta (grupa W) zastupljenost HSP101 je održana na konstantnom nivou, sa izuzetkom u tački T3, gde je došlo do pada u ekspresiji. Egzogena primena SA je dovela do pada ekspresije HSP101 i to kod biljaka iz grupe koja je zalivana (WS), postupno posmatrajući vremenske tačke od T0-T4 i u T4 je bila 10 puta manja u odnosu na ekspresiju ovog proteina u listovima biljaka u T0 tački (**Slika 45.**). Nedostatak vode u supstratu (grupa D) je doveo do povećanja ekspresije HSP101 kod biljaka *I. walleriana* i u tački T3 je detektovano čak 2,5 puta veća zastupljenost ovog proteina u odnosu na kontrolni nivo (grupa W, tačka T0), da bi se ekspresija posle rehidracije (tačka T4) smanjila skoro 3 puta u odnosu na početak delovanja suše. Kod biljaka u grupi koja je bila izložena i suši i SA (grupa DS) došlo je do postepenog povećanja ekspresije HSP101, a najveće povećanje je bilo detektovano u tački T3 (najintenzivniji vodni stres) i to dva puta u odnosu na kontrolu. Nakon rehidracije biljaka (tačka T4) došlo je do pada ekspresije u odnosu na tačku T3, ali je ekspresija bila veća u odnosu na grupu biljaka koje su bile izložene samo suši i skoro na istom nivou kao kod kontrolnih biljaka (grupa W, tačka T0).



**Slika 45.** Ekspresija HSP101 kod biljaka *I. walleriana*. T0-T4 su različita vremena uzorkovanja, W – zalivane biljke, WS – biljke koje su zalivane i tretirane sa SA, D – biljke koje nisu zalivane, DS – biljke koje nisu zalivane, a tretirane su sa SA.

#### 4.2.7. Struktura dehidrina kod biljaka *I. walleriana* gajenih *ex vitro* i njihova ekspresija u uslovima vodnog stresa pri primeni SA

U ovoj tezi, sekvenciran je transkriptom listova biljaka *I. walleriana*, pri čemu su identifikovane sekvence kodirajućeg regiona tri dehidrinska gena (*IwDhn1*, *IwDhn2.1* i *IwDhn2.2*) plus 5' i 3' UTR (eng. *Untranslated Region*) regioni (**Tabela 11.**). Sve tri *de novo* identifikovane komplementarne DNK sekvence (cDNA, eng. *complementary DNA*), od koji su dve kompletne i jedna parcijalna, su deponovane u GenBank pod pristupnim brojevima MW219505 (*Dhn1*), MW219506 (*Dhn2.1*) i MW219507 (*Dhn2.2*).

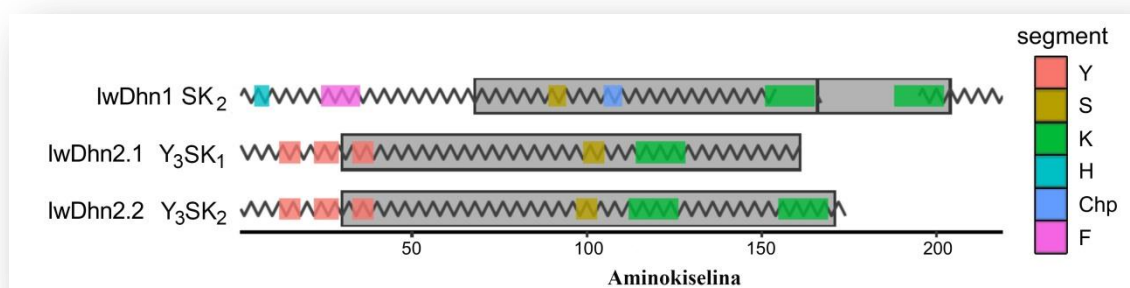
**Tabela 11.** Identifikovane cDNA sekvence dehidrinskih gena kod biljaka *I. walleriana*. Obojeni delovi predstavljaju kodirajuće sekvence dehidrinskih gena (cds, eng. *coding sequences*), dok neobojeni delovi predstavljaju UTR regione.

Gen	Identifikovane sekvence
<i>IwDhn1</i>	CTCGAAATCGCCATTAATCAACTCTCTGCATTCGTTTATCATTTAATTCTTGAAACTGATTTCGTTAGTCA TGGCAGAAGAGCACAGCCACAATCATGAAGTGATCACCCCGTCGAGGCCTCTGTACCCGCCCGCTGGAG ACACAGGACAGAGGAATCCTTGATTTCTTAAGAAGGATGAGGAGAAGCCTGCTCCGGCACAGGCTTACGC CGGCGAGGAGGCTCTCTGTCGCCGAGTTCGAGAAAAGTTGAAGTTTCAGAGCCGAAGGTGGAAGAAGAAGAGA AGATCGAGGAGGTGAAAAGAGAGGGCTTTTTGGAGAAGCTCCATTCCGACAGCTCCAGCTCTTCCAGCGACG AGGAGGAAGGATCGGAAAAGAAGGAGAAGAAGAAGAAAAAGGGTCTGAAGGAGAAGATCAAGGAGA AGATCACCGGAGAAGGGGACGACAAGAAATCAGAGGAGGACACGAGCGTGCCAATCGAGAAGTACGAGGA AGGTGCGGCGGTGGCCAGCCGGAAGAAAAGAAAGGGTTTTTGGAAAAGATAAAGGAGAAACTCCCCGGA CAGAAGAAAACAGAGGAGGCGCCGCGCGGTTGTTGCGACGGAGGTGCAAGTGGAGGAGCCAAAGGAGA AGAAGGGTATTCTGGAGAAGATTAAGGAGAAGCTTCCTGGGTATCACCCGAAGACGACCGGAAGAGGTGAAG GAGAAGGAACATGGATCTGATTGAACAGACAAAGCTTGAGGATGAAGATGATGATGGATTGTGAATGTGAT TCCCTTTATGCTTTTTGTTTTGTATTGCTTTTTGTAATCATACTCATCACTAGTATGATCCGTAATAATGTGGTT GTTTTCTTTTCTTTTCTTTTTTTTTTATTGCTTTTGATTTTGTTTTTTTGGGCCACTTTAATTTAAACAATATA TTATTAATATTATAAAAGACTTGTATGTGG
	CTCGAAACGCATCGCAGTAAACAAAACCTTATTGAAATTCCTCTGTTTTGTCATGGCTCAATACGGATCAGAA TACGGTACCAAACCGACGAGTACGGAAATCCGATTCGTCAGTCACTGGACGAGTACGGGAACCCGGTCCGT CAAACCGATCAGTACGGAACCCGGTTCAGCATGGACAGGGTGGCACCGGAACCAAGGGGGACTATGGATT GACCGCGGCATGGAACTGGCACAGGTGATTATATGTCCGGTACCGAACTGGCGTGATCGGAGGTGCTG GAGGTGGAGGAGGACTGCACCAACAGCAACAGGACCGCGGGATTTGCGCCGGTCCGGCAGCTCCAGTCCG AGCTCGTCCGAGGATGATGGGCAAGGAGGGAGGAGGAAGAAAGGACTGAAGGAGAAGATAAAGGAGAAGT TGCCCGGTGGCATAAGGATGAGTATCAGCAGGGTACGGGTACGGCGACTACGACGGCGTATCCGGCGGAG GGAGGAGGAGATCCTTATCATGAGAAGAAAGGGATCAT
	GGGGCAAACGCATCGCAATACATAAAGTTCAGTAAATTTCCCTGTTCTTATCACCAGAGATGGCTCAATA CGGATCCGATTACGGTTCGCATACCGACGAGTACGGAAACCCGATTCCGACAGACTAGACGAGTACGGAA ATCCGGTCCGTCAAACCGATCAGTACGGAACCCGGTCCGCATGGTACGGTGGCACCGGAACCATGGGG GACTATGGATTGACCGCGCGGTAGGAACTGGCACGGGTGATTATATGTCTGGTACCGAACTGGCGTCATC GGAGGTGCGGGAGGAGGACTGCACAATCAGCAACAGGACCGGGGATCTTGCGCCGGTCCGGCAGCTCGAG CTCGAGTTCGTCGAGGATGATGGGCAAGGAGGGAGGAGGAAGAAAGGGCTGAAGGAGAAGATAAAGGAG AAGTTGCCCGGTGGGCATAAGGATGAGTATCAGCAGGGTACGGGTACGGCGACTACGACTGCGTATCCTGC GGCGGGAGGAGGAGATCCTTATCATGAGAAGAAAGGGATCATTGACAAGATCAAGGACAAGCTCCCCGGCA GCCATAACCGCCATAGATGATCTATAATTAAGTGGGATGCAGATGATGATGTAATATAATAAGGCTTGCCA CCATCACTTTGTTATATTTGTGTTGTAATAATGTTTGGTGTGTGCCACCTTCATTTTGTGATATTTGTGTTCA TATTTTGTGTTGTAATAATGTTTGTGTTGTTAATGAGTCATGTTTATAGGGCTCGTGTGACTGCATCTT ATGTTATGTTGTTTATGAAAATATTGTTTTAATTCCTGTTAAAATTCTGAAGTTCGCAATCTTTGG

Na osnovu kombinacije Y, K i S segmenata, dehidrini se mogu klasifikovati u različite tipove. IwDhn1 se klasifikuje u strukturni tip SK<sub>n</sub> (SK<sub>2</sub>), dok se IwDhn2.1 i IwDhn2.2 klasifikuju u strukturni tip Y<sub>n</sub>SK<sub>n</sub> (Y<sub>3</sub>SK<sub>1</sub> i Y<sub>3</sub>SK<sub>2</sub>, tim redom). Najvažnije karakteristike kodirajućeg regiona dehidrinskih gena identifikovanih kod biljaka *I.walleriana* su prikazane u **Tabeli 12.** i na **Slici 46.**

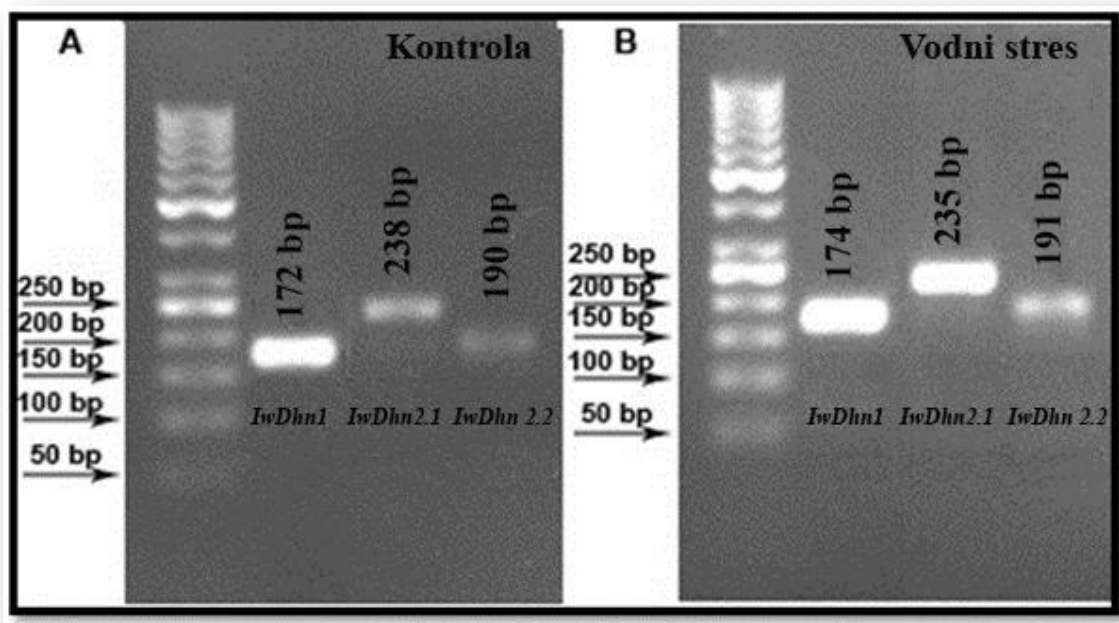
**Tabela 12.** Karakteristike identifikovanih cDNA sekvenci dehidrinskih gena kod biljaka *I. walleriana*.

Dehidrin	<i>IwDhn1</i>	<i>IwDhn2.1</i>	<i>IwDhn2.2</i>
Dužina (bp)	960	537	863
Amino kiselina	219	161	174
MW (Da)	24487	16716	18198
pI	4,97	6,19	7,92
Struktura	SK2	Y3SK1	Y3SK2
Y1	/	DEYGNP	DEYGNP
Y2	/	DEYGNP	DEYGNP
Y3	/	DQYGNP	DQYGNP
S	LHSDSSSSSSDEEE	LRRSGSSSSSSSEDD	LRRSGSSSSSSSEDD
K1	EKKGFLEKIKEKLPG	KKGLKEKIKEKLPG	KKGLKEKIKEKLPG
K2	EKKGILEKIKEKLPG	/	(H)EKKGIIDKIKDKLPG(SH)
H	HSNH	/	/
F	ETQDRGILDFLK	/	/
Chp	EKKEKKKKKK	/	/



**Slika 46.** Shematski prikaz tri dehidrina *I. walleriana*. Sivi pravougaonici predstavljaju dehidrinske domene (pfam PF00257) prema hmmscanu. Cik-cak linije predstavljaju neuređene regione proteina prema Espritz-ovom modelu. Strukturni segmenti dehidrina (Y, S, K, H, Chp i F) obeleženi su obojenim pravougaonicima.

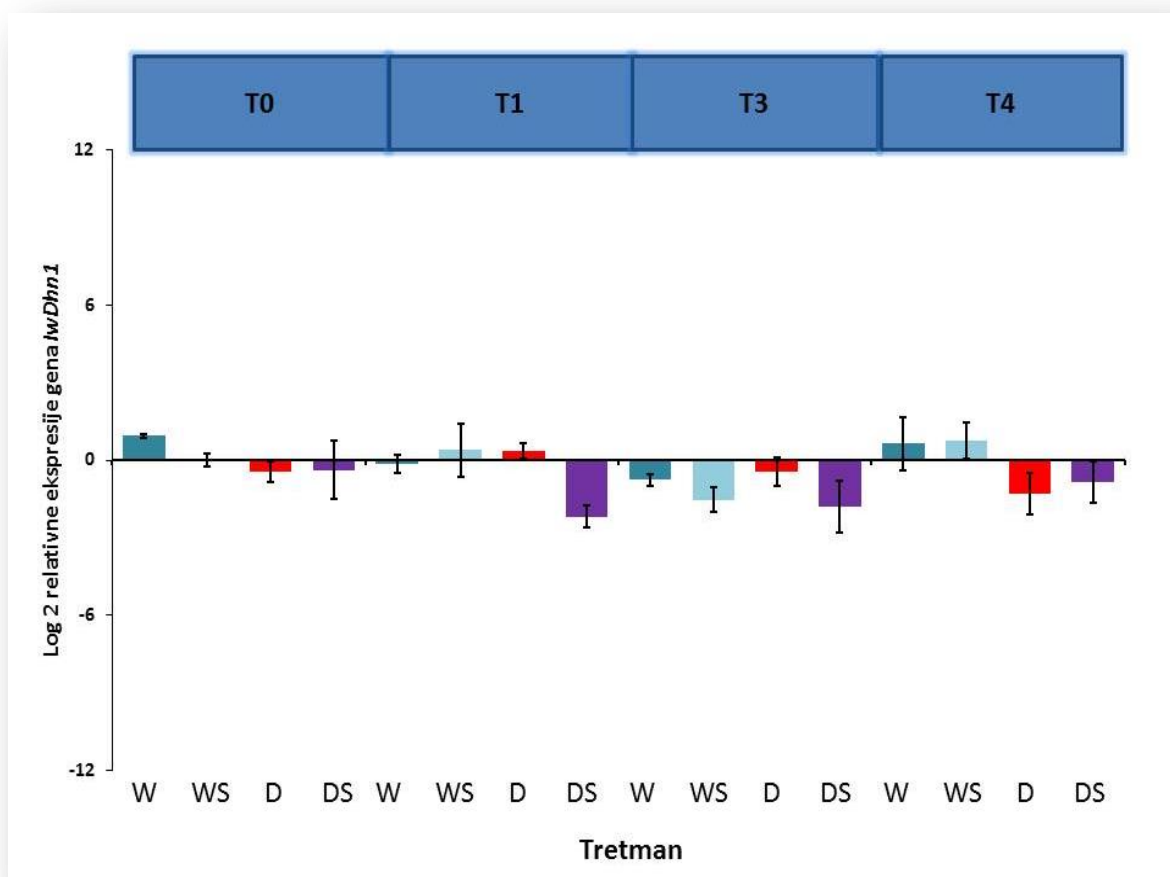
Pre nego što je urađena analiza ekspresije dehidrinskih gena, dizajnirani prajmeri za praćenje njihove ekspresije su prvobitno testirani u PCR reakcijama kako bi se proverila sama specifičnost prajmera i utvrdilo da li su željeni fragmenti očekivane dužine (**Slika 47.**). Za testiranje prajmera korišćena je cDNK kontrolnih uzoraka listova i uzoraka listova biljaka *I. walleriana* koje su bile izložene vodnom stresu.



**Slika 47.** Testiranje dizajniranih prajmera PCR metodom. A. Testiranje prajmera sa cDNK kontrolnih uzoraka listova *I. walleriana*. B. Testiranje prajmera sa cDNK uzoraka listova *I. walleriana* izloženih vodnom stresu. Dobijene dužine fragmenata su označene brojevima iznad traka.

Može se primetiti da je amplifikacija dela sekvence dehidrina bila uspešna korišćenjem sva tri para testiranih prajmera, kako kod kontrolnih, tako i kod uzoraka biljaka izloženih vodnom stresu i da dužina amplifikovanog regiona odgovara očekivanoj dužini (**Slika 47.**). Nakon testiranja prajmera, dalje se pristupilo analizi nivoa ekspresije dehidrinskih gena (*IwDhn1*, *IwDhn2.1* i *IwDhn2.2*) qRT-PCR metodom.

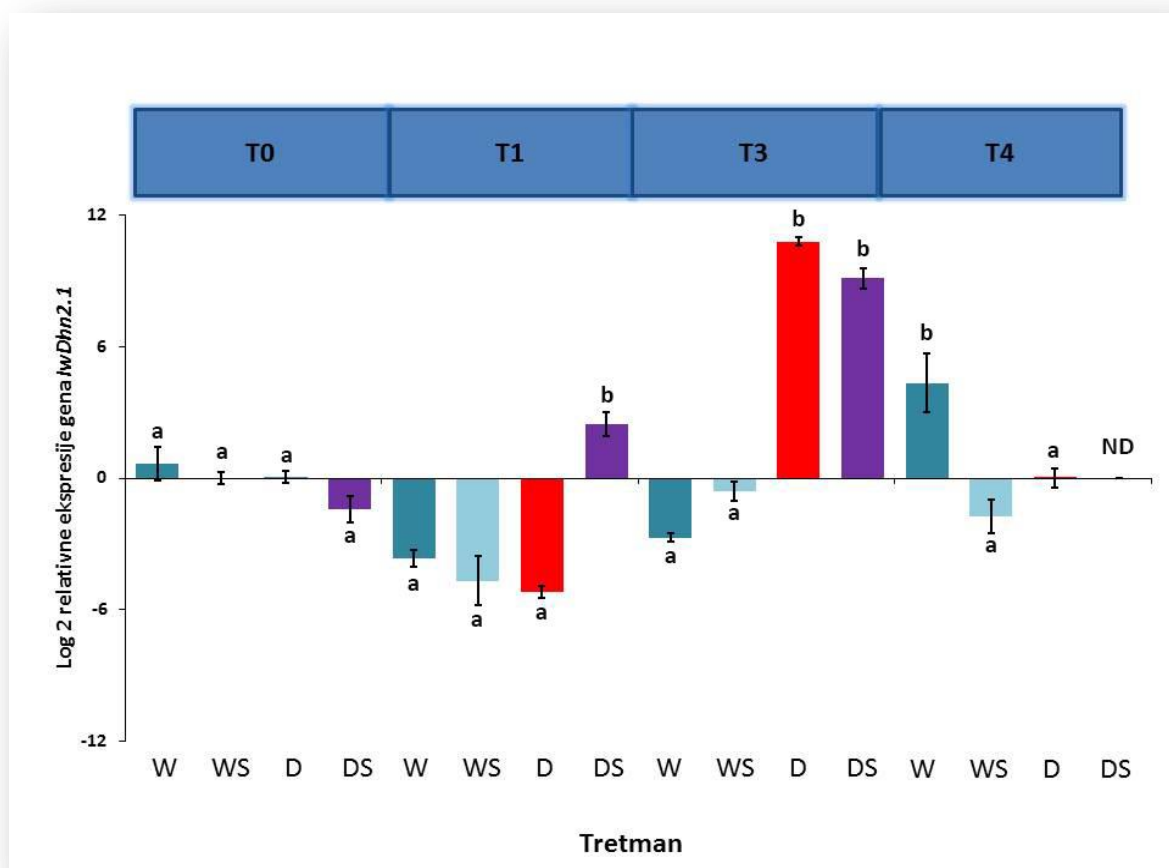
Utvrđeno je da se gen *IwDhn1*, koji kodira protein od 24,5 kDa, eksprimira kako pri optimalnim uslovima (T0), tako i u drugim tretmanima i vremenskim tačkama sa manjim odstupanjima (**Slika 48.**). Statistička analiza je pokazala da samo suša ima značajan efekat na ekspresiju *IwDhn1*, dok SA, vreme uzorkovanja ili interakcija ispitivanih faktora nisu imale statistički značajan efekat na ekspresiju ovog gena. Kod biljaka iz grupe D došlo je do povećanja ekspresije *IwDhn1* tako da je u tački T1 ekspresija bila 1,43, a u tački T3 1,24 puta veća u odnosu na ekspresiju ovog gena kod biljaka koje su bile zalivane i iste starosti (grupa W, tačke T1 i T3).



**Slika 48.** Relativna ekspresija *IwDhn1* gena kod biljaka *I. walleriana*. Grupe biljaka su obeležene sa W, WS, D i DS; dok su T0-T4 vremenske tačke uzorkovanja listova (Pogledati **Sliku 37.**). Srednje vrednosti i standardne devijacije su izračunate na osnovu tri biološka ponavljanja. Srednje vrednosti su analizirane korišćenjem faktorijalne ANOVA: samo vodni stres ima statistički značajan uticaj na relativnu ekspresiju *IwDhn1* gena, pa višestruka upoređivanja između tretmana nisu urađena.

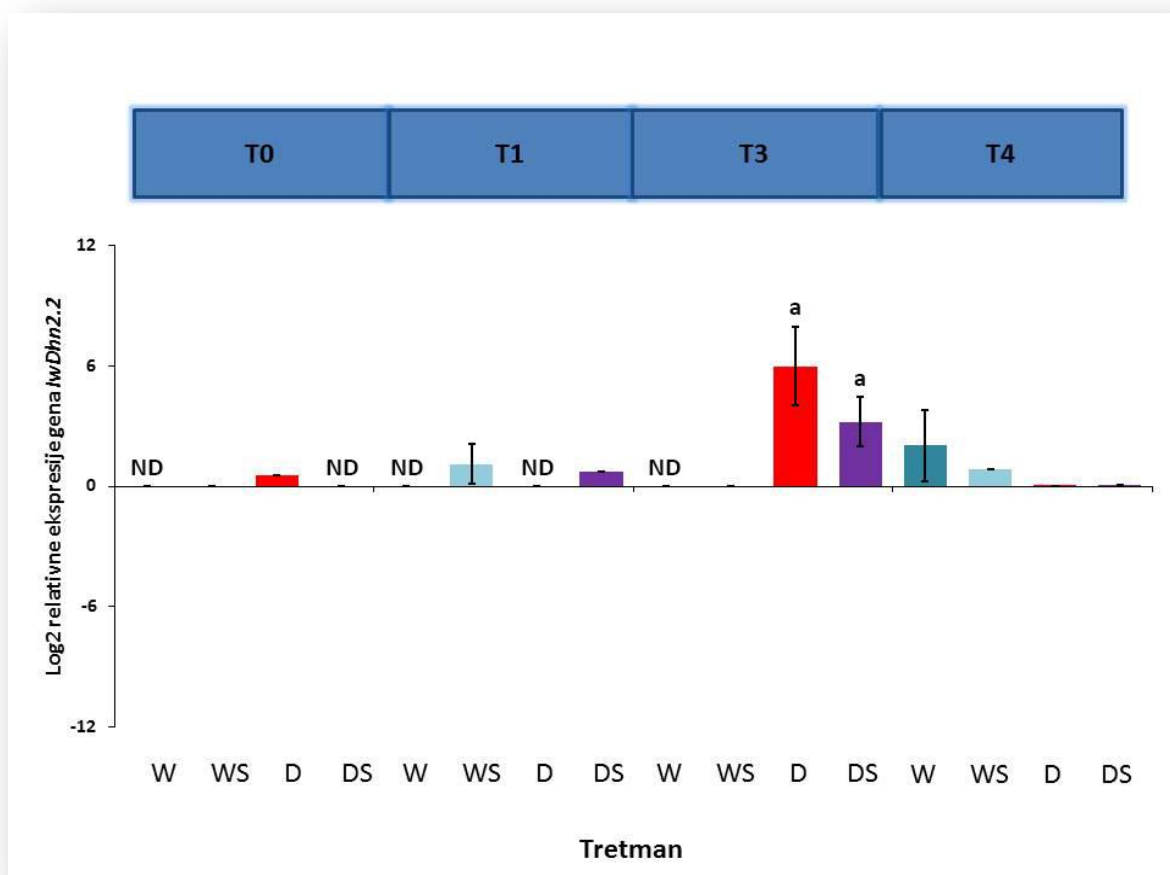
Za razliku od *IwDhn1*, ekspresija gena *IwDhn2.1* i *IwDhn2.2* je snažno indukovana vodnim stresom (**Slika 49.** i **Slika 50.**). Ekspresija *IwDhn2.1* se povećala  $10^4$  puta kod biljaka koje su bile pod uticajem vodnog stresa (D grupa biljaka, vremenska tačka T3) u poređenju sa kontrolnim biljkama iste starosti (**Slika 49.**). SA je indukovala ekspresiju gena *IwDhn2.1* kod DS grupe biljaka (kada se uporedi sa D grupom biljaka), odmah nakon primene SA (u vremenskoj tački T1). Ekspresija *IwDhn 2.1* gena kod DS grupe biljaka u vremenskoj tački T3, kada je vodni deficit bio najveći, je bila manja u odnosu na D grupu biljaka U slučaju *IwDhn2.1* interakcija faktora suša, SA i vreme, je bila značajna i to na nivou značajnosti  $p < 0,001$ . Efekat egzogene primene SA zavisi od toga da li su biljke prethodno bile zalivane, kao i u kojoj vremenskoj tački je vršeno uzorkovanje.





**Slika 49.** Relativna ekspresija *IwDhn2.1* gena kod biljaka *I. walleriana*. Grupe biljaka su obeležene sa W, WS, D i DS; dok su T0-T4 vremenske tačke uzorkovanja listova (Pogledati **Sliku 37.**). Srednje vrednosti i standardne devijacije su izračunate na osnovu tri biološka ponavljanja. Srednje vrednosti su analizirane korišćenjem trofaktorijske ANOVA: interakcija faktora: dehidratacija, SA i vremena uzimanja uzoraka na relativnu ekspresiju *IwDhn2.1* je statistički značajana pa je upoređivanje srednjih vrednosti urađeno Takijevim testom. Statističke razlike obeležene su različitim slovima ispod i iznad barova ( $p < 0,05$ ). ND – ekspresija gena nije detektovana.

Ekspresija *IwDhn2.2* se vrlo malo detektuje u većini vremenskih tačaka, izuzev kada je reč o biljkama koje su izložene suši (D grupa biljaka, vremenska tačka T3), a tada je ekspresija ovog gena izuzetno visoka (**Slika 50.**). Primena SA dovela je do smanjenja ekspresije *IwDhn2.2* kod biljaka iz grupe DS u odnosu na ekspresiju ovog gena kod biljaka iz D grupe u vremenskoj tački T3, ali to smanjenje nije bilo statistički značajno.



**Slika 50.** Relativna ekspresija *IwDhn2.2* gena kod biljaka *I. walleriana*. Grupe biljaka su obeležene sa W, WS, D i DS; dok su T0-T4 vremenske tačke uzorkovanja listova (Pogledati **Sliku 37.**). Srednje vrednosti i standardne devijacije su izračunate na osnovu tri biološka ponavljanja. Za ekspresiju *IwDhn2.2* gena urađena su poređenja između D i DS tretmana u tački T3 korišćenjem Velšovog t-testa. ND – ekspresija gena nije detektovana.

## 5. Diskusija

Biljke se suočavaju sa vodnim stresom najčešće kada je niska količina vode u zemljištu i niska relativna vlažnost vazduha, što je obično praćeno i visokom temperaturom vazduha. Svi procesi u biljkama su direktno ili indirektno pogođeni nedostatkom vode. Suša dovodi do različitih odgovora kod biljaka, počev od promena na nivou ćelijskog metabolizma, do promena u stopi rastenja i razvića, kao i pokretanja različitih biohemijskih i molekularnih mehanizama (Akinci i Lösel, 2012).

SA kao biljni regulator rastenja ima pozitivan uticaj na rasteње i razviće biljaka. Njena pozitivna uloga utvrđena je u klijanju semena, cvetanju, i poboljšanju prinosa kod gajenih kultura. SA ima uticaj i na ćelijskom i molekularnom nivou u smislu usvajanja i transporta različitih jona, aktivacije antioksidativnih enzima i smanjenja oksidativnog stresa. U novijim studijama pokazano je da egzogena primena SA ima pozitivan uticaj na biljke koje su se nalazile u različitim stresnim uslovima (Hasanuzzaman, 2017b, Damalas i sar., 2019; Alam i sar., 2013).

U ovoj disertaciji proučavan je uticaj SA na *I. walleriana* koje su gajene u *in vitro* i *ex vitro* uslovima pri delovanju vodnog stresa. Proučavanje efekta vodnog stresa i faktora koji poboljšavaju njihov odgovor, u slučaju ove disertacije to je SA, je značajno zbog mogućnosti povećanja tolerancije biljaka prema vodnom stresu. Povećanje tolerancije biljaka prema vodnom stresu je posebno važno istraživati imajući na umu negativne posledice koje nedostatak vode može imati na komercijalno gajene cvetnice poput *I. walleriana*.

### 5.1. Morfo-anatomski i biohemijski odgovori biljaka *I. walleriana* gajenih *in vitro* u uslovima PEG indukovnog vodnog stresa

PEG je osmotski aktivano jedinjenje velike molekulske težine koje se upotrebljava u eksperimentima za simulaciju vodnog stresa. Komercijalno je dostupno više jedinjenja PEG sa različitim molekulskim težinama, na koje ukazuje broj u nazivu. PEG molekulske mase 6000 g/mol ili više, ne može da prođe kroz pore ćelijskog zida (Carpita i sar., 1979). U *in vitro* eksperimentima, u ovoj disertaciji, u kojima je ispitivan uticaj vodnog stresa na biljke *I. walleriana* korišćen je PEG<sub>8000</sub>, u tri koncentracije: 1, 2 i 3%. Vodni potencijal korišćenih koncentracija PEG iznosio je u slučaju 1% PEG: -2,05 MPa; 2% PEG: -5,55 MPa; i 3% PEG -11.45 MPa.

Budući da su biljke *I. walleriana* osetljive na vodni stres pretpostavljeno je da će dodatak PEG u hranljivu podlogu dovesti do vidljivih negativnih promena na posmatrane morfološke parametre (visina biljke, masa biljke, broj izdanaka po biljci i broj listova) i to srazmerno upotrebnoj koncentraciji PEG. Ova očekivanja su i eksperimentalno potvrđena (**Slika 20.**), tako dodatak PEG u hranljivu podlogu doveo je do negativnog efekta na sve posmatrane parametre, srazmerno upotrebnoj koncentraciji. Prosečna visina izdanka *I. walleriana* se smanjivala što je koncentracija PEG u podlozi bila viša (**Slika 21.**). Ista situacija je bila i sa ostalim parametrima, odnosno prosečnom masom svežih biljaka (**Slika 22.**), prosečnim brojem izdanaka po biljci (**Slika 23.**), kao i prosečnim brojem listova (**Slika 25.**). Prethodni literaturni podaci takođe potvrđuju ova zapažanja. Kod biljaka *I. walleriana* koje su gajene u hidroponskom sistemu, dodavanje PEG u hranljivi rastvor je dovelo do smanjenja visine biljaka, debljine stabla i dužine korenova (Burnett i sar., 2005). Bajji i sar. (2000) su pokazali da dodavanje PEG u hranljivu podlogu ili u rastvor za hidroponsko gajenje biljaka dovodi do smanjenja mase svežih biljaka, kao i odnosa dužine

koren/izdanak kod tri kultivara pšenice. Marcińska i sar. (2013) su takođe na pšenici pokazali da primena PEG dovodi i do smanjenja biomase, kao i mase i broja zrna u klasovima kod ove biljne vrste. Primena PEG je dovela do smanjenja stope rasta korenova i izdanaka i kod tri vrste južnoafričkih trava (Van den Berg i Zeng, 2006). Suša utiče negativno i na razviće biljaka, što se najčešće utvrđuje brojem novo formiranih izdanaka po biljci u *in vitro* uslovima (stopa multiplikacije). Smanjenje stope proliferacije u uslovima vodnog stresa je utvrđeno kod banane, soje i *Lathyrusa* (Sakthivelu i sar., 2008; Bidabadi i sar., 2012; Piwowarczyk i sar., 2014). Suša usporava rastenje i dovodi do smanjenja stope ćelijskih deoba, negativno utiče na usvajanje nutrijenata putem korena kao i na fotosintezu (Farooq i sar., 2009).

U ovoj disertaciji je pokazano da se smanjenje relativnog sadržaja vode u izdancima *I. walleriana* gajenih *in vitro* na hranljivoj podlozi sa PEG javlja kao posledica vodnog stresa (**Slika 25.**). RWC je parametar koji nam pokazuje vodni status biljke i može biti pokazatelj tolerancije biljaka prema dehidraciji (Alam i sar., 2013). Literaturni podaci pokazuju da je RWC snižen značajno i kod slačice (Alam i sar., 2013), pšenice (Bajji i sar., 2000; Marcińska i sar., 2013) i banane (Bidabadi i sar., 2012), kada se ove biljke gaje na podlozi sa PEG, kao i kod *Celosia argentea* (Odjegba i Adeniyi, 2012) i paradajza (Hayat i sar., 2008) kada se izlože suši. Pored RWC, LWL je drugi parametar koji se često koristi pri proučavanju vodnog stresa. Suša može da dovede do oštećenja ćelijskih membrana u listovima, disbalansa elektrolita i gubitka vode (Hayat i sar., 2008). Na **Slici 24.** se može videti da PEG-indukovani vodni stress dovodi do povećanja vrednosti LWL kod biljaka *I. walleriana* gajenih *in vitro*. I kod dugih biljnih vrsta je pokazano da dolazi do povećanja vrednosti ovog parametra pri vodnom stresu, poput banana (Bidabadi i sar., 2012), paradajza (Hayat i sar., 2008) i *Vigna radiate* (Raina i sar., 2016). U retkim slučajevima može doći i do pada vrednosti LWL, što je pokazano kod pšenice tokom delovanju osmotskog stresa na biljke (Xing i sar., 2004).

PEG-indukovani vodni stres doveo je do smanjenja koncentracije hlorofila (**Slika 27.**) i sadržaja ukupnih fotosintetskih pigmenata kod *I. walleriana* (**Slika 29.**), dok je sadržaj karotenoida ostao nepromenjen (**Slika 28.**). Značajno smanjenje sadržaja hlorofila je utvrđeno i kod drugih biljnih vrsta koje su bile izložene suši kao što je slačica (Alam i sar., 2013), banana (Bidabadi i sar., 2012), paradajz (Hayat i sar., 2008), pšenica (Marcińska i sar., 2013), *C. argentea* (Odjegba i Adeniyi, 2012), *Lathyrus sp.* (Piwowarczyk i sar., 2014), ali i kod nekih drvenastih vrsta (Liu i sar., 2011). Vodni stres dovodi do zatvaranja stoma kako bi se smanjilo odavanje vode putem transpiracije, što za posledicu ima smanjenje unosa CO<sub>2</sub>, čime se smanjuje stopa fotosinteze, a povećava nivo fotorespiracije. U PSI dolazi do zastoja u prenosu elektrona, jer je NADP redukovano, usled usporavanja biohemijskih reakcija u kojima se NADP ponovo oksiduje. Elektroni se sa feredoksina prenose na kiseonik umesto na NADP, pri čemu nastaje O<sub>2</sub><sup>-</sup>, a zatim i drugi ROS (Asada, 2006; Nešković i sar., 2010; Saleem i sar., 2021). Hloroplasti su organele koje apsorbovanu svetlosnu energiju iskorišćavaju za proizvodnju ATP, neophodnog za sintezu ugljenih hidrata. Kada proizvodnja ROS postane izuzetno velika, a antioksidativni sistem ne može efikasno da ih eliminiše, dolazi do oštećenja i degradacije pigmenata i proteina u hloroplastima, pa se na taj način može objasniti smanjenje koncentracije hlorofila koje se dešava pri vodnom stresu u ovoj, ali i u drugim studijama (Halliwell i Gutteridge, 2015; Triantaphylidés i sar., 2008).

Peroksizomalna produkcija H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u listovima biljaka je najčešće rezultat aktivnosti glikolat-oksidadze. Glikolat-oksidadza je najvažniji deo fotorespiratornog puta koji se pokreće oksigenacijom ribuloza-1,5-bisfosfata (Ru-1-5-BP) u hloroplastima. Nastanak glikolata je ubrzan tokom suše jer je smanjen unutarćelijski nivo CO<sub>2</sub> zbog zatvaranja stoma. Na taj način je favorizovana oksigenacija RuBP i peroksizomalna produkcija H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Noctor i sar., 2014). Oksigenacijom Ru-1-5-BP dobija se jedan molekul fosfoglikolne kiseline i jedan molekul 3-fosfoglicerinske kiseline (3-PGA), umesto dva molekula 3-PGA koliko se obično dobija karboksilacijom. Molekul 3-PGA nastavlja svojim uobičajnim putem i uključuje se u reduktivni pentozni ciklus, samo ga pri oksigenaciji ima upola manje. Fosfoglikolat se pomoću fosfoglikolatne fosfataze prevodi u glikolat, koji izlazi iz

hloroplasta pomoću posebnog proteinskog prenosioca, pa ulazi u peroksizom (**Slika 7.**). Glikolna kiselina se u peroksizomu oksiduje pomoću glikolatne oksidaze u gliksalat, pri čemu se troši O<sub>2</sub>, a stvara H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Nešković i sar., 2010). Da tretman PEG dovodi do oksidativnog stresa kod *I. walleriana* potvrđeno je i akumulacijom H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (**Slika 29.**) i povećanjem koncentracije MDA koja ukazuje na lipidnu peroksidaciju i oštećenje membrana (**Slika 31.**). Ovaj rezultat je u skladu sa literaturnim podacima u kojima je takođe pokazano da primena PEG dovodi do povećanja H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i to kod slačice (Alam i sar., 2013) i banane (Bidabadi i sar., 2012), kao i do povećanja koncentracije MDA kod paradajza, banane, slačice i pšenice (Hayat i sar., 2008; Bidabadi i sar., 2012; Alam i sar., 2013; Marcińska i sar., 2013).

Akumulacija prolina kao značajnog osmolita, je korelisana sa tolerancijom biljaka prema vodnom stresu, s obzirom da ovo jedinjenje doprinosi različitim odgovorima biljke na nedostatak vode, uključujući osmotsko prilagođavanje, osmoprotekciju, antioksidativno delovanje i eliminisanje ROS (Verbruggen i Hermans, 2008; Farooq i sar., 2009). *I. walleriana* tretirana PEG akumulira više prolina (**Slika 32.**), što predstavlja najčešći odgovor biljaka na vodni stres, a pokazano je isto i kod slačice (Alam i sar., 2013), pšenice (Bajji i sar., 2000; Marcińska i sar., 2013), paradajza (Hayat i sar., 2008), *Lathyrus* sp. (Piwowarczyk i sar., 2014). Prolin učestvuje u stabilizaciji ćelijskih membrana i proteina, kontroliše ćelijski redoks potencijal prilikom stresa i učestvuje u ćelijskoj signalizaciji (Verbruggen i Hermans, 2008; Farooq i sar., 2009; Hayat i sar., 2012).

Kao odgovor na povećan sadržaj ROS, ćelije aktiviraju i antioksidativne enzime: SOD, CAT, POX i enzime askorbat-glutation ciklusa. Kod *I. walleriana* koje su tretirane PEG došlo je do povećanja aktivnosti sva tri izučavana antioksidativna enzima: SOD (**Slika 33.**), CAT (**Slika 34.**) i POX (**Slika 37.**). U prethodnim studijama je pokazano da suša dovodi do povećanja aktivnosti CAT, SOD i POX i kod klijanaca paradajza (Hayat i sar., 2008), nekoliko drvenastih biljnih vrsta (Liu i sar., 2011) i *C. setose* (Kadioğlu i sar., 2010). Primena 3% PEG indukuje osam POX izoformi u listovima *in vitro* gajenih *I. walleriana* (**Slika 36.**). Izoforme B i I (**Slika 36.**), koje su bile indukovane virusnom infekcijom kod ove biljne vrste u studiji Milošević i sar. (2012), su takođe pokazale najviši nivo aktivnosti i u uslovima PEG indukovanog vodnog stresa. Aktivnost izoforme H je uočena samo u listovima *I. walleriana* na tretmanu sa 3% PEG, ali ne i u kontroli. Ovakav rezultat nam ukazuje da kod *I. walleriana* možda postoji slična regulacija aktivnosti POX izoformi tokom oksidativnog stresa bilo da je indukovano biotičkim ili abiotičkim stresom.

## 5.2. Uticaj SA na rastenje, razviće i biohemijske odgovore biljaka *I. walleriana* gajenih *in vitro* u uslovima PEG indukovanog vodnog stresa

Salicilna kiselina (SA) je važan biljni hormon koji učestvuje u procesima rastenja i razvića biljaka, kao i u odgovoru na različite abiotičke i biotičke faktore stresa. Korišćenje SA u niskim koncentracijama (10<sup>-8</sup>-10<sup>-2</sup>M) obično dovodi do povećane tolerancije prema abiotičkim faktorima stresa (Hayat i sar., 2010). Odgovor biljaka na SA zavisi od vrste, stadijuma u razviću biljke, načina primene (tretman listova, potapanje semena, ubrizgavanje u stablo, dodavanje u hranljivu podlogu), koncentracije SA koja se primenjuje, kao i endogenog nivoa u biljci.

SA je imala neznatni efekat na visinu (**Slika 21.**), broj listova (**Slika 24.**) i masu svežih biljaka (**Slika 22.**) koje nisu bile izložene vodnom stresu, a blago pozitivan efekat kod biljaka *I. walleriana* gajenih *in vitro* u uslovima PEG indukovanog vodnog stresa. SA je imala izuzetno pozitivan efekat na stopu multiplikacije u svim tretmanima (**Slika 23.**). U studiji sa vrhovima izdanaka banane, SA pri samostalnom delovanju nije imala efekta na stopu umnožavanja, ali je imala značajan uticaj na povećanje mase svežih izdanaka, dok je u kombinaciji PEG i SA došlo do

značajnog uvećanja i stope umnožavanja i mase svežih biljaka u odnosu na to kada je samo PEG prisutan u hranljivoj podlozi (Bidabadi i sar., 2012). Kod izdanaka hibiskusa 0,5 mM SA je dovela do povećanja stope umnožavanja i rastežnja biljaka, dok je koncentracija SA od 1 mM neznatno usporila rastežnje u poređenju sa kontrolom (Sakhanokho i Kelley, 2009). Kod kukuruza koji nije bio pod uticajem stresa kao i onog koji je bio pod stresom izazvanim povećanom koncentracijom soli, SA je dovela do povećanja svih proučavanih parametara rastežnja, čak i kada je korišćena u koncentraciji od 30  $\mu$ M (Khodary, 2004). Egzogeno primena SA je poboljšala klijanje, rastežnje klijanaca, masu svežih klijanaca, povećala je mitotičku aktivnost i rast ćelija korenova, i imala je uticaj u lakšem prevazilaženju suše i stresa izazvanog solima u podlozi kod pšenice (Shakirova i Sakhabutdinova, 2003; Kang i sar., 2012; Marcińska i sar., 2013). Sa druge strane, SA nije imala značajan efekat na soju (Khan i sar., 2012), a kada se primeni kao Na-salicilat čak je usporila rast *Salvia officinalis* i u koncentraciji od 30  $\mu$ M u odsustvu stresa (Kračun-Kolarević i sar., 2015). Efekti koje SA ima na parametre rastežnja su najverovatnije posledica njenog uticaja na očuvanje vode u biljci (Shakirova i Sakhabutdinova, 2003). Različiti efekti koje SA ispoljava na parametre rastežnja kod različitih biljaka su verovatno posledica interakcije SA sa velikim brojem receptora ili signalnih puteva koji regulišu rastežnje i razviće biljaka (Rivas-San Vicente i Plasencia, 2011).

Na osnovu rezultata prikazanih u ovoj disertaciji možemo pretpostaviti da SA omogućava održavanje hidratacije *I. walleriana*, samim tim i RWC prilikom vodnog stresa, tako što omogućava povećanu akumulaciju prolina i samim tim osmotsko prilagođavanje, kao i zaštitu membrana od lipidne peroksidacije. U korišćenom eksperimentalnom sistemu, SA je delimično suprimirala negativan efekat viših koncentracija PEG na RWC (**Slika 25.**), a bila je i visoko efikasna u održavanju niskog LWL kod biljaka koje su bile izložene jakom vodnom stresu (**Slika 26.**). U literaturnim podacima efekat SA na održavanje nivoa RWC u uslovima fiziološke suše bio je izraženiji kod drugih biljnih vrsta, poput slačice (Alam i sar., 2013), *C. argentea* (Odjegba i Adeniyi, 2012) i paradajza (Hayat i sar., 2008). Prema do sada sprovedenim studijama, SA nije imala uticaj na RWC kod biljaka koje nisu bile izložene stresnim uslovima (Bidabadi i sar., 2012; Odjegba i Adeniyi, 2012; Alam i sar., 2013; Marcińska i sar., 2013), što je isto pokazano i u ovoj disertaciji kod *I. walleriana*. Kod klijanaca paradajza, suša dovodi do narušavanja strukture membrana i povećanja disbalansa elektrolita, dok SA značajno suprimira ove negativne efekte (Hayat i sar., 2008). Pretpostavlja se da SA bar delimično održava RWC stabilnim tako što pojačava antioksidativnu odbranu organizma što za rezultat ima održavanje stabilnosti i integriteta ćelijskih membrana, smanjenje disbalansa elektrolita i gubitka vode (Demiralay i sar., 2013).

Kod *I. walleriana*, SA je imala značajan uticaj u zaštiti fotosintetskih pigmenta prilikom izlaganja biljaka vodnom stresu. Sve primenjene koncentracije SA (1, 2 i 3 mM) su suprimirale negativni uticaj vodnog stresa izazvanog PEG na sadržaj ukupnih fotosintetskih pigmenta u listovima (**Slika 28.**). Prema dostupnim podacima iz literature egzogeno primena SA povećava sadržaj hlorofila kod biljaka koje su izložene vodnom stresu (Hayat i sar., 2008; Bidabadi i sar., 2012; Odjegba i Adeniyi, 2012; Alam i sar., 2013; Marcińska i sar., 2013). Efekat egzogeno primenjene SA na sadržaj hlorofila kod biljaka koje nisu pod stresom varira u zavisnosti od biljne vrste. Efekat može biti pozitivan kao kod *I. walleriana* (**Slika 27.**), *C. argentea* (Odjegba i Adeniyi, 2012), i banane (Bidabadi i sar., 2012), negativan kao kod slačice (Alam i sar., 2013), ali ga i ne mora biti kao kod soje (Khan i sar., 2012). Efekat SA na fotosintetske pigmente ne zavisi samo od tipa stresa koji na biljku deluje, već i od primenjene koncentracije SA (Hayat i sar., 2010; Rivas-San Vicente i Plasencia, 2011). Primena SA u koncentracijama od 2 i 3 mM imala je značajan uticaj na povećanje sadržaja karotenoida u listovima *I. walleriana* na svim ispitivanim koncentracijama PEG-a (**Slika 28.**). Sa porastom koncentracije SA došlo je do porasta sadržaja karotenoida kod pšenice i graška (Moharekar i sar., 2003). Tretman SA je doveo do smanjenja sadržaja karotenoida kod šljive (Martínez-Esplá i sar., 2018). Kod mandarine tretman SA nije imao uticaja na sadržaj ukupnih karotenoida, ali je doveo do povećanja sadržaja  $\beta$ -kriptoksantina, koji je najzastupljeniji karotenoid u mandarinama (Yamamoto i sar., 2020). Moguće je da povećan sadržaj karotenoida u

listovima biljaka *I. walleriana* gajenih *in vitro* pri primeni 2 i 3 mM SA ima ulogu u zaštiti PSI i PSII, kao i neenzimsku antioksidativnu ulogu.

Pored zaštite fotosintetskih pigmenata u listovima *I. walleriana*, SA je imala i značajan efekat na zaštitu membrana od lipidne peroksidacije koja je procenjena na osnovu MDA akumulacije (**Slika 31.**). Nezavisno od primenjene koncentracije ovog jedinjenja i intenziteta vodnog stresa izazvanog PEG, SA je održavala sadržaj MDA na nivou kontrole. Primena SA je smanjila zastupljenost MDA u listovima slačice (Alam i sar., 2013), banane (Bidabadi i sar., 2012), paradajza (Hayat i sar., 2008) i *C. argentea* (Odjegba i Adeniyi, 2012) koji su bili izloženi suši. Smanjenje sadržaja MDA je najverovatnije posledica SA posredovane indukcije antioksidativnog sistema i uklanjanja ROS. Moguće je da je SA delovala i na akumulaciju prolina i tako dodatno zaštitila membranske lipide i smanjila akumulaciju MDA. Egzogeno primena SA često stimuliše akumulaciju prolina u biljkama koje su izložene stresu (Misra i Saxena, 2009), a efekat SA je posebno uočljiv kod biljaka koje se karakterišu niskim nivoom akumulacije prolina u uslovima vodnog stresa poput *I. walleriana* (**Slika 32.**), banane (Bidabadi i sar., 2012), pšenice (Maricińska i sar., 2013) i paradajza (Hayat i sar., 2008). Kod *I. walleriana* (**Slika 32.**) i banane (Bidabadi i sar., 2012), egzogeno primena SA nije imala efekta na akumulaciju prolina kod biljaka koje nisu bile pod stresom, međutim u uslovima vodnog stresa kod *I. walleriana* SA je dovela do značajne akumulacije prolina, a kod paradajza (Hayat i sar., 2008) i pšenice (Shakirova i Sakhabutdinova, 2003) SA može da dovede do povećanja koncentracije prolina i kod biljaka koje nisu bile izložene stresu i kod onih koje su bile izložene stresu. Prolin ima i antioksidativnu ulogu, pa je moguće da povećanje nivoa prolina pod uticajem SA dovodi do uklanjanja ROS koji nastaje kao posledica vodnog stresa (Hayat i sar., 2012; Signorelli i sar., 2014).

Egzogeno primena SA može da inhibira aktivnost CAT kod *I. walleriana*, a efekat je izraženiji kod biljaka koje su izložene jačem vodnom stresu, nego kod biljaka koje nisu pod stresom (**Slika 34.**). Ovo je u skladu sa rezultatima dobijenim kod biljaka *C. argentea* kod kojih je SA smanjila CAT aktivnost (Odjegba i Adeniyi, 2012). CAT je prvi identifikovani protein koji vezuje SA (SABP – *salicylic acid binding protein*) i osetljiv je na inhibiciju SA (Manohar i sar., 2015). U sličnim istraživanjima, utvrđeno je da SA može dovesti do povećanja aktivnosti CAT, kao npr. kod *C. setosa* (Kadioğlu i sar., 2010; Demiralay i sar., 2013). Različite izoforme CAT mogu da se razlikuju u osetljivosti na SA (Chen i sar., 1997).

Aktivnost totalnih POX (**Slika 35.**) raste sa povećanjem intenziteta vodnog stresa, odnosno sa povećanjem koncentracije PEG u podlozi. Primena SA dovela je do povećanja aktivnosti POX kod biljaka koje nisu bile izložene vodnom stresu, naročito na podlogama sa 2 i 3 mM SA. Sa druge strane kod biljaka koje su bile izložene PEG indukovanim vodnom stresu, SA dovodi do smanjenja aktivnosti peroksidaza. U drugim studijama rezultati su pokazali da SA povećava aktivnost POX kod biljaka koje su izložene vodnom stresu, kao kod slačice (Alam i sar., 2013), klijanaca ječma (Ananieva i sar., 2004), u listovima *C. setose* (Kadioğlu i sar., 2010), dok je u kljancima paradajza pokazano da SA povećava aktivnost POX i kod biljaka koje su bile izložene vodnom stresu, ali i kod kontrolnih biljaka (Hayat i sar., 2008). Detektovane aktivnosti ukupnih peroksidaza u ovoj disertaciji ukazuju da primena SA u *in vitro* sistemu ima najverovatnije dvostruki efekat na aktivnost peroksidaza. U zavisnosti od uslova koji deluju na biljke najverovatnije dolazi do aktivacije različitih izoformi peroksidaza, tako vodni stres u kombinaciji sa egzogenom primenom SA ima uticaj na različite izoforme peroksidaza (**Slika 35.**). Nativ-PAGE elektroforeza (**Slika 36.**) je pokazala da PEG indukovani vodni stres indukuje svih 8 do sada poznatih izoformi POX kod *I. walleriana*, a posebno aktivnost B i I, dok tretman SA pospešuje aktivnost izoformi C, D, E, G, a inhibira A, B, H, I, bez obzira na prisustvo PEG. Ukupna aktivnost POX (**Slika 35.**) je rasla sa porastom SA (2 i 3 mM SA), iako biljke nisu bile pod uticajem vodnog stresa jer je došlo do aktivacije POX izoformi C, D, E i G. Ukupna aktivnost POX kod biljaka koje su bile pod jakim stresom (2 i 3% PEG u kombinacijama sa 2 ili 3 mM SA) je smanjena jer je došlo do inhibicije izoformi A, B, H i I u tretmanima sa SA (**slika 35.**). Različita regulacija POX izoformi kod *I.*

*walleriana* je primećena i prilikom virusne infekcije, kao i eliminacije virusa bronzavosti paradajza (Milošević i sar., 2012).

SA je kod *I. walleriana* gajenih *in vitro* smanjila SOD aktivnost u listovima (**Slika 33.**), što predstavlja različit rezultat jer je u sličnim eksperimentima utvrđeno da SA blago indukuje SOD aktivnost (Ananieva i sar., 2004; Hayat i sar., 2008; Kadioğlu i sar., 2010; Demiralay i sar., 2013). Budući da su *in vitro* eksperimenti u ovoj disertaciji, u kojima su korišćeni PEG i SA, trajali 60 dana, postoji mogućnost da je to možda razlog zbog čega je došlo do smanjenja ukupne aktivnosti CAT, POX i SOD, iako se na osnovu literature očekuje da dođe do povećanja aktivnosti.

Rezultati su pokazali da vodni stres koji je postignut dodavanjem PEG u hranljivu podlogu dovodi do povećanja koncentracije vodonik peroksida pri koncentracijama od 2 i 3% PEG. Dodatak SA u hranljivu podlogu nije uticao na nivo  $H_2O_2$  kod biljaka koje nisu izložene stresu, osim u slučaju koncentracije od 3 mM SA. U uslovima vodnog stresa sve primenjene SA koncentracije dovode do značajnog smanjenja nivoa vodonik peroksida (**Slika 30.**), a najbolji rezultat postignut je sa 3 mM SA. SA pokazuje dvojak efekat prilikom delovanja različitih stresova uključujući i sušu (Herrera-Vásquez i sar., 2015). Stresom indukovani  $H_2O_2$  dovodi do biosinteze SA (Herrera-Vásquez i sar., 2015). SA, bilo da je reč o egzogeno dodatoj ili sintetisanoj u biljci deluje tako što inhibira dva glavna enzima koja vrše detoksifikaciju  $H_2O_2$  – SABP katalazu i askorbat peroksidazu (Miura i Tada, 2014; Herrera-Vásquez i sar., 2015). Tako da u prvoj prooksidativnoj fazi SA posredno dovodi do povećanja nivoa ROS, naročito  $H_2O_2$  (Horvath i sar., 2007; Kadioğlu i sar., 2010). Sa povećanjem nivoa ROS, obično dolazi i do povećanja nivoa antioksidativnih enzima – CAT, POX, SOD kao i enzima ciklusa askorbat-glutation (Ananieva i sar., 2004; Hayat i sar., 2008; Kadioğlu i sar., 2010; Demiralay i sar., 2013, Miura i Tada, 2014). U drugoj antioksidativnoj ili redukcionoj fazi, SA povećava GSH/GSSG odnos što dovodi do pojačanog uklanjanja ROS (Herrera-Vásquez i sar., 2015). Ovaj mehanizam bi mogao objasniti smanjenje nivoa  $H_2O_2$  kod *I. walleriana* pri dodatku SA u uslovima PEG indukovano vodnog stresa u poređenju sa netretiranim biljkama izloženim vodnom stresu, a zatim i pad antioksidativne aktivnosti.

### 5.3. Mehanizmi delovanja SA u indukciji tolerancije biljaka *I. walleriana* gajenih *ex vitro* prema vodnom stresu

Ukrasne biljke usled načina skladištenja su često izložene nedostatku vode što za posledicu ima negativan efekat na cvetanje i samim tim na njihovu komercijalnu vrednost. Rezultati istraživanja u *in vitro* uslovima dobijeni u ovoj disertaciji pokazali su da SA pospešuje odgovore biljka *I. walleriana* na delovanje suše, međutim ovaj eksperimentalni sistem ne pruža mogućnost ispitivanja uticaja vodnog stresa i SA na cvetanje ove ukrasne biljne vrste. Zato je u *ex vitro* sistemu ispitan uticaj folijarne primene 2 mM SA na cvetanje biljaka *I. walleriana* koje su bile zalivane ili izložene vodnom stresu. Rezultati ovog eksperimenta su pokazali da jedino suša utiče na prosečan broj pupoljaka i cvetova, dok primena SA nema uticaja na cvetanje *I. walleriana* (**Slika 38.**). Slični podaci o uticaju vodnog stresa na cvetanje *I. walleriana* gajenih *ex vitro* dobijeni su i u studijama drugih autora: Blanchard i sar., 2007; Chyliński i sar 2007; Blanusa i sar., 2009; Anderson 2011. Međutim, ni jedna od ovih studija nije objasnila mehanizam kako dolazi do smanjenja broja cvetova pri vodnom stresu kod *I. walleriana*. Dati mehanizam se razlikuje kod različitih biljnih vrsta i može predstavljati nepravilno formiranje pupoljaka, odbacivanje cvetova, ili smanjenje u veličini biljaka koja dovodi do smanjenja mesta za formiranje pupoljaka (Blanusa i sar., 2009). Rezultati prikazani u ovoj disertaciji su pokazali da biljke imaju značajno manji prosečan broj cvetova i cvetnih pupoljaka u uslovima intenzivnog stresa (D i DS grupa biljaka, tačka T3, **Slika 37.** i **Slika 38.**) u odnosu na prosečan broj cvetova i cvetnih pupoljaka kod biljaka koje su zalivane. Ovaj rezultat pokazuje da je mehanizam redukcije broja cvetova i cvetnih pupoljaka kod *I. walleriana* način



odbrane, jer generalno biljke koje su izložene različitim vrstama stresa, a naročito suši, odbacuju cvetove kako bi sačuvale asimilate koji su im potrebni da prežive. U sličnom eksperimentu sa biljkama *I. walleriana* koje su gajene *ex vitro*, tokom trajanju vodnog stresa od 2-12 dana, prosečan broj otvorenih cvetova po biljci je pokazivao opadajući trend kako je period suše trajao duže (Blanchard i sar., 2007). Autori su pokazali da egzogena primena ABA, koja takođe predstavlja hormon stresa, takođe nema efekta na cvetanje biljaka izloženih vodnom stresu, isto kao što ni SA nije imala efekta na cvetanje *I. walleriana* u ovoj disertaciji. Ipak, u nekim drugim slučajevima kod drugih biljnih vrsta, SA je imala pozitivan uticaj na indukciju cvetanja, kao npr. kod *Spirodela* i *Wolfia microscopica* (Hayat i sar., 2010).

S obzirom da RWC odražava vodni status biljke i povezan je sa tolerancijom biljaka prema suši (Anjum i sar., 2011), često je korišćen u studijama vodnog stresa. Kod biljaka *I. walleriana* koje su bile izložene intenzivnom vodnom stresu u eksperimentu sprovedenom u ovoj disertaciji, RWC se spustio na 66,8% (D grupa biljaka, tačka T3) (**Slika 38.**) što je niže od letalne vrednosti RWC za ovu vrstu koja iznosi 73%. Letalna tačka je definisana kao stanje u kome je preostalo manje od osam vijabilnih listova na biljkama. U studiji Augé i sar., 2003 bilo je potrebno da se biljke *I. walleriana* ne zalivaju 55 dana kako bi se došlo do letalne tačke, pri čemu je RWC iznosio 73%. Budući da postoji pozitivan odgovor *I. walleriana* na rehidraciju (**Slika 37.**, vremenska tačka T4), letalna tačka u ovom eksperimentu nije postignuta, ni nakon 13 dana od prestanka zalivanja. U studiji Chyliński i sar. (2007) došlo je do još većeg smanjenja vrednosti RWC kod *I. walleriana*. Kod biljaka koje nisu bile izložene stresu on je iznosio 96,4%, dok je kod biljaka kod kojih je vodni deficit bio izuzetno izražen došlo do pada RWC na 56,1%. U eksperimentima *in vitro* koji su sprovedeni u ovoj disertaciji kada je suša indukovana PEG, došlo je do smanjenja RWC od 38% na hranljivoj podlozi sa 3% PEG u poređenju sa kontrolom (**Slika 25.**). Na osnovu svih ovih eksperimentalnih rezultata, može se reći da smanjenje vrednosti RWC pri vodnom stresu zavisi od eksperimentalnih uslova. Augé i sar. (2003) su pokazali da je *I. walleriana* treća najosetljivija vrsta na vodni stres među 30 testiranih cvetnica (Augé sar., 2003), kao i najosetljivija među 17 zeljastih jednogodišnjih cvetnica (Henson i sar., 2006). Ovo je i razumljivo ako pođemo od činjenice da je rod *Impatiens* poreklom iz tropskih kišnih šuma sa sukulentnim stablom i nedostatkom bilo kakve značajnije zaštite od gubitka vode tokom perioda vodnog stresa.

Egzogena upotreba SA utiče pozitivno na održavanje visokog RWC pri vodnom stresu kod velikog broja biljnih vrsta. Viši RWC kod SA tretiranih biljaka u poređenju sa netretiranom kontrolom je utvrđen kod: pšenice (Agrawal i sar., 2005), *C. argentea* (Odjegba i Adeniyi, 2012), senfa (Alam i sar., 2013) i pirinča (Sohag i sar., 2020) koji su bili izloženi vodnom stresu, dok je kod *C. setosa* čak i jako niska koncentracija SA od 1  $\mu$ M bila delotvorna u delimičnom održavanju RWC tokom perioda produžene suše (Kadioğlu i sar., 2010). Pokazano je da SA povećava RWC kod biljaka pri vodnom stresu i ako se primeni neposredno posle izlaganja suši (Hayat i sar., 2008). SA nema značajnijeg efekta na biljke koje nisu pod stresnim uslovima (Alam i sar., 2013, Odjegba i Adeniyi, 2012), osim kod paradajza (Hayat i sar., 2008).

MDA je jedan od proizvoda lipidne peroksidacije, čija zastupljenost u biljnim tkivima i organima predstavlja indikator oštećenja membrana tokom oksidativnog stresa (Anjum i sar., 2011). U *ex vitro* eksperimentu urađenim u ovoj disertaciji, egzogeno primenjena SA je potpuno zaštitila membrane biljaka koje su bile izložene suši, s obzirom da je nivo MDA kod biljaka iz DS grupe bio na nivou kontrole (W) ili čak i niži u svim vremenskim tačkama (**Slika 41.**). U *in vitro* sistemu, primena 2 mM SA je takođe zaštitila *I. walleriana* koje su bile tretirane PEG od akumulacije MDA. Zaštitni efekat koji SA ispoljava u smislu smanjenja lipidne peroksidacije odnosno smanjenja MDA je primećen i kod velikog broja drugih ispitivanih biljnih vrsta (Agrawal i sar., 2005; Hayat i sar., 2008; Kadioğlu i sar., 2010; Odjegba i Adeniyi, 2012; Alam i sar., 2013; Sohag i sar., 2020). Kod *C. setosa* utvrđeno je da su biljke koje su tretirane sa SA imale značajno niži nivo MDA u odnosu na netretiranu kontrolu (Kadioğlu i sar., 2010). Sličan efekat postignut je i kod *C. argentea* (Odjegba i Adeniyi, 2012), *Brassica juncea* (Alam i sar., 2013), pirinča (Sohag i sar., 2020), kao i

pšenice, gde je SA takođe imala i pozitivan efekat na indeks stabilnosti membrana (Agrawal i sar., 2005). Kod paradajza koji je izložen suši, a potom tretiran sa SA, SA je dovela do značajnog smanjenja “curenja” elektrolita i lipidne peroksidacije, kao i povećanja indeksa stabilnosti membrana (Hayat i sar., 2008).

Akumulacija prolina je čest odgovor biljaka koje su izložene vodnom stresu (Anjum i sar., 2011), zato su ispitivane promene nivoa prolina kod biljaka *I. walleriana* u eksperimentu *ex vitro*. Zajednički efekat suše i SA na nivo prolina zavisi od biljne vrste i eksperimentalnih uslova. Kod *I. walleriana* i suša i SA povećavaju akumulaciju prolina (**Slika 40.**). Pretretman sa SA je kod *Brassica napus* povećao nivo akumuliranog prolina i kod biljaka koje su potom bile izložene suši i kod kontrolne grupe biljaka (La i sar., 2020). Kod paradajza je tretman SA posle izlaganja vodnom stresu imao isti efekat (Hayat i sar., 2008). Kod *B. napus* utvrđeno je da SA indukuje ekspresiju gena koji učestvuju u sintezi prolina, poput gena za pirolin-5-karboksilat sintetazu i pirolin-5-karboksilat reduktazu, a smanjuje ekspresiju gena koji učestvuju u degradaciji prolina, prolin dehidrogenazu i pirolin-5-karboksilat-dehidrogenazu (Sohag i sar., 2020). Međutim, suša je dovela do povećanja sadržaja prolina kod klijanaca slačice, dok je SA koja je primenjena pri dejstvu suše dovela do smanjenja sadržaja prolina (Alam i sar., 2013). Sličan rezultat je dobijen za pirinač koji je rastao u zemljištu ili hidroponici (Sohag i sar., 2020).

Prolin spada u kompatibilne osmolite i omogućava osmotsko prilagođavanje biljaka u uslovima stresa (Farooq i sar., 2009). Prolin je povezan i sa dodatnim zaštitnim funkcijama u biljnim ćelijama u uslovima stresa: uklanjanje ROS, stabilizacija membrana, stabilizacija proteina elektron transportnog lanca u mitohondrijama, kao i skladištenje ugljenika i azota koji će biti dostupni za korišćenje kada prođu nepovoljni uslovi (Farooq i sar., 2009; Anjum i sar., 2011; Hayat i sar., 2012). Moguće je da akumulacija prolina kod *I. walleriana* dovodi do održavanja RWC (**Slika 39.**) pomoću osmotskog prilagođavanja. Međutim poređenjem nivoa MDA i prolina (**Slika 40.** i **Slika 41.**) vidi se da akumulacija prolina kod *I. walleriana* koja nastaje kao posledica delovanja suše (grupa D biljaka) ne dovodi do zaštite membrana od oksidativnog stresa dovoljno efikasno zato što D grupa u svim vremenskim tačkama ima visoke nivoe MDA. WS grupa biljaka tokom *ex vitro* eksperimenta (vremenske tačke od T2-T4) imala je najmanji nivo MDA u odnosu na druge eksperimentalne grupe biljaka, bez obzira koliki je nivo akumuliranog prolina. Zbog toga su ispitani dodatni mehanizmi zaštitnog delovanja SA na *I. walleriana* izložene vodnom stresu u *ex vitro* uslovima, poput indukcije antioksidativnih enzima.

U listovima *ex vitro* gajenih *I. walleriana* su korišćenjem Native-PAGE i eseja sa selektivnim inhibitorima identifikovane tri izoforme SOD: jedna MnSOD izoforma, i dve Cu/ZnSOD izoforme (**Slika 42.**). Imunoblot analiza Cu/ZnSOD u kojoj su korišćena anti-hloroplastna Cu/ZnSOD antitela pokazala je da je jedna izoforma Cu/ZnSOD koja je brže migrirala u gelu hloroplastna Cu/ZnSOD, dok je druga najverovatnije citosolna Cu/ZnSOD (Alscher i sar., 2002). Milošević i sar. (2012) su pokazali među proteinima koji su izolovani iz izdanaka *I. walleriana* gajenih *in vitro* postojanje pet izoformi SOD: dve MnSOD, jedne FeSOD i dve Cu/ZnSOD. Ovih pet izoformi bile su prisutne i kod zdravih i kod biljaka inficiranim virusom bronzavosti paradajza. Ovakve razlike u profilima SOD izoformi između *in vitro* i *ex vitro* gajenih biljaka ustanovljene su i kod krompira (Momčilović i sar., 2014). Kod biljaka krompira je pokazana najveća razlika u postojanju dodatnih FeSOD i Cu/ZnSOD izoformi. Postojanje FeSOD izoformi samo kod *in vitro* gajenog krompira objašnjeno je time što je niska koncentracija  $\text{Cu}^{2+}$  u MS hranljivoj podlozi, najverovatnije razlog smanjene aktivnosti Cu/ZnSOD, ali i zastupljenosti ovog enzima (Momčilović i sar., 2014). S obzirom da su i biljke *I. walleriana* gajene na istoj hranljivoj podlozi u *in vitro* uslovima, moguće je da je niska koncentracija  $\text{Cu}^{2+}$  takođe i kod ove biljne vrste uticala na indukciju dodatne FeSOD izoforme.

U većini studija koje u kojima se izučavao efekat SA na biljke koje su izložene suši, uočeno je da SA pospešuje SOD aktivnost i to kod paradajza (Hayat i sar., 2008), *C. setosa* (Kadioğlu i sar.,

2010), pšenice (Agrawal i sar., 2005) i *B. napus* (La i sar., 2020). Prema rezultatima u ovoj disertaciji hloroplastna Cu/ZnSOD je najzastupljenija izoforma indukovana sušom i SA tretmanom, što ukazuje na hloroplaste kao glavna mesta produkcije ROS u ćelijama *I. walleriana* kada su izložene vodnom stresu. Suša dovodi do oštećenja u fotosintetskom aparatu te tako usled poremećaja u elektron transportnom lancu dolazi do stvaranja velike količine ROS (Farooq i sar., 2009). Hloroplastna Cu/ZnSOD izoforma nalazi se u stromi hloroplasta, na mestu lokacije fotosistema I (Alscher i sar., 2002).

Profili izoformi katalaza su generalno kompleksni, a samo tri CAT gena su identifikovana kod cvetnica (Mhamdi i sar., 2012). Prisustvo većeg broja CAT izoformi je do sada uočeno kod *in vitro* gajenih *I. hawkerii* i *I. walleriana* (Milošević i sar., 2012), a u ovoj disertaciji je isto pokazano i kod *ex vitro* gajenih *I. walleriana* (**Slika 43.**), što se može objasniti alternativnom obradom CAT transkripata (eng. *Splicing*), posttranslacionom modifikacijom CAT ili formiranjem heterodimera od monomera kodiranih različitim CAT genima.

Vodni stres negativno utiče na fotosintezu na mnogo nivoa, uključujući smanjenje dostupnosti CO<sub>2</sub> usled zatvaranja stoma, a samim tim i smanjenje asimilacije CO<sub>2</sub> što dovodi do povećanog metaboličkog fluksa preko respiratornih puteva. Oksidacija fotorespiratornog glikolata u glioksalat u peroksizomima stvara se H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, kojeg uklanjaju katalaze. Nije neočekivano što je detektovana povećana aktivnost CAT kod mnogih biljnih vrsta u odgovoru prema suši, poput: paradajza (Hayat i sar., 2008), *C. setosa* (Kadioğlu i sar., 2010), *C. argentea* (Odjegba i Adeniyi, 2012) i pirinča (Sohag i sar., 2020). Sa druge strane, kod *B. napus* (Sohag i sar., 2020) vodni stres je doveo do neznatnog povećanja CAT aktivnosti, a kod slačice čak nije bilo nikakvog uticaja (Alam i sar., 2013). Takođe ni kod *I. walleriana* (**Slika 43.**), prilikom delovanja vodnog stresa, nije došlo do značajnijeg povećanja CAT aktivnosti, što može biti posledica toga što su CAT izuzetno aktivne pri optimalnim uslovima kod ove biljne vrste. U odnosu na to kakav efekat SA ima na CAT aktivnost, biljne vrste se mogu podeliti u tri grupe. Prvu grupu predstavljaju biljke kod kojih SA povećava CAT aktivnost (pšenica, *C. setosa*, slačica i pirinač), drugu grupu čine biljne vrste kod kojih SA smanjuje aktivnost CAT (*C. argentea* i *I. walleriana*), a u treću grupu spadaju one biljne vrste kod kojih ima dvofazni uticaj (*B. napus*). Kod SA tretirane *B. napus* koja je bila izložena suši došlo je prvo do brzog povećanja CAT aktivnosti (deseti dan od početka suše), a potom je usledilo smanjenje aktivnosti ovog antioksidativnog enzima (petnaesti dan od početka suše) (La i sar., 2020). Ovaj primer nam govori o značaju vremena uzorkovanja i može eventualno da predstavlja i objašnjenje dobijenih razlika u CAT aktivnosti kod *I. walleriana* koje su tretirane sa SA u različitim vremenskim tačkama. Takođe, treba napomenuti da SA može regulisati CAT aktivnost na dva nivoa: na nivou transkripcije kao kod indukcije CAT *B. napus* (La i sar., 2020) i na posttranslacionom nivou gde SA inhibira CAT enzim direktnim vezivanjem kao kod paradajza (Horváth i sar., 2007). Odgovor na vodni stres kod mnogih biljnih vrsta uključuje remodelovanje ćelijskog zida – i opuštanje i očvršćavanje (koje uključuje lignifikaciju), pri čemu opuštanje ćelijskog zida najverovatnije zahteva ROS (Noctor i sar., 2014). Postoji veliki broj enzima koji su uključeni u proizvodnju, degradaciju i metabolizam ROS na ćelijskoj membrani i apoplastu, a među njima je velika familija POX enzima. POX enzimi generalno razgrađuju H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ali mogu i da formiraju H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> putem redukcije O<sub>2</sub>, oksidujući tom prilikom NAD(P)H, askorbat ili auksin (Kukavica i sar., 2012). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> učestvuje u reakcijama oksidacije u apoplastu i kao supstrat u procesima polimerizacije ćelijskog zida i kao intermedijarni produkt u procesima opuštanja ćelijskog zida. Zbog postojanja velikog broja POX izoformi (73 kod *Arabidopsis*-a) (Shigeto i sar., 2015), teško je povezati povećanje ili smanjenje aktivnosti određene izoforme sa određenim stresom koji deluje prema biljkama. Jedan primer dobro okarakterisane POX izoforme povezane sa sušom kod *A. thaliana* je AtPrx3, koja je kodirana genom *AtPrx3*. Prekomerna ekspresija ovog gena kod transgenih *A. thaliana* povećava toleranciju prema vodnom stresu i stresu solima, dok kod transgenih biljaka *A. thaliana* kod kojih je ovaj gen utišan dolazi do dehidracije biljaka kada se izlože stresu solima (Llorente i sar., 2002). Tačna funkcija POX A, B i C kod *I. walleriana* (**Slika**

44.) nije poznata, ali je u ovoj disertaciji pokazano da su ove izoforme značajne u odgovoru *I. walleriana* prema vodnom stresu, kao i u povećanju tolerancije na vodni stres pri primeni SA.

Analiza ekspresije HSP101 proteina u *ex vitro* eksperimentu pokazala je da SA dovodi do pada zastupljenosti ovog proteina u eksperimentalnoj grupi biljaka WS u svim vremenskim tačkama nakon primene SA i to postupno jer se uočava najmanja ekspresija ovog proteina u tački T4 u odnosu na kontrolu (Slika 45.). Sama suša je dovela do povećanja ekspresije ovog proteina (D eksperimentalna grupa biljaka, vremenska tačka T3) i to 2,5 puta u odnosu na kontrolu. Zanimljivo je da je u eksperimentalnoj grupi DS došlo do povećanja ekspresije HSP101 u vremenskoj tački T3, kada je intenzitet suše bio najveći ali ne u tolikoj meri kao kod biljaka iz grupe D. Nakon rehidracije u grupi D došlo je do brzog pada zastupljenosti ovog proteina, dok je u grupi DS došlo do pada aktivnosti, ali ne u tolikoj meri. Ovi rezultati pokazuju da pri egzogenoj primeni SA dolazi do pada zastupljenosti proteina HSP101 u biljkama *I. walleriana* kada biljke nisu bile pod uticajem vodnog stresa. Moguće je da primena SA dovodi do smanjenja ekspresije HSP101 dok suša kao izuzetno jak stresor dovodi do porasta zastupljenosti HSP101 i zato u grupi DS postoji povećanje ekspresije HSP101 koje je manje u odnosu na biljke D grupe. Ovo je na neki način i očekivano, pošto je primena SA dovela do ublažavanja posledica stresa koje je suša izazvala kod *I. walleriana*, a samim tim je došlo do smanjenja prisustva nepovratno oštećenih proteina koje HSP101 uklanjaju. Postoji jako malo literaturnih podataka vezanih za ekspresiju HSP101 u uslovima suše kod biljaka, ali je pokazano da suša i visoka temperatura u kombinaciji dovode do značajnog porasta ekspresije HSP101 kod pšenice (Grigороva i sar., 2011).

#### 5.4. Uticaj vodnog stresa i SA na ekspresiju *de novo* identifikovanih dehidrinskih sekvenci kod *I. walleriana* gajenih *ex vitro*

U transkriptomu *I. walleriana* nađene su tri dehidrinske sekvence koje su deponovane u GenBank pod pristupnim brojevima: MW219505, MW219506, MW219507. *IwDhn1* (MW219505) kodira strukturni tip SK<sub>n</sub> (SK<sub>2</sub>), dok *IwDhn2.1* (MW219506) i *IwDhn2.2* (MW219507) kodiraju strukturni tip Y<sub>n</sub>SK<sub>n</sub> (Y<sub>3</sub>SK<sub>1</sub> i Y<sub>3</sub>SK<sub>2</sub>) (Tabela 12. i Slika 46.). Dehidrini se sastoje od bar jednog K-segmenta koji je karakteristika ove proteinske familije, varijabilnog broja Y-segmenata i jednog S segmenta. Pored ova tri navedena segmenta, dehidrini poseduju još i segment koji nije konzervativan, a koji predstavlja sve nasumične sekvence između K, Y i S segmenata i obično se obeležava kao φ-segment (Graether i Boddington, 2014; Riley i sar., 2019). K segment je bogat lizinom, prisutan je kod svih dehidrina i najčešće predstavlja sekvencu [EKKGIMDKIKEKLP], ali budući da ni jedna aminokiselina u ovoj sekvenci nije konzervativna češće je predstavljena kao [XKXGXX(D/E)KIK(D/E)KXPG] (Riley i sar., 2019). Smatra se da K-segment učestvuje u vezivanju za ćelijske membrane (Eriksson i sar., 2011; Strimbeck i sar., 2017). Y-segment je ime dobio zahvaljujući tirozinu u centralnom delu motiva [DEYGNP] (Hara i sar., 2009) i ova sekvencа takođe može da ima različitu strukturu, pa se često obeležava sa [D(D/E/Q)(Y/H/F)GNP] (visoko konzervativni regioni su podvučeni) (Riley i sar., 2019). Uloga Y-segmenta još uvek nije poznata (Graether i Boddington, 2014; Riley i sar., 2019). S-segment se sastoji od 4-6 Ser u nizu u okviru sekvence [LHR(S/T)GS4-6(S/D/E)(D/E)3] (Riley i sar., 2019). Dehidrini su često izolovani u svojoj fosforilovanoj formi i pokazano je da je S-segment mesto za fosforilaciju (Hara i sar., 2009). Kada se fosforilišu, dehidrini mogu da se transportuju iz citoplazme u jedro, međutim neki dehidrini koji nemaju S-segment mogu takođe da se nađu u jedru (Riley i sar., 2019). U zavisnosti od aranžmana Y, K i S segmenata, dehidrini se klasifikuju u pet tipova: K<sub>n</sub>, SK<sub>n</sub>, K<sub>n</sub>S, Y<sub>n</sub>SK<sub>n</sub> i Y<sub>n</sub>K<sub>n</sub> (Vaseva i sar., 2013; Graether i Boddington, 2014; Riley i sar., 2019).

Uloga *IwDhn1* je nepoznata, mada se mogu izvesti neki zaključci kada se analiziraju njihove aminokiselinske sekvence. Pored tipičnih S- i K-segmenata, *IwDhn1* poseduje H- i Chp-segmente

kao i skoro otkriveni F-segment (**Tabela 12.** i **Slika 46.**). H-segment je bogat histidinom i prisutan je kod nekih dehidrina kao što je CuCOR15 koji je pronađen kod limuna i eksprimira se u odgovoru na niske temperature. H-segment se odlikuje motivom [HKGEHHS GDHH] koji ima potencijal da vezuje jone metala (naročito  $\text{Cu}^{2+}$ , ali i  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ), a His u H-X3-H i HH učestvuje u vezivanju metala, kao i u vezivanju za DNK preko  $\text{Zn}^{2+}$  (Hara i sar., 2005, 2009). Hidroksil radikali nastaju kao posledica vodnog stresa u Haber-Vajsovoj reakciji koja je posredovana jonima metala  $\text{Cu}^{2+}$  i  $\text{Fe}^{2+}$  (Halliwell i sar., 1988). U stanjima tranzicije  $\text{Cu}^+$  u  $\text{Cu}^{2+}$  ili  $\text{Fe}^{2+}$  u  $\text{Fe}^{3+}$  može doći do formiranja hidroksil radikala, tako što navedeni joni reaguju sa vodonikom peroksidom ili superoksid anjonom. Predložen je mehanizam u kome H-segment CuCOR15 može svojim His ostatcima da vezuje  $\text{Cu}^{2+}$ , te tako posredno smanjuje stvaranje ROS. Nije sigurno da li motiv koji je bogat histidinom [HSHNH], a koji se nalazi u blizini N-terminusa IwDhn1 ima sličnu ulogu. Naelektrisani peptid (ChP) se sastoji od jednog ili dva polilizinska segmenta kojima često prethode Glu ili Asp (Graether i Boddington, 2014). Zato je [EKKEKKKKKK] sekvenca koja je prisutna kod IwDhn1 tipični ChP<sub>n</sub> segment (**Tabela 12.**). Sličan [KKKKKKKEKKK] motiv koji je prisutan kod CuCOR15 može da se veže za dvolančanu DNK, jednolančanu DNK i RNK *in vitro*, nespecifično i sa relativno niskim afinitetom u prisustvu  $\text{Zn}^{2+}$  jona (Hara i sar., 2009). Autori smatraju da ovaj dehidrin sa ChP segmentom ima ulogu u zaštiti amino kiselina tokom odgovora na stres. Druge predložene uloge za ChP segment su nuklearno targetiranje i šaperonska aktivnost (Graether i Boddington, 2014). Najnoviji rezultati su pokazali da većina SK<sub>n</sub> dehidrina poseduje i dodatni F-segment koji je definisan sekvencom [DRGLFDLFGKK] (Strimbeck, 2017), a koja je upotrebljena za identifikaciju ovog istog segmenta [ETQDRGILDFLK] kod IwDhn1. F-segment SK<sub>n</sub> dehidrina, uključujući i IwDhn1 je lokalizovan na N terminusu S- i K-segmenta (Strimbeck, 2017). Modeli koji predviđaju sekundarnu strukturu ukazuju da F-segment može da formira amfipatične helikse koji mogu da učestvuju u membranskom ili proteinskom vezivanju (Eriksson i sar., 2011). Uzimajući u obzir kompleksnu HFShPK2 strukturu IwDhn1 i razmatrane uloge svakog segmenta ovaj dehidrin može biti multifunkcionalni protein.

Za razliku od *IwDhn1*, *IwDhn2.1* i *IwDhn2.2* su izuzetno inducibilni u uslovima vodnog stresa (**Slika 49.** i **Slika 50.**). Ekspresija *IwDhn2.1* je povećana  $10^4$  puta kod biljaka koje su duže izložene vodnom stresu (D, T3) u poređenju sa kontrolnom grupom biljaka. U slučaju *IwDhn2.1* interakcija faktora SA, vodnog stresa kao i vremena uzorkovanja je bila izuzetno značajna ( $p < 0,001$ , prema trofaktorijalnoj analizi varijanse), što znači da SA ima različite efekte na biljke koje su zalivane, u odnosu na biljke koje nisu, kao i da vreme uzorkovanja ima značajan uticaj. SA je indukovala ekspresiju *IwDhn2.1* u DS grupi biljaka 24h po aplikaciji (tačka T1), ali je ekspresija ovog gena u DS i D grupi, u vremenskoj tački T3, bila najizraženija. Ekspresija *IwDhn2.2* nije mogla biti detektovana u T0 i T1 vremenskim tačkama, ali je kod biljaka u uslovima intenzivnog vodnog stresa (grupa D i DS, tačka T3) uočena značajna ekspresija (**Slika 49.**). Ekspresija *IwDhn2.1* i *IwDhn2.2* je potpuno suprimirana nakon rehidracije (T4). Ova dva dehidrina imaju slični trend ekspresije, ali i Y<sub>3</sub>SK<sub>n</sub> strukturu (**Tabela 12.**), sa 93,2% identičnih aminokiselina, i 89,9% identičnih nukleotida (**Tabela 11.**). Komparacija dehidrina pokazala je da su Y<sub>n</sub>SK<sub>n</sub> dehidrini najčešće indukovani sušom i stresom solima, što može da ukaže na to da proteini sa Y segmentom mogu da imaju ulogu u prevazilaženju vodnog stresa (Graether i Boddington, 2014). Glavna karakteristika *IwDhn2.1* i *IwDhn2.2* su tri Y segmenta u blizini N terminusa (**Slika 46**) (Riley i sar., 2019). Y1 i Y2 kod oba dehidrina *I. walleriana* imaju tipičan Y motiv [DEYGNP], dok je Y3 [DQYGNP] (**Tabela 11.**). K2 segmentu kod *IwDhn2.2* nedostaje His, što je česta karakteristika dehidrina koji učestvuju u membranskom vezivanju (Eriksson i sar., 2011).

SA može direktno ili indirektno da indukuje određene gene koji učestvuju u zaštitnim mehanizmima biljaka koje su izložene biotičkom i abiotičkom stresu, uključujući i dehidrinske (Horváth i sar., 2007), čime se može objasniti indukcija *IwDhn2.1* nakon primene SA. Sa druge strane, blago smanjenje ekspresije dehidrinskih gena u DS grupi biljaka u vremenskoj tački T3 kada je najintenzivniji vodni stres najbolje se može objasniti time da je SA povećala otpornost na vodni

stres tako da dehidrini više nisu neophodni biljkama u tolikoj meri, kao u slučaju D grupe biljaka. Drugo objašnjenje bi bilo da SA direktno inhibira ekspresiju dehidrinskih gena što je malo verovatno. Isti efekat SA na dehidrinske gene je pokazan i kod tibetanskog ječma (Sun i sar., 2006).

## 6. Zaključci

Na osnovu rezultata prikazanih u ovom radu možemo izvući sledeće zaključke:

- Egzogen primena SA ima značajniji efekat pri višim koncentracijama u uslovima vodnog stresa i pokazuje pozitivan uticaj na sve ispitivane morfološke parametre kod biljaka *I. walleriana* gajenih *in vitro*: visinu i svežu masu biljaka, kao i broj izdanaka i listova.
- Veća koncentracija SA u hranljivoj podlozi dovodi do značajnog povećanja RWC u izdancima biljaka *I. walleriana* gajenih *in vitro* kada se izlože intenzivnijem vodnom stresu. Takođe, veća koncentracija SA smanjuje LWL kod ove biljne vrste, čak i u uslovima kada one nisu pod uticajem vodnog stresa.
- SA ima pozitivan uticaj na sadržaj hlorofila, karotenoida i ukupnih fotosintetskih pigmenta u listovima biljaka *I. walleriana* gajenih *in vitro* u uslovima vodnog stresa. Na osnovu ovoga se može reći da SA omogućava neometano funkcionisanje fotosinteze kod biljaka *I. walleriana* pri delovanju suše.
- Egzogen primena SA u uslovima vodnog stresa dovodi do značajnog smanjenja sadržaja H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i MDA i povećanja sadržaja prolina u biljkama *I. walleriana* gajenih *in vitro* što je dalje praćeno smanjenjem aktivnosti antioksidativnih enzima: SOD, CAT i POX. Ovim se može reći da SA štiti biljke *I. walleriana* u uslovima oksidativnog stresa koji se javlja kao posledica vodnog stresa delujući pozitivno na neenzimske komponente antioksidativnog zaštitnog sistema.
- Folijarni primena SA ima pozitivan uticaj na biljke *I. walleriana* gajene *ex vitro* u uslovima vodnog stresa: smanjuje venjenje, održava RWC na optimalanom nivou i smanjuje lipidnu peroksidaciju. Sa druge strane, SA ne doprinosi očuvanju cvetova kod biljaka *I. walleriana* što smanjuje njihovu komercijalnu vrednost, ali doprinosi povećanju njihove tolerancije prema vodnom stresu.
- Tretman SA dovodi do veće akumulacije prolina kod biljaka *I. walleriana* gajenih *ex vitro* u uslovima vodnog stresa i smanjenja aktivnosti Cu/ZnSOD i CAT, što implicira na veću efikasnost neenzimskih komponenti antioksidativnog odbrambenog sistema.
- U uslovima vodnog stresa, SA dovodi do blagog smanjenja zastupljenosti HSP101 kod biljaka *I. walleriana* gajenih *ex vitro*, što ukazuje na moguću ulogu SA u zaštiti proteina od denaturacije koja je posledica delovanja suše.
- U transkriptomu listova kod biljaka *I. walleriana* identifikovana su tri transkripta gena koji kodiraju dehidrine: *IwDhn1*, *IwDhn2.1* i *IwDhn2.2*. Dehidrini koje ovi geni kodiraju se klasifikuju u sledeće strukturne tipove: SK<sub>2</sub>, Y<sub>3</sub>SK<sub>1</sub> i Y<sub>3</sub>SK<sub>2</sub>.
- Značajan odgovor biljaka *I. walleriana* prema vodnom stresu je indukcija i povećanje ekspresije gena *IwDhn2.1* i *IwDhn2.2*, a samim tim najverovatnije i dehidrina tipa Y<sub>3</sub>SK<sub>1</sub> i Y<sub>3</sub>SK<sub>2</sub>, koje ovi geni kodiraju.

## 7. Literatura

- Abbaspour J, Ehsanpour A (2020). Sequential expression of key genes in proline, glycine betaine and artemisinin biosynthesis of *Artemisia aucheri* Boiss using salicylic acid under in vitro osmotic stress. *Biologia*. 75.
- Abouzari A, Fakheri BA (2015). Reactive oxygen species: generation, oxidative damage and signal transduction. *Int. J. Life Sci.* 5: 3–17.
- Adams E, Frank L. Metabolism of proline and the hydroxyprolines (1980). *Annu Rev Biochem.*, 49: 1005-61.
- Aebi H. (1984). Catalase in vitro. *Methods Enzymol.*, 105: 121–126.
- Agati G, Tattini M, (2010). Multiple functional roles of flavonoids in photoprotection. *New. Phytol.* 186: 786–793.
- Agrawal S, Sairam R, Srivastava GC, Meena RC (2005). Changes in antioxidant enzymes activity and oxidative stress by abscisic acid and salicylic acid in wheat genotypes. *Biol. Plant.* 49: 541–550.
- Akinci S, Lösel D M (2012). Plant water-stress response mechanisms. In *Water Stress: Rahman IMM, Hasegawa H, Eds. InTech: Rijeka, Croatia*, pp. 15–42.
- Al-Wahaibi MH (2011). Plant heat-shock proteins: a mini review. *J. King Saud Univ. Sci.*, 23(2): 139-150.
- Alam MM, Hasanuzzaman M, Nahar K, Fujita M (2013). Exogenous salicylic acid ameliorates short-term drought stress in mustard (*Brassica juncea* L.) seedlings by upregulating the antioxidant defense and glyoxalase system. *Aust. J. Crop Sci.*, 7: 1053–1063.
- Alscher RG, Erturk N, Heath LS (2002). Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *J Exp Bot.*, 53(372): 1331-41.
- Ananieva EA, Christova KN, Popova LP (2004). Exogenous treatment with salicylic acid leads to increased antioxidant capacity in leaves of barley plants exposed to Paraquat. *J. Plant Physiol.*, 161, 319–328.
- Anderson NO (2006). *Flower breeding and genetics: Issues, Challenges and Opportunities for 21<sup>st</sup> Century*. Springer-Verlag, Berlin, 822.
- Andersson NE (2011). The influence of water stress and air velocity on growth of *Impatiens walleriana* and *Petunia* hybrid. *Sci. Hortic.*, 128, 146–151.
- Anjum NA, Sofu A, Scopa A, Roychoudhury A, Gill SS, Iqbal M, Lukatkin AS, Pereira E, Duarte AC, Ahmad I (2015). Lipids and proteins--major targets of oxidative modifications in abiotic stressed plants. *Environ Sci Pollut Res Int.*, 22(6): 4099-121.
- Araki T (2001). Transition from vegetative to reproductive phase. *Curr Opin.* 4 (1): 63-68.



- Arfan M, Athar HR, Ashraf M (2007). Does exogenous application of salicylic acid through the rooting medium modulate growth and photosynthetic capacity in two differently adapted spring wheat cultivars under salt stress? *J. Plant Physiol.*, 164: 685-694.
- Arisumi T (1985): Rescuing abortive *Impatiens* hybrids through aseptic culture of ovules. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.*, 110: 273–276.
- Attaran E, Zeier TE, Griebel T, Zeier J (2009). Methyl salicylate production and jasmonate signaling are not essential for systemic acquired resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell.*, 21(3): 954-71.
- Asada K (2006). Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. *Plant Physiol.*, 141(2) :391-6.
- Augé RM, Stodola AJ, Moore JL, Klingeman WE, Duan X (2003). Comparative dehydration tolerance of foliage of several ornamental crops. *Sci. Hortic.*, 98: 511–516.
- Bajji M, Lutts S, Kine, JM, (2000). Physiological changes after exposure to and recovery from polyethylene glycol-induced water deficit in roots and leaves of durum wheat (*Triticum durum* Desf.) cultivars differing in drought resistance. *J. Plant Physiol.*, 157: 100–108.
- Balakrishnan V, Ravindran KC, Robinson JP (2009). *In vitro* regeneration of *Impatiens campanulata* wight an important grass land plant. *BRI.*, 2 (2): 123–130.
- Barrs, HD, Weatherley PE, (1962). A re-examination of the relative turgidity technique for estimating water deficits in leaves. *Aust. J. Biol. Sci.*, 15: 413–428.
- Bates L S, Waldren RP, Teare ID (1973), Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil.*, 39: 205-207.
- Battaglia M, Olvera-Carrillo Y, Garcarrubio A, Campos F, Covarrubias AA (2008). The enigmatic LEA proteins and other hydrophilins. *Plant Physiol.*, 148, 6–24.
- Beauchamp C, Fridovich I (1971). Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal. Biochem.*, 44: 276–287.
- Bela K, Horváth E, Gallé A, Szabados L, Tari I, Csiszár J (2015). Plant glutathione peroxidases: emerging role of the antioxidant enzymes in plant development and stress responses. *J. Plant. Physiol.*, 176: 192–201.
- Benjamini Y , Hochberg J (1995). Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *JR Stat. Soc. Series B Methodol.*, 57: 289–300.
- Beyer WF, Fridovich I (1987). Assaying for superoxide dismutase activity: some large consequences of minor changes in conditions. *Anal. Biochem.*, 161: 559–566.
- Bidabadi SS, Mahmood M, Baninasab B, Ghobadi C (2012) Influence of salicylic acid on morphological and physiological responses of banana (*Musa acuminata* cv. Berangan, AAA) shoot tips to in vitro water stress induced by polyethylene glycol. *Plant Omics*, 5: 33–39.

- Blanchard M, Newton L, Runkle E, Woolard D, Campbell C (2007). Exogenous Applications of Abscisic Acid Improved the Postharvest Drought Tolerance of Several Annual Bedding Plants. *Acta Hort.*, 755: 127–133.
- Blanusa T, Vysini E, Cameron RW (2009). Growth and flowering of *Petunia* and *Impatiens*: Effects of competition and reduced water content within a container. *HortScience*, 44: 1302–1307.
- Blokhina O, Virolainen E, Fagerstedt KV (2003). Antioxidants, oxidative damage oxygen deprivation stress: a review. *Ann. Bot.*, 91: 179–194.
- Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.*, 72(1-2): 248-254.
- Bodner G, Nakhforoosh A, Kaul H-P (2015). Management of crop water under drought: a review. *ASD*, 35.
- Bösl B, Grimminger V, Walter S (2006). The molecular chaperone Hsp104 - a molecular machine for protein disaggregation. *J. Struct. Biol.*, 156(1): 139-148.
- Bourne DJ, Barrow KD, Milborrow BV (1991). Salicyloylaspartate as an endogenous component in the leaves of *Phaseolus vulgaris*. *Phytochemistry*, 30 (12): 4041-4044.
- Borges KLR, Salvato F, Alcântara BK, Nalin RS, Piotto FA, Azevedo RA, (2018). Temporal dynamic responses of roots in contrasting tomato genotypes to cadmium tolerance. *Ecotoxicology*, 27: 245–258.
- Buah JN, Kawamitsu Y, Sato S, Murayama S (1999). Effects of Different Types and Concentrations of Gelling Agents on the Physical and Chemical Properties of Media and the Growth of Banana (*Musa spp.*) *in Vitro*. *Plant Prod. Sci.*, 2: 138-145.
- Burnett S, Van Iersel M, Thomas P (2005). PEG-8000 alters morphology and nutrient concentration of hydroponic *Impatiens*. *Hortic. Sci.*, 40: 1768–1772.
- Carpita N, Sabularse D, Montezinos D, Delmer DP (1979). Determination of the pore size of cell walls of living plant cells. *Science.*, 205: 1144-7.
- Carvalho MHC (2008). Drought stress and reactive oxygen species: Production, scavenging and signaling. *Plant Signal Behav.*, (3): 156-65.
- Carvalho MEA, Piotto FA, Nogueira ML, Gomes-Junior FG, Chamma HMCP, Pizzaia D, Azevedo RA (2018). Cadmium exposure triggers genotype-dependent changes in seed vigor and germination of tomato offspring. *Protoplasma*, 255: 989–999.
- Carvalho MEA, Castro PRC, Gaziola SA, Azevedo RA, (2018a). Is seaweed extract an elicitor compound? Changing proline content in drought-stressed bean plants. *Comun. Sci.*, 9: 292–297.
- Cassells AC, Curry RF (2001). Oxidative stress and physiological, epigenetic and genetic variability in plant tissue culture implications for micropropagators and genetic engineers. *PCTOC*, 64: 145–167.

- Catinot J, Buchala A, Abou-Mansour E, Mettraux, J. P. (2008). Salicylic acid production in response to biotic and abiotic stress depends on isochlorogenic acid in *Nicotiana benthamiana*. FEBS Lett., 582: 473–478.
- Cingoz GS, Gurel E. (2016) Effects of salicylic acid on thermotolerance and cardenolide accumulation under high temperature stress in *Digitalis trojana Ivanina*. Plant Physiol. Biochem., 105:145–149.
- Cleland CF, Ajami A (1974). Identification of the Flower-inducing Factor Isolated from Aphid Honeydew as being Salicylic Acid. Plant Physiol., 54 (6): 904-906.
- Chang CY, Hsieh YH, Cheng KY, Hsieh LL, Cheng TC, Yao KS (2008); Effect of pH on Fenton process using estimation of hydroxyl radical with salicylic acid as trapping reagent. Water Sci. Technol., 58 (4): 873–879.
- Chaves M, Maroco J, Pereira J. (2003). Understanding plant responses to drought - From genes to the whole plant. Funct. Plant Biol., 30.
- Chen Z, Iyer S, Caplan A, Klessig DF, Fan B (1997). Differential accumulation of salicylic acid and salicylic acid-sensitive catalase in different rice tissues. Plant Physiol., 114: 193–201.
- Chen HY, Li X (2017). Identification of a residue responsible for UDP-sugar donor selectivity of a dihydroxybenzoic acid glycosyltransferase from Arabidopsis natural accessions. Plant J., 89(2): 195-203.
- Chen TH, Murata N. (2008) Glycinebetaine: an effective protectant against abiotic stress in plants. Trends Plant Sci., (9): 499-505.
- Chyliński WK, Lukaszewska AJ, Kutnik K (2007). Drought response of two bedding plants. Acta Physiol. Plant., 29: 399–406.
- Cosio C, Dunand C (2009). Specific functions of individual class III peroxidase genes. J Exp Bot., 60(2): 391-408.
- Cuevas-Velazquez CL, Rendón-Luna DF, Covarrubias AA (2014). Dissecting the cryoprotection mechanisms for dehydrins. Front Plant Sci., 5: 583.
- Cuypers, A, Hendrix S, Reis RA, Smet S, Deckers J, Gielen H, Jozefczak M, Loix C, Vercamp, H, Vangronsveld J, Keunen E (2016). Hydrogen peroxide, signaling in disguise during metal phytotoxicity. Front. Plant. Sci., 7, 470.
- Damalas C (2019). Improving drought tolerance in sweet basil (*Ocimum basilicum*) with salicylic acid. Sci. Hortic., 246. 360-365.
- Danquah A, de Zélicourt A, Colcombet J, Hirt H. (2013). The role of ABA and MAPK signaling pathways in plant abiotic stress responses. Biotechnol. Adv., 32: 40-52.
- Danon A, Delorme V, Mailhatc N, Gallois P (2000). Plant programmed cell death, a common way to die. Plant Physiol. Biochem., 38: 647-655.

- Das, K., & Roychoudhury, A (2014). Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. *Front. environ. Sci.* (2):1-13.
- Ding P, Ding Y. *Stories of Salicylic Acid: A Plant Defense Hormone* (2020). *Trends Plant Sci.*, 25(6): 549-565.
- Demidchik V, 2015. Mechanisms of oxidative stress in plants: from classical chemistry to cell biology. *Environ. Exp. Bot.*, 109: 212–228.
- Demiralay M, Sağlam A, Kadioğlu A (2013). Salicylic acid delays leaf rolling by inducing antioxidant enzymes and modulating osmoprotectant content in *Ctenanthe setosa* under osmotic stress. *Turkish Journal of Biology.*, 37: 49–59.
- Dempsey DA, Vlot AC, Wildermuth MC, Klessig DF (2011). Salicylic Acid biosynthesis and metabolism. *Arabidopsis Book.*, 9:e0156.
- Doyle SM, Genest O, Wickner S (2013). Protein rescue from aggregates by powerful molecular chaperone machines. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 14(10): 617-29
- Dragičević M, Paunović DM, Bogdanović M, Todorović S, Simonović A, Todorović S (2019). ragp: Pipeline for mining of plant hydroxyproline-rich glycoproteins with implementation in R. *Glycobiology.* 30: 19–35.
- Eriksson SK, Kutzer M, Procek J, Gröbner G, Harryson P (2011). Tunable membrane binding of the intrinsically disordered dehydrin Lti30, a cold-induced plant stress protein. *Plant Cell.*, 23(6): 2391-404.
- Farooq M, Wahid A, Kobayashi N, Fujita D, Basra SMA. (2009). Plant drought stress: effects, mechanisms and management. *Agron. Sustain. Dev.* 29: 185–212.
- Farooq M, Wahid A, Lee DJ, Alam S, Tariq A. (2010). Drought stress: Comparative Time Course Action of the Foliar Applied Glycinebetaine, Salicylic Acid, Nitrous Oxide, Brassinosteroids and Spermine in Improving Drought Resistance of Rice. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 196: 336 - 345.
- Fischer E (2004). *Balsaminaceae*. In *Flowering Plants Dicotyledons*; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany pp. 20–25.
- Friedman, M (2004). Applications of the ninhydrin reaction for analysis of amino acids, peptides and proteins to agricultural and biomedical sciences. *J. Agric. Food Chem*, 52: 385–406.
- Foyer CH, Noctor G (2003). Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. *Physiol. Plant*, 119: 355–364.
- Foyer CH, Noctor G (2005). Oxidant and antioxidant signalling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plant. Cell. Environ.*, 28, 1056–1071.

- Gasic K, Hernandez A, Korban SS (2004). RNA extraction from different apple tissues rich in polyphenols and polysaccharides for cDNA library construction. *Plant Mol. Biol. Rep.*, 22: 437–438.
- Gaspar T, Franck T, Bisbis B, Kevers C, Jouve L, Hausman JF, Dommes J (2002). Concepts in plant stress physiology. Application to plant tissue cultures. *Plant Growth Regul.*, 37: 263-285.
- Gera A, Zeidan M (2006): New and emerging virus diseases in ornamental crops. *Acta Hortic.*, 722: 175–180.
- Gill SS, Tuteja N, (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant. Physiol. Biochem.*, 48: 909–930 .
- Goyal K, Walton LJ, Tunnacliffe A (2005). LEA proteins prevent protein aggregation due to water stress. *Biochem.*, 388(1): 151-157.
- Graether SP, Boddington KF (2014). Disorder and function: a review of the dehydrin protein family. *Front Plant Sci.*, 5:576.
- Gratão PL, Monteiro CC, Tezotto T, Carvalho RF, Alves LR., Peters LP, Azevedo R (2015). Cadmium stress antioxidant responses and root-to-shoot communication in grafted tomato plants. *Biometals* 28: 803–816.
- Grassmann J, Hippeli S, Elstner EF (2002). Plant's defense and its benefits for animals and medicine: role of phenolics and terpenoids in avoiding oxygen stress. *Plant Physiol. Biochem.*, 40: 471–478.
- Grey-Wilson C (1980). *Hydrocera triflora*, Its Floral Morphology and Relationship with *Impatiens*: Studies in Balsaminaceae: V. *Kew Bull.*, 35: 213–219.
- Grigorova B, Vaseva II, Demirevska K, Feller U (2011). Expression of selected heat shock proteins after individually applied and combined drought and heat stress. *Acta Physiol Plant.*, 33: 2041–2049.
- Günal S, Hardman R, Kopriva S, Mueller JW. (2019) Sulfation pathways from red to green. *J Biol Chem.*, 294(33): 12293-12312.
- Gupta DK, Palma JM, Corpas FJ (2015). *Reactive Oxygen Species and Oxidative Damage in Plants Under Stress*. Springer, USA.
- Gupta DK, Palma JM, Corpas FJ (2018). *Antioxidants and Antioxidant Enzymes in Higher Plants*. Springer, USA.
- Halliwell B, Grootveld M, Gutteridge JM (1988). Methods for the measurement of hydroxyl radicals in biomedical systems: deoxyribose degradation and aromatic hydroxylation. *Methods Biochem Anal.*, 33:59-90.
- Halliwell B (2006). Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol.*, 141, 312–322.

- Halliwell B, Gutteridge JM (2015). Free Radicals in Biology and Medicine. Oxford University Press, USA.
- Han K, Stephens LC (1987). Growth-regulators affect in vitro-propagation of 2 interspecific *Impatiens* hybrids. *Sci. Hortic.*, 32: 307–313.
- Han KC, Stephens, L. (1992): Carbohydrate and nitrogen-sources affect respectively in vitro germination of immature ovules and early seedling growth of *Impatiens-Platypetala* Lindl. *PCTOC.*, 31: 211–214.
- Han KC (1994): In-vitro shoot regeneration from cotyledons of immature ovules of *Impatiens-Platypetala* Lindl. *Plant in Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.*, 30P: 108–112.
- Handa N, Kohli SK, Sharma A, Thukral AK, Bhardwaj R, Alyemini MN, Wijaya L, Ahmad P, (2018). Selenium ameliorates chromium toxicity through modifications in pigment system, antioxidative capacity, osmotic system, and metal chelators in *Brassica juncea* seedlings. *S. Afr. J. Bot.*, 119: 1–10.
- Hara M, Terashima S, Kuboi T (2001). Characterization and cryoprotective activity of cold-responsive dehydrin from *Citrus unshiu*. *J. Plant Physiol.*, 158: 1333–1339.
- Hara M, Fujinaga M, Kuboi T (2005). Metal binding by citrus dehydrin with histidine-rich domains. *J. Exp. Bot.*, 56: 2695–2703.
- Hara M, Shinoda Y, Tanaka Y, Kuboi T (2009). DNA binding of citrus dehydrin promoted by zinc ion. *Plant Cell Environ.*, 32(5): 532–41.
- Hara M, Kondo M, Kato, T. (2013). AKS-type dehydrin and its related domains reduce Cu-promoted radical generation and the histidine residues contribute to the radical-reducing activities. *J. Exp. Bot.*, 64: 1615–1624.
- Hare P, Cress W (1997). Metabolic implications of stress-induced proline accumulation in plants. *Plant Growth Regul.*, 21: 79–102.
- Hao Y, Huang B, Jia D, Mann T, Jiang X, Qiu Y, Niitsu M, Berberich T, Kusano T, Liu T, (2018). Identification of seven polyamine oxidase genes in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) and their expression profiles under physiological and various stress conditions. *J. Plant. Physiol.*, 228: 1–11.
- Hao Q, Wang W, Han X, Wu J, Lyu B, Chen F, Caplan A, Li C, Wu J, Wang W, Xu Q, Fu D. (2018). Isochorismate-based salicylic acid biosynthesis confers basal resistance to *Fusarium graminearum* in barley. *Mol Plant Pathol*, 19(8): 1995–2010.
- Haas B, Papanicolaou A, Yassour M, Grabherr M, Philip D, Bowden J, Couger M, Eccles D, Li B, Macmanes, M (2013). *De novo* transcript sequence reconstruction from RNA-Seq: Reference generation and analysis with Trinity. *Nat. Protoc.*, 8: 1–43.
- Hasanuzzaman M, Nahar K, Fujita M (2013). Extreme temperature responses, oxidative stress and antioxidant defense in plants. In: Vahdati K, Leslie C (eds) *Abiotic Stress – plant responses and applications in agriculture*. Rijeka: InTech.

- Hasanuzzaman M, Alam MM, Nahar K, Mahmud JA, Ahamed KU, Fujita M (2014). Exogenous salicylic acid alleviates salt stress-induced oxidative damage in *Brassica napus* by enhancing the antioxidant defense and glyoxalase systems. *Aust. J. Crop Sci.*, 8: 631–639.
- Hasanuzzaman M, Nahar K, Bhuiyan TF, Anee TI, Inafuku M, Oku H, & Fujita M. (2017a). Salicylic Acid: An All-Rounder in Regulating Abiotic Stress Responses in Plants. In *Phytohormones - Signaling Mechanisms and Crosstalk in Plant Development and Stress Responses*. InTech Open, 3: 31-75
- Hasanuzzaman M, Nahar K, Anee TI, Fujita M (2017b). Glutathione in plants: biosynthesis and physiological role in environmental stress tolerance. *Physiol Mol. Biol. Plants*, 23(2): 249-268.
- Hasanuzzaman M., Mahmud J.A., Anee T.I., Nahar K., Islam M.T. (2018). Drought Stress Tolerance in Wheat: Omics Approaches in Understanding and Enhancing Antioxidant Defense. In: Zargar S., Zargar M. (eds) *Abiotic Stress-Mediated Sensing and Signaling in Plants: An Omics Perspective*. Springer, Singapore.
- Hasanuzzaman M, Bhuyan MHMB, Zulfiqar F, Raza A, Mohsin SM, Mahmud JA, Fujita M, Fotopoulos V (2020). Reactive Oxygen Species and Antioxidant Defense in Plants under Abiotic Stress: Revisiting the Crucial Role of a Universal Defense Regulator. *Antioxidants (Basel)*. 9(8): 681
- Havaux M (2014). Carotenoid oxidation products as stress signals in plants. *Plant. J.*, 79: 597–606.
- Hayat S, Hasan SA, Fariduddin Q, Ahmad A. (2008). Growth of tomato (*Lycopersicon esculentum*) in response to salicylic acid under water stress. *J. Plant Interact.*, 3: 297–304.
- Hayat Q, Hayat S, Irfan M, Ahmad A. (2010). Effect of Exogenous Salicylic Acid under Changing Environment: A Review. *Environ. Exp. Bot.*, 68: 14-25.
- Hayat S, Hayat Q, Alyemeni MN, Wani AS, Pichtel J, Ahmad A, (2012). Role of proline under changing environments: a review. *Plant. Sign. Behav.*, 7: 1456–1466.
- He YK, Xi T (1989): Relationship between the accumulation of anthocyanin and phenylalanine ammonia lyase in *Impatiens balsamina*. *Plant Physiol. Commun.*, 2: 35–38.
- Hegazi AM, El-Shrayi AM (2007). Impact of salicylic acid and paclobutrazol exogenous application on the growth, yield and nodule formation of common bean. *Aust. J. Basic Appl. Sci.*, 1: 834-840.
- Health RL, Packer L, (1968). Photooxidation in isolation chloroplast I. Kinetics and a stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Arch. Biochem. Biophys.*, 125: 189–194.
- Henson DY, Newman SE, Hartley DE (2006). Performance of Selected Herbaceous Annual Ornamentals Grown at Decreasing Levels of Irrigation. *HortSci.*, 41: 1481–1486.
- Herrera-Vásquez A, Salinas P, Holuigue L (2015). Salicylic acid and reactive oxygen species interplay in the transcriptional control of defense genes expression. *Front. Plant Sci.*, 6 171.

- Hew CS (1987). The effects of 8-hydroxyquinoline sulphate, acetylsalicylic acid and sucrose on bud opening of *Oncidium* flowers. *Int. J. Hortic. Sci.*, 62:1 75-7.
- Hirayama T, Shinozaki K (2010). Research on plant abiotic stress responses in the post-genome era: past, present and future. *Plant J.*, 61:1041–1052.
- Hinch DK, Thalhammer A (2012). LEA proteins: IDPs with versatile functions in cellular dehydration tolerance. *Biochem Soc Trans.*, 40(5): 1000-3.
- Horváth E, Szalai G, Janda T (2007). Induction of abiotic stress tolerance by salicylic acid signaling. *J. Plant Growth Regul.*, 26: 290–300.
- Horváth E, Csiszár J, Gallé Á, Poór P, Szepesi Á, Tari I (2015). Hardening with salicylic acid induces concentration-dependent changes in abscisic acid biosynthesis of tomato under salt stress. *J. Plant Physiol.*, 183: 54–63.
- Hu CA, Delauney AJ, Verma DP (1992). A bifunctional enzyme ( $\delta$  1-pyrroline-5-carboxylate synthetase) catalyzes the first two steps in proline biosynthesis in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 89(19): 9354-8.
- Huang W, Wang Y, Li X, Zhang Y. Biosynthesis and Regulation of Salicylic Acid and N-Hydroxypipicolinic Acid in Plant Immunity (2020). *Mol Plant.*, 13(1): 31-41.
- Hundertmark M, Hinch DK (2008). LEA (late embryogenesis abundant) proteins and their encoding genes in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Genomics.*, 9:118.
- Hussein MM, Balbaa LK, Gaballah MS (2007). Salicylic acid and salinity effects on growth of maize plants. *Res. J. Agric. Biol. Sci.*, 3: 321-328.
- Iannone MF, Groppa MD, Benavides MP (2015). Cadmium induces different biochemical responses in wild type and catalase-deficient tobacco plants. *Environ. Plant.Sci.*, 109: 201–211.
- Islam F, Yasmeen T, Arif MS, Riaz M, Shahzad SM, Imran Q, Ali I (2016). Combined ability of chromium (Cr) tolerant plant growth promoting bacteria (PGPB) and salicylic acid (SA) in attenuation of chromium stress in maize plants. *Plant Physiol. Biochem.*, 108:,456–467 .
- Ismail AM, Hall AE, Close TJ (1999). Purification and partial characterization of a dehydrin involved in chilling tolerance during seedling emergence of cowpea. *Plant Physiol.*, 120(1): 237-44.
- Janssens SB, Knox EB, Huysmans S, Smets EF, Merckx VS (2009). Rapid radiation of *Impatiens* (Balsaminaceae) during Pliocene and Pleistocene: Result of a global climate change. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 52: 806–824.
- Javot H, Maurel C (2002). The role of aquaporins in root water uptake. *Ann. Bot.* 90: 301–313.
- Josekutty PC, Mpikeli P, Nikolova RV (1998): Calcium mediated callus induction in *Impatiens flanaganiana*. *Phyton - International Journal of Experimental Botany* 63: A–199.



- Jouve L, Franck T, Gaspar T, Cattivelli L, Hausman JF (2000). Poplar acclimation to cold during *in vitro* conservation at low non-freezing temperature: metabolic and proteic changes. *J. Plant Physiol.*, 157: 117–123.
- Jumali SS, Said IM, Ismail I, Zainal Z (2011). Genes induced by high concentration of salicylic acid in '*Mitragyna speciosa*'. *Aust.J.CropSci.*, 5: 296–303.
- Kadioğlu A, Saruhan N, Sağlam A, Terz R, Acet T (2010). Exogenous salicylic acid alleviates effects of long term drought stress and delays leaf rolling by inducing antioxidant system. *Plant Growth Regul.*, 64: 27–37.
- Kang G, Li G, Xu W, Peng X, Han Q, Zhu Y (2012). Proteomics reveals the effects of salicylic acid on growth and tolerance to subsequent drought stress in wheat. *J. Proteome Res.*, 11: 6066–6079.
- Karpinski S, Gabrys H, Mateo A, Karpinska B, Mullineaux PM (2003). Light perception in plant disease defence signalling. *Curr Opin Plant Biol.*, (4): 390-6.
- Kaur G, Tak Y, Asthir B (2022). Salicylic acid: a key signal molecule ameliorating plant stresses. *Cereal Res. Commun.*
- Kim EC, Lee HS, Choi DW (2012). Sequence variability and expression pattern of the dehydrin gene family in "*Populus tremula*" x "*Populus alba*". *PlantOmics* 5: 122.
- Khan NA, Nazar R, Iqbal N, Anjum NA (2012). Phytohormones and abiotic stress tolerance in plants. Berlin: Springer.
- Khan MI, Fatma M, Per TS, Anjum NA, Khan NA (2015). Salicylic acid-induced abiotic stress tolerance and underlying mechanisms in plants. *Front Plant Sci.*, 6: 462.
- Khanna P, Kaur K, Gupta AK (2016). Salicylic acid induces differential antioxidant response in spring maize under high temperature stress. *Indian J. Exp. Biol.*, 54: 386–393.
- Khodary SEA (2004). Effect of salicylic acid on the growth, photosynthesis and carbohydrate metabolism in salt-stressed maize plants. *Int. J. Agric. Biol.*, 6: 5–8.
- Klein M, Papenbrock J. (2004). The multi-protein family of Arabidopsis sulphotransferases and their relatives in other plant species. *J Exp Bot.*, 55(404): 1809-20.
- Koag MC, Fenton RD, Wilkens S, Close TJ (2003). The binding of maize DHN1 to lipid vesicles. Gain of structure and lipid specificity. *Plant Physiol.*, 131(1): 309-16.
- Kovacs D, Kalmar E, Torok Z, Tompa P (2008). Chaperone activity of ERD10 and ERD14, two disordered stress-related plant proteins. *Plant Physiol.*, 147 (1).
- Kramer PJ, Boyer JS (1995). *Water Relations of Plants and Soils*. San Diego: Academic Press.
- Kračun-Kolarević M, Dmitrović S, Filipović B, Perić M, Mišić D, Simonović A, Todorović S (2015). Influence of sodium salicylate on rosmarinic acid, carnosol and carnosic acid accumulation by *Salvia officinalis* L. shoots grown *in vitro*. *Biotechnol.Lett.*, 37: 1693–1701.

- Krieger-Liszkay, Fufezan C, Trebst A, (2008). Singlet oxygen production in photosystem II and related protection mechanisms. *Photosynth. Res.*, 98: 551–564.
- Kumar, P., Dube, S.D., Chauhan, V.S., (1999). Effect of salicylic acid on growth, development and some biochemical aspects of soybean (*Glycine max* L. Merrill). *Ind. J. Plant Physiol.* 4, 327–330.
- Kumar RR, Sharma SK, Goswami S, Verma P, Singh K, Dixit N, Pathak H, Viswanathan C, Rai RD (2015). Salicylic acid alleviates the heat stress-induced oxidative damage of starch biosynthesis pathway by modulating the expression of heat-stable genes and proteins in wheat (*Triticum aestivum*). *Acta Physiol. Plant.* 37: 1–12.
- Kukavica B, Veljovic-Jovanovic S. (2004). Senescence-related changes in the antioxidant status of ginkgo and birch leaves during autumn yellowing. *Physiol. Plant.*, 22: 321-327.
- Kukavica B., Veljović-Jovanović S, Menckhoff Lj, Lüthje S (2012). Cell wall-bound cationic and anionic class III isoperoxidases of pea root: biochemical characterization and function in root growth. *J.Exp.B.*, 63(12): 4631–4645.
- La VH, Lee BR, Islam T, Mamun A, Park SH, Bae DW, Kim T (2020). Characterization of Glutamate-Mediated Hormonal Regulatory Pathway of the Drought Responses in Relation to Proline Metabolism in *Brassica napus* L. *Plants* 9: 512.
- Labhili M, Joudrier P, Gautier, MF (1995). Characterization of cDNAs encoding *Triticum durum* dehydrins and their expression patterns in cultivars that differ in drought tolerance. *PlantSci.*, 112: 219–230.
- Lata C., Muthamilarasan M., Prasad M. (2015) Drought Stress Responses and Signal Transduction in Plants. In: Pandey G. (eds) *Elucidation of Abiotic Stress Signaling in Plants*. Springer, New York, NY.
- Laemmli UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.*, 227(5259): 680-5.
- Larqué-Saavedra A., Martín-Mex R. (2007). Effects of Salicylic Acid on the Bioproductivity of Plants. In: Hayat S., Ahmad A. (eds) *Salicylic Acid: A Plant Hormone*. Springer, Dordrecht.
- Lee DG, Ahsan N, Lee SH, Kang KY, Bahk JD, Lee IJ, Lee BH (2007). A proteomic approach in analyzing heat-responsive proteins in rice leaves. *Proteomics*, 7(18): 3369-3383.
- Lefevre H, Bauters L, Gheysen G (2020). Salicylic Acid Biosynthesis in Plants. *Front Plant Sci.*, 11: 1-7.
- Lichtenthaler HK (1987). Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods Enzymol.*, 148: 350–382.
- Liebthal M, Maynard D, Dietz KJ (2018). Peroxiredoxins and Redox Signaling in Plants. *Antioxid Redox Signal.*, 28(7): 609-624.
- Lin CH, Peng PH, Ko CY, Markhart AH, Lin TY (2012). Characterization of a novel Y2K-type dehydrin VrDhn1 from *Vigna radiata*. *Plant Cell Physiol.*, (5):930-42.

- Lin Z, Li Y, Zhang Z, Liu X, Hsu CC, Du Y, Sang T, Zhu C, Wang Y, Satheesh V, Pratibha P, Zhao Y, Song CP, Tao WA, Zhu JK, Wang P (2020). A RAF-SnRK2 kinase cascade mediates early osmotic stress signaling in higher plants. *Nat Commun.*, (1): 11
- Lisar SY, Motafakkerazad R, Hossain MM (2012). *Water Stress in Plants: Causes, Effects and Responses*. Water Stress.
- Liu CC, Liu YG, Guo K, Fan DY, Li GG, Zheng YR, Yu LF, Yang R, (2011). Effect of drought on pigments, osmotic adjustment and antioxidant enzymes in six woody plant species in karst habitats of southwestern China. *Environ. Exp. Bot.*, 71: 174–183.
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods*, 25: 402–408.
- Llorente F, López-Cobollo RM, Catalá R, Martínez-Zapater JM, Salinas J (2002). A novel cold-inducible gene from *Arabidopsis*, RCI3, encodes a peroxidase that constitutes a component for stress tolerance. *Plant J.*, 32: 13-24.
- Lozano-Juste J, Alrefaei AF, Rodriguez PL. *Plant Osmotic Stress Signaling: MAPKKs Meet SnRK2s*. *Trends Plant Sci.*, (12): 1179-1182.
- Luthe DS, Kraus JV, Wang D, Park SY (2000). In: *Plant Environment – Interactions* (Wilkinson, R.E. ed.), 5th edition, Marcel Dekker Inc, New York, pp. 283–319.
- Malamy J, Carr JP, Klessig DF, Raskin I (1990). Salicylic Acid: a likely endogenous signal in the resistance response of tobacco to viral infection. *Science.*, 250(4983): 1002-4.
- Manohar M, Tian M, Moreau M, Park SW, Choi HW, Fei Z, Friso G, Asif M, Manosalva P, von Dahl CC, Shi K, Ma S, Dinesh-Kumar SP, O'Doherty I, Schroeder F., Van Wijk K., Klessig DF (2015). Identification of multiple salicylic acid-binding proteins using two high throughput screens. *Front. Plant Sci.*, 5:777.
- Matysik J, Alia A, Bhalu B, Prasanna M. (2002). Molecular mechanism of quenching of reactive oxygen species by proline under stress in plants. *Current Science*. 82.
- Marcińska I, Czyczyło-Mysza I, Skrzypek E, Grzesiak MT, Janowiak F, Filek M, Dziurka M, Dziurka K, Waligórski P, Juzoń K, Cyganek K, Grzesiak S (2013). Alleviation of osmotic stress effects by exogenous application of salicylic or abscisic acid on wheat seedlings. *Int. J. Mol. Sci.*, 14: 13171–13193.
- Martin-Méx R, Villanueva-Couoh E, Herrera-Campos T, Larqué-Saavedra A (2005). Positive effect of salicylates on the flowering of African violet. *Sci. Hortic.*, 103:499-502.
- Martínez C, Pons E, Prats G, León J (2004). Salicylic acid regulates flowering time and links defence responses and reproductive development. *Plant J.*, 37(2): 209-17.
- Martínez-Esplá A, Zapata PJ, Valero D, Martínez-Romero D, Díaz-Mula HM, Serrano M (2018). Preharvest treatments with salicylates enhance nutrient and antioxidant compounds in plum at harvest and after storage. *J. Sci. Food Agric.* 98: 2742–2750.

- Métraux JP, Signer H, Ryals J, Ward E, Wyss-Benz M, Gaudin J, Raschdorf K, Schmid E, Blum W, Inverardi B (1990). Increase in salicylic Acid at the onset of systemic acquired resistance in cucumber. *Science.*, 250(4983): 1004-6.
- Mhamdi A, Noctor G, Baker A (2012). Plant catalases: Peroxisomal redox guardians. *Arch. Biochem. Biophys.*, 525: 181–194.
- Michel BE (1983). Evaluation of the water potentials of solutions of polyethylene glycol 8000 both in the absence and presence of other solutes. *Plant Physiol.*, 72(1): 66-70.
- 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. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, 79: 79–88.
- Mittler R, (2017). ROS are good. *Trends Plant. Sci.*, 22: 11–19.
- Misra N, Saxena P (2009). Effect of salicylic acid on Pro metabolism in lentil grown under salinity stress. *Plant Sci.*, 177: 181–189.
- Miura K, Tada Y (2014). Regulation of water, salinity, and cold stress responses by salicylic acid. *Front. Plant Sci.*, 5(4): 1-12.
- Momčilović I, Pantelić D, Hfidan M, Savić J, Vinterhalter D (2014). Improved procedure for detection of superoxide dismutase isoforms in potato, *Solanum tuberosum* L. *Acta Physiol. Plant.*, 36(8): 2059-2066.
- Moharekar ST, Lokhande SD, Hara T, Tanaka R, Tanaka A, Chavan PD (2003). Effect of salicylic acid on chlorophyll and carotenoid contents of wheat and moong seedlings. *Photosynthetica.* 41, 315.
- Mouillon JM, Gustafsson P, Harryson P. (2006). Structural investigation of disordered stress proteins. Comparison of full-length dehydrins with isolated peptides of their conserved segments. *PlantPhysiol.*, 141.
- Murashige T, Skoog F, (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.*, 15: 473–497.
- Nadeem, M., Li, J., Yahya, M., Sher, A., Ma, C., Wang, X., & Qiu, L. (2019). Research Progress and Perspective on Drought Stress in Legumes: A Review. *Int. J. Mol. Sci.*, 20(10), 2541.
- Nawrath C, Métraux JP. (1999). Salicylic acid induction-deficient mutants of *Arabidopsis* express PR-2 and PR-5 and accumulate high levels of camalexin after pathogen inoculation. *Plant Cell.*, 11(8):1393-404.
- Nazar R, Umar S, Khan NA (2015). Exogenous salicylic acid improves photosynthesis and growth through increase in ascorbate glutathione metabolism and S assimilation in mustard under salt stress. *Plant Signal. Behav.*, 10(3): 1-10.

- Nešković M, Konjević R, Čulafić LJ (2010). Fiziologija biljaka (drugo dopunjeno izdanje), Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu. NNK International.
- Nikolova RV, Lall N, Bosa AJN (1996). An assessment of the conditions for the rapid propagation of *Impatiens flanaganiae* *in vivo* and *in vitro*. *Acta Hortic.*, 440: 633–638.
- Nilsen E, Orcutt DM (1996). The physiology of plants under stress - abiotic factors. John Wiley and Sons, Inc, New York, 689.
- Nisar N, Li L, Lu S, Khin NC, Pogson BJ (2015). Carotenoid metabolism in plants. *Mol Phys.*, 8: 68–82.
- Noctor G, Paepe RD, Foyer CH, (2006). Mitochondrial redox biology and homeostasis in plants. *Trends Plant. Sci.*, 12:125–134.
- Noctor G, Mhamdi A, Foyer CH (2014). The Roles of Reactive Oxygen Metabolism in Drought: Not So Cut and Dried. *Plant Physiol.*, 164: 1636–1648.
- Nongpiur RC, Singla-Pareek SL, Pareek A 8 (2020). The quest for osmosensors in plants. *J Exp Bot.*, 71(2): 595-607.
- Odjegba VJ, Adeniyi AM (2012). Responses of *Celosia argentea* L. to simulated drought and exogenous salicylic acid. *Nat. Sci.*, 10: 252–258.
- Oldenburg DJ, Bendich AJ, (2015). DNA maintenance in plastids and mitochondria of plants. *Front. Plant. Sci.*, 6: 883.
- Ozgur R, Turkan I, Uzilday B, Sekmen AH (2014). Endoplasmic reticulum stress triggers ROS signalling, changes the redox state, and regulates the antioxidant defence of *Arabidopsis thaliana*. *J Exp Bot.*, 65(5): 1377-90.
- Pan Y, Wu LJ, Yu ZL (2006). Effect of salt and drought stress on antioxidant enzymes activities and SOD isoenzymes of liquorice (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch). *Plant. Growth Regul.*, 49: 157–165.
- Panichazupakaranant, P (2001): Naphthoquinone formation in cell cultures of *Impatiens balsamina*. *Pharm. Biol.*, 39: 293–296.
- Pagès H, Aboyoun P, Gentleman R, DebRoy S (2019). Biostrings: Ecient Manipulation of Biological Strings. R package version 2.54.0. Available online: <https://www.bioconductor.org/packages/3.10/bioc/html/Biostrings.html>.
- Park SW, Kaimoyo E, Kumar D, Mosher S, Klessig DF (2007). Methyl salicylate is a critical mobile signal for plant systemic acquired resistance. *Science.*, 318(5847): 113-6.
- Parsell DA, Lindquist S. (1993). The function of heat-shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins. *Annual Review of Genetics*, 27(1): 437-496.
- Perry JJP, Shin DS, Getzoff ED, Tainer JA (2010). The structural biochemistry of the superoxide dismutases. *Biochim. Biophys. Acta – Prot. Proteom.*, 1804: 245–262.

- Piwowarczyk B, Kamińska I, Rybiński W (2014). Influence of PEG generated osmotic stress on shoot regeneration and some biochemical parameters in *Lathyrus* culture. *Czech J. Genet. Plant Breed.*, 50: 77–83.
- Pollastri S, Tattini M, (2011). Flavonols: old compound for old roles. *Ann. Bot.*, 108: 1225–1233.
- Pourcel L, Routaboul JM, Cheynier V, Lepiniec L, Debeaujon I (2007). Flavonoid oxidation in plants: from biochemical properties to physiological functions. *Trends Plant. Sci.*, 12: 29–36.
- Qian Y, Lynch JH, Guo L, Rhodes D, Morgan JA, Dudareva N (2019). Completion of the cytosolic post-chorismate phenylalanine biosynthetic pathway in plants. *Nat Commun.*, 10(1): 15.
- R Core Team. A Language and Environment for Statistical Computing; R Foundation for Statistical Computing:Vienna, Austria. R version 3.6.3; Available online: <https://www.r-project.org>
- Radojčić RM (2006). Oksidativni stres i antioksidativna zaštita. In: Opšta ekofiziologija, Zavod za udžbenike, Beograd, pp. 182-223.
- Raina S, Govindsamy V, Kumar M, Singh A, Rane J & Minhas P (2016). Genetic variation in physiological responses of mungbeans (*Vigna radiata* (L.) Wilczek) to drought. *Acta Physiol. Plant.*, 38.
- Receveur-Bréchet V, Bourhis JM, Uversky VN, Canard B, Longhi S. (2005). Assessing protein disorder and induced folding. *Proteins* 62.
- Reichert AI, He XZ, Dixon RA. (2009). Phenylalanine ammonia-lyase (PAL) from tobacco (*Nicotiana tabacum*): characterization of the four tobacco PAL genes and active heterotetrameric enzymes. *Biochem J.*, 424(2): 233-42.
- Rekhter D, Lüdke D, Ding Y, Feussner K, Zienkiewicz K, Lipka V, Wiermer M, Zhang Y, Feussner I. (2019). Isochorismate-derived biosynthesis of the plant stress hormone salicylic acid. *Science.*, 365(6452): 498-502.
- Riley AC, Ashlock DA, Graether SP (2019). Evolution of the modular, disordered stress proteins known as dehydrins. *PLoS One.* 14(2).
- Rivas-San Vicente M, Plasencia J (2011). Salicylic acid beyond defence: its role in plant growth and development. *J. Exp. Bot.*, 62: 3321–3338.
- Ross AF (1961). Systemic acquired resistance induced by localized virus infections in plants. *Virology.*, 14: 340-58.
- Rothe G M (2002). Enzyme assays after gel electrophoresis. In: *Enzyme Assays, A Practical Approach*, 2nd edition, Eienthal, R. and Danson, M. J. (eds), Oxford University Press, Oxford: 198.

- Saibi W, Feki K, Yacoubi I, Brini F (2015). Bridging Between Proline Structure, Functions, Metabolism, and Involvement in Organism Physiology. *Appl Biochem Biotechnol.*, 176(8): 2107-19.
- Saleem M, Fariduddin Q, Castroverde CDM (2021). Salicylic acid: A key regulator of redox signalling and plant immunity. *Plant Physiol Biochem.*, 168: 381-397.
- Sakhanokho HF, Kelley RY, (2009). Influence of salicylic acid on in vitro propagation and salt tolerance in *Hibiscus acetosella* and *Hibiscus moscheutos* (cv 'Luna Red'). *Afr.J. Biotechnol.* 8: 1474–1481.
- Sakhivelu G, Devi MKA, Giridhar P, Rajasekaran T, Ravishankar GA, Nedev T, Kosturkova G (2008). Drought-induced alterations in growth, osmotic potential and *in vitro* regeneration of soybean cultivars. *Gen. Appl. Plant Physiol.*, 34: 103–112.
- Scandalios JG (2005). Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defences. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 38: 995–1014.
- Seguel A, Jelenska J, Herrera-Vásquez A, Marr SK, Joyce MB, Gagesch KR, Shakoor N, Jiang SC, Fonseca A, Wildermuth MC, Greenberg JT, Holuigue L. (2018). PROHIBITIN3 Forms Complexes with ISOCHORISMATE SYNTHASE1 to Regulate Stress-Induced Salicylic Acid Biosynthesis in Arabidopsis. *Plant Physiol.*, 176(3): 2515-2531.
- Seyfferth C, Tsuda K (2014). Salicylic acid signal transduction: the initiation of biosynthesis, perception and transcriptional reprogramming. *Front Plant Sci.*, 5: 697.
- Signorelli S, Coitiño EL, 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. *J. Phys. Chem. B*, 118, 37–47.
- Singh B, Usha K (2003). Salicylic acid-induced physiological and biochemical changes in wheat seedlings under water stress. *Plant Growth Regul.*, 39: 137-141.
- Singh AP, Dixit G, panichra S, Dwivedi S, Tiwari M, Mallick S, Pandey V, Trivedi PK, Chakrabarty D, Tripathi RD (2015). Salicylic acid modulates arsenic toxicity by reducing its root to shoot translocation in rice (*Oryza sativa* L.). *Front. Plant Sci.*, 6:340.
- Singh R K, Jaishankar J, Muthamilarasan M, Shweta S, Dangi A, Prasad M (2016). Genome-wide analysis of heat shock proteins in C4 model, foxtail millet identifies potential candidates for crop improvement under abiotic stress. *Sci Rep.* 6: 32641.
- Shakirova FM, Sakhabutdinova DR (2003). Changes in the hormonal status of wheat seedlings induced by salicylic acid and salinity. *Plant Sci.* 164: 317–322.
- Shakirova FM, Allagulova ChR, Maslennikova DR, Klyuchnikova EO, Avalbaev AM, Bezrukova MV (2016). Salicylic acid-induced protection against cadmium toxicity in wheat plants. *Environ. Exp. Bot.*, 122:19–28.
- Sharma P, Dubey RS (2005). Modulation of nitrate reductase activity in rice seedlings under aluminium toxicity and water stress: role of osmolytes as enzyme protectant. *J Plant Physiol.*, 162(8): 854-64.

- Sharma SS, Dietz KJ, (2006). The significance of amino acids and amino acid-derived molecules in plant responses and adaptation to heavy metal stress. *J. Exp. Bot.*, 57: 711–726.
- Sharma P, Jha AB, Dubey RS, Pessarakli M, (2012). Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *J. Bot.* Article ID 217037, 26.
- Shigeto J, Tsutsumi Y (2015). Diverse functions and reactions of class III peroxidases. *New Phytol.*, 209: 1395–1402.
- Slater A, Scott NW, Fowler MR (2008). Strategies for engineering stress tolerance. In: *Plant Biotechnology. The genetic manipulations of plants*. Oxford University Press, Oxford, UK, pp. 212-236.
- Smirnov N (2008). *Antioxidants and Reactive Oxygen Species in Plants*. John Wiley and Sons, USA.
- Smirnov N, Arnaud D (2019). Hydrogen peroxide metabolism and functions in plants. *New Phytol.*, 221(3): 1197-1214.
- Soares C, Carvalho MEA, Azevedo RA, Fidalgo F (2019). Plants facing oxidative challenges-A little help from the antioxidant networks. *Environ. Exp. Bot.*, 161:4-25.
- Sohag AAM, Arif TU, Brestic M, Afrin S, Sakil A, Hossain T, Hossain MA, Hossain A (2020). Exogenous salicylic acid and hydrogen peroxide attenuate drought stress in rice. *Plant Soil Environ.*, 66: 7–13.
- Soulages JL, Kim K, Arrese EL, Walters C, Cushman JC (2003). Conformation of a group 2 late embryogenesis abundant protein from soybean. Evidence of poly (L-proline)-type II structure. *Plant Physiol.*, 131(3):963-75.
- Stevanović B i Janković M (2001). *Ekologija biljaka sa osnovama fiziološke ekologije biljaka*. Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu (NNK International).
- Stikić R i Jovanović Z (2012). *Fiziologija stresa biljaka*. Beograd-Poljoprivredni fakultet, Univerziteta u Beogradu (PGP-RTS).
- Strimbeck GR (2017). Hiding in plain sight: The F segment and other conserved features of seed plant SKn dehydrins. *Planta*, 245: 1061–1066.
- Subotić, A., Jevremović, S., Cingel, A. and Milošević, S. (2008). Effect of urea-type cytokinins on axillary shoots regeneration of *Impatiens walleriana* L. *Biotech. Equip.*, 22 (3): 817–819.
- Sun X, Yuan S, Lin HH (2006). Salicylic Acid Decreases the Levels of Dehydrin-Like Proteins in Tibetan Hulless Barley Leaves under Water Stress. *Z. Nat. C.*, 61: 245–250.
- Suzuki N, Mittler R (2006). Reactive oxygen species and temperature stresses: A delicate balance between signaling and destruction. *Physiol. Plant.*, 126:45–51.



- Szabados L, Savouré A (2010). Proline: a multifunctional amino acid, Trends Plant Sci. 15: 89-97.
- Taha A, Wagiran A, Ghazali H, Huyop F, Parveez GKA (2009): In vitro regeneration of garden balsam, *Impatiens balsamina* using cotyledons derived from seedlings. Biotechnology, 8 (1): 44–52.
- Tanner JJ (2008). Structural biology of proline catabolism. Amino Acids., 35(4): 719-30.
- Tari I, Csiszár J, Horváth E, Poór P, Takács Z, Szepesi A (2015). The alleviation of the adverse effects of salt stress in the tomato plant by salicylic acid shows a time and organ-specific antioxidant response. Acta Biol. Crac. Ser. Bot., 57: 21–30.
- Taiz L., Zeiger E. (2010). Plant Physiology 5<sup>th</sup> Edition, Sinauer Associates, Sunderland.
- 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. Front Plant Sci.
- Torrens-Spence, M. P., Bobokalonova, A., Carballo, V., Glinkerman, C. M., Pluskal, T., Shen, A., Weng JK (2019). PBS3 and EPS1 complete salicylic acid biosynthesis isochorismate Arabidopsis. Mol. Plant, 12: 1577–1586.
- Triantaphylidès C, Krischke M, Hoerberichts F, Ksas B, Gresser G, Havaux M, Van Breusegem F, Mueller M (2008). Singlet Oxygen Is the Major Reactive Oxygen Species Involved in Photooxidative Damage to Plants. Plant physiol., 148: 960-8.
- Tunnacliffe A i Wise MJ (2007). The continuing conundrum of the LEA proteins. Naturwissenschaften., 94: 791–812.
- Ul Haq S, Khan A, Ali M, Khattak AM, Gai WX, Zhang HX, Wei AM, Gong ZH (2019). Heat Shock Proteins: Dynamic Biomolecules to Counter Plant Biotic and Abiotic Stresses. Int J Mol Sci., 20(21): 5321.
- Van den Berg L, Zeng YJ (2006). Response of South African indigenous grass species to drought stress induced by polyethylene glycol (PEG)<sub>6000</sub>. S. Afr. J. Bot., 72: 284–286.
- Vaseva I, Sabotič J, Šuštar-Vozlić J, Meglič V, Kidrič M, Demirevska K, Simova-Stoilova L (2013). Droughts: New Research; Nova Science Publishers, Inc.: New York, NY, USA, 1–45.
- Velikova V, Yordanov I, Edreva A, (2000). Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants. Plant Sci., 151: 59–66.
- Verbruggen N, Hermans C (2008). Pro accumulation in plants: a review. Amino Acids., 35: 753–759.
- Verslues PE, Ober ES, Sharp RE (1998). Root growth and oxygen relations at low water potentials. Impact of oxygen availability in polyethylene glycol solutions. Plant Physiol., 116: 1403–1412.
- Verslues PE, Bray EA (2004). LWR1 and LWR2 are required for osmoregulation and osmotic adjustment in *Arabidopsis*. Plant Physiol., 136: 2831–2842

- Versules PE, Agarwal M, Katiyar-Agarwal S, Zhu J, Zhu JK (2006). Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status. *Plant J.*, 45: 523-539.
- Vlot AC, Liu PP, Cameron RK, Park SW, Yang Y, Kumar D, Zhou F, Padukkavidana T, Gustafsson C, Pichersky E, Klessig DF (2008). Identification of likely orthologs of tobacco salicylic acid-binding protein 2 and their role in systemic acquired resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.*, 56(3): 445-56.
- Xing H, Tan L, An L, Zhao Z, Wang S, Zhang C (2004). Evidence for the involvement of nitric oxide and reactive oxygen species in osmotic stress tolerance of wheat seedlings: inverse correlation between leaf abscisic acid accumulation and leaf water loss. *Plant Growth Regul.*, 42: 62-28.
- Yamamoto R, Ma G, Zhang L, Hirai M, Yahata M, Yamawaki K, Shimada T, Fujii H, Endo T, Kato M (2020). Effects of Salicylic Acid and Methyl Jasmonate Treatments on Flavonoid and Carotenoid Accumulation in the Juice Sacs of Satsuma Mandarin In Vitro. *Applied Sciences*. (24): 8916.
- Wang L, Chen S, Kong W, Li S, Archbold DD (2006). Salicylic acid pretreatment alleviates chilling injury and affects the antioxidant system and heat shock proteins of peaches during cold storage. *Postharvest Biol. Technol.*, 41: 244–251.
- Walsh I, Martin AJM, Di Domenico T, Tosatto SC (2013). ESpritz: Accurate and fast prediction of protein disorder. *Bioinformatics*. 28: 503–509.
- Welch, B.L (1947). The generalization of “Student’s” problem when several different population variances are involved. *Biometrika*, 34: 28–35.
- White RF (1979). Acetylsalicylic acid (aspirin) induces resistance to tobacco mosaic virus in tobacco. *Virology.*, 99(2): 410-412.
- Woodbury, W., Spencer, A.K., Stahmann, M.A. (1971): An improved procedure using ferricyanide for detecting catalase isozymes. *Anal. Biochem.*, 44: 301–305.
- Zargar SM, Gupta N, Nazir M, Mahajan R, Malik FA, Nageebul R, Sofi NR, Asif B, Shikari AB, Salgotra RK (2017). Impact of drought on photosynthesis: Molecular perspective, *Plant Gene*, 11(B): 154-159.
- Zhang Y, Zhao L, Zhao J, Li Y, Wang J, Guo R, Gan S, Liu CJ, Zhang K. (2017). *S5H/DMR6* Encodes a Salicylic Acid 5-Hydroxylase That Fine-Tunes Salicylic Acid Homeostasis, *Plant Physiol.*, 175(3): 1082–1093.
- Zhu JK (2002) Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annu Rev Plant Biol.* 53: 247–273.

## **Biografija autora**

Dragana D. Antić Reljin rođena je 29.08.1983. u Beogradu gde je i završila osnovnu i srednju školu. Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu upisala je školske 2002/03. godine, na studijskoj grupi Biologija, smer primenjena genetika. Diplomirala je 2010. godine sa prosečnom ocenom 9.5. Doktorske studije upisala je školske 2011/12. godine, na modulu Fiziologija i molekularna biologija biljaka, na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu.

Od 2011. Dragana D. Antić Reljin zaposlena je 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 2015. godine.

U toku svog naučno-istraživačkog rada Dragana Antić Reljin 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. Dragana Antić Reljin je član Društva za fiziologiju biljaka Srbije (DFBS), Srpskog biološkog društva (SBD).