

UNIVERZITET U BEOGRADU

HEMIJSKI FAKULTET



Marija S. VIDOVIĆ

**ANTIOKSIDATIVNI METABOLIZAM BELOG I
ZELENOG TKIVA LISTOVA PANAŠIRANE
MUŠKATLE (*Pelargonium zonale*) I TAMJANIKE
(*Plectranthus coleoides*) - UTICAJ ZRAČENJA IZ
VIDLJIVE I UV-B OBLASTI**

Doktorska disertacija

Beograd, 2015.

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ

ХЕМИЈСКИ ФАКУЛТЕТ



Марија С. ВИДОВИЋ, дипл. биохем.

**АНТИОКСИДАТИВНИ МЕТАБОЛИЗАМ БЕЛОГ
И ЗЕЛЕНОГ ТКИВА ЛИСТОВА ПАНАШИРАНЕ
МУШКАТЛЕ (*Pelargonium zonale*) И
ТАМЈАНИКЕ (*Plectranthus coleoides*) - УТИЦАЈ
ЗРАЧЕЊА ИЗ ВИДЉИВЕ И УВ-Б ОБЛАСТИ**

Докторска дисертација

Београд, 2015.

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF CHEMISTRY



Marija S. VIDOVIĆ

**ANTIOXIDATIVE METABOLISM IN WHITE AND
GREEN LEAF TISSUES OF VARIEGATED
Pelargonium zonale AND *Plectranthus coleoides*
PLANTS – VISIBLE LIGHT AND
UV-B RADIATION EFFECTS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2015

Mentori:

Dr Ljuba MANDIĆ, redovni profesor
Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Dr Sonja VELJOVIĆ JOVANOVIĆ, naučni savetnik
Institut za multidisciplinarna istraživanja (IMSI),
Univerzitet u Beogradu

Članovi komisije:

1. Dr Ljuba MANDIĆ, redovni profesor
Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu
2. Dr Sonja VELJOVIĆ JOVANOVIĆ, naučni savetnik
Institut za multidisciplinarna istraživanja (IMSI),
Univerzitet u Beogradu
3. Dr Milan NIKOLIĆ, docent
Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Datum odbrane doktorske disertacije:

**ANTIOKSIDATIVNI METABOLIZAM BELOG I ZELENOG TKIVA
LISTOVA PANAŠIRANIH BILJAKA *Pelargonium zonale* I *Plectranthus
coleoides* – UTICAJ ZRAČENJA IZ VIDLJIVE I UV-B OBLASTI**

IZVOD

Biljke izabrane kao eksperimentalni modeli za ovu disertaciju bile su panaširane muškatele (*Pelargonium zonale*) i tamjanike (*Plectranthus coleoides*). Zeleno-belo panaširano lišće predstavljalo je odličan sistem za proučavanje uticaja fotosinteze na antioksidativni i fenolni metabolizam, kao i za istraživanje metaboličkih interakcija između autotrofnog, „izvor“, tkiva, i heterotrofnog, „uvir“, tkiva unutar istog lista.

U svom prirodnom staništu biljke su izložene visokom intenzitetu vidljive svetlosti i UV-B zračenju (280-315 nm). Visok intenzitet fotosintetski aktivnog zračenja (PAR, 400-700 nm) može da nadjača kapacitet fotosintetske potrošnje i procese energetskog rasipanja i da prouzrokuje inhibiciju fotosinteze, CO₂ asimilacije i pojačanu akumulaciju reaktivnih kiseoničnih vrsta (eng. *reactive oxygen species*, ROS). Stoga su biljke razvile brojne mehanizme zaštite, koji uključuju i postojanje specijalizovanih enzimskih i neenzimskih antioksidanata.

Cilj istraživanja ove teze bio je određivanje konstitutivnih komponenata antioksidativnog sistema i njihove distribucije u fotosintetski aktivnom i fotosintetski neaktivnom tkivu listova panaširanih vrsta. Pri optimalnim svetlosnim uslovima za rast, aktivnosti enzima askorbat-glutationskog (Asc-GSH) ciklusa, kao i Cu/Zn i Mn superoksid-dismutaze su bile veće u belom tkivu, dok su aktivnosti katalaze (CAT) i tilakoidne askorbat-peroksidaze (APX) bile veće u zelenom tkivu listova biljaka *P. zonale*. Biohemijskim i imunocitohemijskim analizama, pomoću transmisiona elektronske mikroskopije, pokazano je da je Asc dvostruko više zastupljen u mezofilnim ćelijama zelenog tkiva (u peroksizomima, mitohondrijama i jedru), a GSH u mezofilnim ćelijama belog tkiva (u mitohondrijama, jedru i citosolu). S obzirom na doprinos fotosinteze u stvaranju reaktivnih kiseoničnih vrsta (eng. *reactive oxygen species*, ROS), praćen je odgovor enzimskih komponenata Asc-GSH ciklusa, CAT i peroksidaza III klase u belom i zelenom tkivu listova u uslovima stimulisane Melerove reakcije tokom izlaganja biljaka *P. zonale* visokom intenzitetu PAR-a i tretmanu parakvatom. Ovakav tretman je izazvao izraženiji odgovor enzimskih komponenti Asc-GSH ciklusa belog tkiva, u odnosu na zeleno, što je ukazalo da je belo tkivo dobro adaptirano protiv oksidativnog stresa.

U drugom delu ove disertacije ispitivani su i specifični uticaji ambijentalnog UV-B zračenja (0.90 W m^{-2}) i visokog intenziteta PAR-a ($1350 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) na fotosintetsku aktivnost i parametre izmene gasova (CO_2 i H_2O), kao i na antioksidativni i fenolni metabolizam panaširanih listova *P. coleoides* i *P. zonale* biljaka. Kako bi se izbegli mogući štetni efekti usled neprilagođenog UV-B/UV-A/PAR odnosa, kao i od nerealnih intenziteta i spektralnih karakteristika svih komponenti zračenja, eksperimenti su izvođeni u simulatorima sunčevog zračenja. Pokazano je da je efekat UV-B zračenja bio zavisn od biljne vrste, ali i od intenziteta pozadinskog PAR-a. U biljkama *P. coleoides* UV-B zračenje je stimulisalo brzinu asimilacije CO_2 i provodljivost stoma, dok u biljkama *P. zonale*, UV-B zračenje nije uticalo na fotosintezu, već je preko trehaloznog signalnog puta dovelo do degradacije skroba i saharoze, i stimulisalo transport ugljenih hidrata iz zelenog u belo tkivo. Kako je u obe ispitivane biljne vrste UV-B zračenje dovelo do pojačane akumulacije glikozida hidroksicinamičnih kiselina i flavonoida (sa antocijanima), uglavnom u belom tkivu listova, predložena su dva mehanizma koji kompenzuju nedostatak fotosinteze i pojačane anaboličke zahteve u ovom tkivu.

Visok intenzitet PAR-a je imao veći efekat na listove *P. zonale* u odnosu na listove *P. coleoides* biljaka. U biljkama *P. zonale* je stimulisao biosintezu fenilpropanoida i flavonoida sa *orto*-dihidroksi-supstutuisanim B prstenom, a u sinergiji sa UV-B zračenjem, izazvao je porast aktivnosti APX, CAT i sadržaja Asc isključivo u zelenom tkivu listova biljaka *P. zonale*. Dobijeni rezultati ukazuju na postojanje različitih aklimatizacionih odgovora na UV-B zračenje u zelenom i belom tkivu biljaka *P. zonale*.

Ključne reči: antioksidativni sistem, askorbat-glutationski ciklus, flavonoidi, fotosinteza, panaširane biljke, *Pelargonium zonale*, *Plectranthus coleoides*, ultrastruktura hloroplasta, UV-B zračenje, visok intenzitet PAR.

Naučna oblast: Biohemija

Uža naučna oblast: Metabolizam biljaka

UDK broj: 577.121

**ANTIOXIDATIVE METABOLISM IN WHITE AND GREEN LEAF
TISSUES OF VARIEGATED *Pelargonium zonale* AND *Plectranthus
coleoides* PLANTS -VISIBLE LIGHT AND UV-B RADIATION
EFFECT**

ABSTRACT

In this thesis, variegated geranium (*Pelargonium zonale*) and Swedish ivy (*Plectranthus coleoides*) were used as model plants. Green-white variegated leaves are an excellent model system for investigating the effects of photosynthesis on antioxidative and phenolic metabolism, and “source”-“sink” interactions within the same leaf.

In their natural habitat, plants are exposed to high light intensity and to UV-B radiation (280-315 nm). High levels of photosynthetically active radiation (PAR) however, might exceed the the photosynthetic assimilation capacity and energy dissipation processes and provoke inhibition of photosynthesis and enhanced accumulation of reactive oxygen species (ROS). Therefore, plants have developed numerous protection mechanisms, including specialized enzymatic and non-enzymatic antioxidants.

The aim of this study was to determine constitutive components of antioxidative system and their distribution in photosynthetically active and non-active tissues of variegated plants. Under optimal light conditions, activities of ascorbate-glutathione (Asc-GSH) cycle enzymes, Cu/Zn and Mn superoxide dismutases were higher within white leaf tissue of *P. zonale*, while thylakoid ascorbate peroxidase (APX) and catalase (CAT) activities were higher in green leaf tissue. Biochemical and immunocytochemical analysis using transmission electron microscopy revealed two-fold higher Asc content in mesophyll cells of green leaf tissue (in peroxisomes, mitochondria, nucleus), while GSH was more abundant in mesophyll cells of white leaf tissue (in mitochondria, nucleus, cytosol). Since photosynthesis is the main source of ROS in the leaves, the second aim in this thesis was to analyze the response of Asc-GSH cycle components, CAT and class III peroxidases in green and white leaf tissues, under the conditions of stimulated Mehler reaction during the exposure of *P. zonale* to high PAR and paraquat. These treatments induced greater response of Asc-GSH cycle enzymes in white leaf tissue, compared with green one, indicative of the development of adaptive mechanisms to avoid oxidative stress.

In the second half of this thesis, the specific effects of high PAR ($1350 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) and ambient UV-B irradiances (0.90 W m^{-2}) on photosynthetic activity and gas

exchange parameters (CO₂ and H₂O), as well as on antioxidative and phenolic metabolism of variegated *P. coleoides* and *P. zonale* plants were studied. In order to avoid possible detrimental effects caused by unrealistic UV-B/UV-A/PAR ratios, quantity and spectral quality of radiation, the experiments were conducted in unique sun simulators.

The results showed that ecologically relevant UV-B radiation-induced responses are species-specific and dependent on background light. Two mechanisms to compensate the absence of photosynthetic activity and increased anabolic demands in white, “sink” tissue were proposed. UV-B radiation stimulated CO₂ assimilation rate and stomatal conductance in *P. coleoides* plants. On the other hand, in *P. zonale*, UV-B radiation, provoked starch and sucrose degradation *via* the trehalose signalling pathway, and subsequent sugar transport from green to white tissue, without affecting photosynthesis. UV-B radiation induced enhanced accumulation of hydroxycinnamic acid and flavonoid glycosides, in both variegated species, mostly in white leaf tissue.

High PAR had stronger effects on the leaves of *P. zonale* plants, compared with *P. coleoides* plants. Additionally, high PAR stimulated specific accumulation of phenylpropanoids and flavonoids with *ortho*-dihydroxy B-ring substitution pattern, and synergistically with UV-B radiation, increased APX and CAT activities and Asc content, exclusively in green leaf tissue of *P. zonale* plants. Overall, these results show differential acclimatisation responses to UV-B radiation in green and in white tissue of *P. zonale* leaves.

Key words: antioxidative system, ascorbate-glutathione cycle, chloroplast ultrastructure, flavonoids, high light intensity, *Pelargonium zonale*, photosynthesis, *Plectranthus coleoides*, UV-B radiation, variegated plants.

Scientific field: Biochemistry

Scientific discipline: Plant metabolism

UDK number: 577.121

Ova doktorska disertacija je urađena u laboratoriji Odeljenja za nauke o živim sistemima Instituta za multidisciplinarna istraživanja (IMSI) Univerziteta u Beogradu. Eksperimentalne biljke su gajene u fitotronske komori na Katedri za agrohemiju i fiziologiju biljaka, Poljoprivrednog fakulteta u Beogradu. Eksperimenti II i III su postavljeni u jedinstvenim simulatorima sunčevog zračenja, (*'sun simulators'*) u okviru Odeljenja za inženjering životne sredine Helmholtz centra Minhen (*Department Environmental Engineering, Helmholtz Zentrum München*). Ultrastrukturne analize hloroplasta i imunocitohemijske analize na transmisionom elektronskom mikroskopu (TEM) su odrađene u Institutu za nauke o biljkama u okviru Karl-Franzens Univerziteta u Gracu, Austrija.

Temu za rad predložila je dr Sonja D. Veljović Jovanović, naučni savetnik, koja je kao mentor, neposredno rukovodila radom. Mentor ove disertacije je i dr Ljuba M. Mandić, redovni profesor Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

Mentoru, dr Sonji Veljović Jovanović veliko hvala, na tome što me je uvela u, za mene tada novo, polje biljne biohemije i fiziologije, na ukazanom poverenju i na suštinskoj pomoći i savetima u toku eksperimentalnog rada, podršci u međunarodnim saradnjama i vrednim savetima i diskusijama tokom pisanja radova i doktorske disertacije.

Prof. dr Ljubi Mandić želim da se zahvalim na pružanju podrške i pomoći tokom doktorskih studija i na korisnim savetima tokom pisanja teze.

Hvala prof. dr Milanu Nikoliću na kritičkoj analizi i korisnim sugestijama u toku pisanja teze.

Hvala dr Ljiljani Prokić, docentu na Katedri za agrohemiju i fiziologiju biljaka, Poljoprivrednog fakulteta Univerziteta u Beogradu na brizi i savesnosti u gajenju eksperimentalnih biljaka, kao i na pomoći i savetima tokom analize stoma i ekspresije gena muškatle.

Kolegicama Sonji Milić, dr Ani Vuleti i dr Jeleni Bogdanović Pristov hvala na konkretnoj pomoći i korisnim savetima, na diskusiji i podršci koju su mi pružale tokom eksperimentalnog rada.

Posebno hvala dr Filis Morini na nesebičnoj pomoći, požrtvovanosti, i važnim sugestijama i diskusiji, ali i na podršci, optimizmu i poverenju koje mi je ukazala kao prijatelj, u ne baš lakim i lepim momentima tokom ovih godina.

Hvala dr Berndu Zechmannu na velikoj podršci, trudu i pomoći oko pripreme uzoraka i analiza preparata na TEM-u i savetima tokom pisanja radova.

Dr Barbro J. Winkler i dr Andreas Albert-u iz Helmholtz centra Minhen hvala na pomoći oko postavke eksperimenta i savetima pri merenju ekofizioloških parametara.

Hvala kolegi dr Tomislavu Tostiju stručnom saradniku sa Hemijskog fakulteta za analizu rastvornih ugljenih hidrata na anjon izmenjivačkoj HPLC.

Zahvaljujem se i dr Jelici Lazarević i Urošu Savkoviću (Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković”) na pomoći i savetima oko statističke obrade rezultata eksperimenata sa uticajem UV-B zračenja.

Hvala mojoj drugarici dr Mileni Rikalović na satima i satima slušanja, razumevanja, vere i podrške tokom ovih godina doktorskih studija.

Mojoj porodici i prijateljima hvala na ljubavi i podršci i razumevanju za vreme koje nisam provela sa njima.

Vladi, čija mi je ljubav, razumevanje i podrška tokom ovih godina, u dobrim i u teškim trenucima umnogome pomogla da se bavim naukom.

Beograd, 2015.

Autor

SKRAĆENICE I AKRONIMI

A_{net}	brzina asimilacije CO ₂
AA	akrilamid
AO	askorbat-oksidaza
Ap	apigenin
APS	amonijum-persulfat
APX	askorbat-peroksidaza (stromalna, sAPX; tilakoidna, tAPX; citosolna, cAPX; mitohondrijska, mitAPX; iz mikrotela: peroksizoma i glioksizoma, mAPX)
Asc	redukovani askorbat
BFP	bromfenol-plavo
BSA	goveđi serum-albumin
CA	kafeinska kiselina
CAT	katalaza
Cat	katehin
CEV	centralno evropsko vreme
CGA	hlorogena kiselina (eng. <i>chlorogenic acid</i>)
CHAPSO	3-[(3-holamidopropil)-dimetil-amonium]-2-hidroksi-1-propan sulfonat, (eng. 3-[(3- <i>cholamidopropyl</i>) <i>dimethylammonio</i>]-2- <i>hydroxy-1-propanesulfonate</i>)
c_i	intraćelijska koncentracija CO ₂ u listu
CTAB	cetil-trimetil-amonijum-bromid
Cy	cijanidin, (eng. <i>cyanidin</i>)
cyt	citohrom
cyt b ₆ f	citohtom b ₆ /f kompleks
DETAPAC	dietilen-triamino-pentasilčetna kiselina
DHA	dehidroaskorbat
DHAC	dihidroksi-aceton
DHAR	dehidroaskorbat-reduktaza
DMSO	dimetil-sulfoksid
DNK	dezoksiribonukleinska kiselina
kDNK	komplementarna DNK

DNPH	2,4-dinitrofenilhidrazin
DTT	ditiotreititol
ECat	epikatehin
EDTA	etilendiaminotetrasirćetna kiselina
ETR	brzina linearnog elektronskog transporta kroz PS II (eng. <i>electron transfer rate</i>)
ETL	elektron-transportni lanac
F'	fluorescencija <i>hl a</i> listova adaptiranih na aktinsku svetlost
F_o, F_o'	minimalna fluorescencija <i>hl a</i> listova adaptiranih na mrak i na svetlo, redom
FA	ferulinska kiselina
Fd	feredoksin
F_m, F_m'	maksimalna fluorescencija <i>hl a</i> listova adaptiranih na mrak i svetlo, redom
FNR	feredoksin-NADP ⁺ -oksidoreduktaza
F_q'	gašenje fluorescencije fotohemijским procesima, $F_q' = (F_m' - F')$
F_q'/F_v'	faktor efikasnosti PS II, proporcionalan koncentraciji otvorenih reakcionih centara PS II
Fru	fruktoza
F_v, F_v'	varijabilna fluorescencija listova adaptiranih na mrak, $F_v = (F_m - F_o)$ i svetlo, $F_v' = (F_m' - F_o')$
F_v/F_m	maksimalan kvantni prinos fotohemije PS II, odnosno redukcije Q _A
$\Phi_{PS II}$	radna efikasnost PS II, proporcionalna efikasnosti linearnog elektronskog protoka kroz PS II; $\Phi_{PS II} = F_q'/F_m'$
Φ_{CO_2}	kvantni prinos asimilacije CO ₂
FW	sveža masa u g (eng. <i>fresh weight</i>)
G3P	gliceraldehid 3-fosfat
GA	galna kiselina
Gal	galaktoza
GalL	L-galaktozo-1,4-lakton
GalLDH	L-GalL-dehidrogenaza
Glc	glukoza
GR	glutation-reduktaza
g_s	provodljivost stoma
GSH	glutation, redukovani
GSSG	glutation-disulfid, oksidovani glutacion
HBAs	hidroksibenzojeve kiseline

HCA	hidroksicinamične kiseline
<i>hl</i>	hlorofil
HL	visok intezitetom svetlosti, $1350 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PAR korišćen u eksperimentalnom delu teze (eng. <i>high light</i>)
HPLC	tečna hromatografija visokih performansi (eng. <i>high performance liquid chromatography</i>)
HRP	peroksidaza iz rena (eng. <i>horseradish peroxidase</i>)
IEF	izoelektrofokusingiranje
IR	infracrveno zračenje, elektromagnetno zračenje od 780 nm do 1 mm.
K	kampferol
LHC	kompleks za sakupljanje svetlosti (eng. <i>light harvesting complex</i>)
LL	nizak intezitetom svetlosti, $395 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PAR, korišćen u eksperimentalnom delu teze (eng. <i>low light</i>)
M	miricetin
Mal	maltoza
MDA [•]	monodehidroaskorbil-radikal
MDAR	monodehidroaskorbat-reduktaza
MPA	metafosforna kiselina
NADH	nikotinamid-adenindinukleotid redukovani
NADPH	nikotinamid-adenindinukleotid-fosfat redukovani
NBT	<i>nitroblue tetrazolium</i>
NDH	NADPH zavisna dehidrogenaza u hloroplastima
NPQ	nefotohemijско gašenje fluorescencije <i>hl a</i> , $\text{NPQ} = (F_m - F_m') / F_m'$ (eng. <i>non-photochemical quenching</i>)
<i>o</i> -PDA	<i>orto</i> -fenilen-diamin (<i>ortho-phenylenediamine</i>)
PA	poliakrilamid
PAGE	poliakrilamidna gel elektroforeza
PAL	fenilalanin-amonijum liaza
PAR	fotosintetski aktivno zračenje: 400-700 nm (eng. <i>photosynthetically active radiation</i>)
<i>p</i> -CA	<i>para</i> -kumarna kiselina i derivati
PC	plastocijanin
PCR	polimerazna lančana reakcija (eng. <i>polymerase chain reaction</i>)
Pg	pelargonidin
<i>p</i> -HBA	<i>para</i> -hidroksibenzoeva kiselina

POD	peroksidaze III klase
Pq	parakvat ili metilviologen (eng. <i>paraquat</i>)
PQ	plastohinon
PQH ₂	plastohinol
PrcA	protokatehuinska kiselina
PS I	fotosistem I (eng. <i>photosystem I</i>)
PS II	fotosistem II (eng. <i>photosystem II</i>)
PTOX	terminalna plastohinol oksidaza
PVP	polivinilpirolidon
Q	kvercetin (eng. <i>quercetin</i>)
Q _A , Q _B	primarni i sekundarni hinonski akceptori elektrona fotosistemskom ETL
RA	rozmarinska kiselina
RNK	ribonukleinska kiselina
RNS	reaktivne azotne vrste (eng. <i>reactive nitrogen species</i>)
ROS	reaktivne kiseonične vrste (eng. <i>reactive oxygen species</i>)
RuBP	ribulozo-1,5-bifosfat
Rubisco	RuBP karboksilaza/oksigenaza
SDS	natrijum-dodecil-sulfat (eng. <i>sodium dodecylsulphate</i>)
SEM	skenirajuća elektronska mikroskopija
SOD	superoksid-dismutaza
SSZ	simulator sunčevog zračenja
Suc	saharoza (eng. <i>sucrose</i>)
SyA	siringinska kiselina (eng. <i>syringic acid</i>)
TCA	trihlorsirćetna kiselina
TEM	transmisiona elektronska mikroskopija
TEMED	N,N,N',N'-tetrametil-etan-1,2-diamin
TocOH	tokoferol
TP	triozo-fosfati
Tre	trehaloza
Tris	tris(hidroksimetil)aminometan
Trx	tiroredoksin
UV	ultraljubičasto zračenje, elektromagnetno zračenje u opsegu: 200 - 400 nm
UV-A	oblast UV zračenja od 315 - 400 nm

UV-B	oblast UV zračenja od 280 - 315 nm
v	zapreminski udeo
VDE	violaksantin-deepoksidaza
VIS	vidljiva oblast spektra elektromagnetnog zračenja (400 - 770 nm)
w	maseni udeo
wt	divlji tip (<i>wild type</i>)

SADRŽAJ:

1. UVOD I CILJEVI RADA.....	1
2. TEORIJSKI DEO.....	5
2.1. PANAŠIRANE BILJKE.....	5
2.1.1. <i>Definicija panaširanosti i značaj panaširanih biljaka u naučnim istraživanjima.....</i>	5
2.1.2. <i>Panaširani Arabidopsis mutant immutans (im).....</i>	7
2.1.3. <i>Eksperimentalni modeli: panaširana muškatla i tamjanika.....</i>	8
2.1.3.1. <i>Muškatla (Pelargonium zonale L.).....</i>	9
2.1.3.2. <i>Tamjanika (Plectranthus coleoides Benth.).....</i>	11
2.2. KRATAK PREGLED FOTOSINTEZE C3 BILJAKA.....	13
2.2.1. <i>Hloroplasti.....</i>	13
2.2.2. <i>Apsorpcija, prenos i hvatanje svetlosti i prenos elektrona.....</i>	15
2.2.3. <i>Regulacija fotosintetskog transporta elektrona.....</i>	19
2.2.4. <i>Asimilacija CO₂ – Calvin-Bensonov ciklus.....</i>	23
2.2.5. <i>Fotorespiracija.....</i>	26
2.2.6. <i>Efikasnost fotosinteze i fotosistema II.....</i>	28
2.3. REAKTIVNE KISEONIČNE VRSTE (ROS): HEMIJA I STVARANJE <i>in vivo</i>	32
2.3.1. <i>Radikali i ROS.....</i>	32
2.3.2. <i>Stvaranje ROS u biljnim ćelijama.....</i>	34
2.3.2.1. <i>Stvaranje ROS u fotosintezi.....</i>	36
2.3.2.2. <i>ROS kao signalni molekuli.....</i>	38
2.4. ANTIOKSIDATIVNI SISTEM U BILJKAMA.....	39
2.4.1. <i>Enzimski antioksidanti.....</i>	40
2.4.1.1. <i>Superoksid-dismutaza (SOD, EC 1.15.1.1).....</i>	41
2.4.1.2. <i>Katalaza (CAT, EC 1.11.1.6).....</i>	42
2.4.1.3. <i>Peroksidaze III klase (POD, EC 1.11.1.7).....</i>	42

2.4.1.4.	Askorbat-peroksidaza (APX, EC 1.11.1.11).....	44
2.4.1.5.	Monodehidroaskorbat-reduktaza (MDAR, EC 1.6.5.4).....	45
2.4.1.6.	Dehidroaskorbat-reduktaza (DHAR, EC 1.8.5.1).....	46
2.4.1.7.	Glutation-reduktaza (GR, EC 1.6.4.2).....	46
2.4.2.	<i>Neenzimski antioksidanti</i>	47
2.4.2.1.	Askorbat.....	47
2.4.2.2.	Glutation.....	51
2.4.2.3.	Fenolna jedinjenja.....	53
2.4.2.4.	Tokoferol i karotenoidi.....	57
2.5.	ZAJEDNIČKA SVOJSTVA ABIOTSKOG I BIOTSKOG STRESA: OKSIDATIVNI STRES... 58	
2.5.1.	<i>Visok intenzitet PAR-a kao stresor</i>	59
2.5.2.	<i>UV-B zračenje: stresor vs. regulator</i>	60
3.	MATERIJAL I METODE	64
3.1.	BILJNI MATERIJAL.....	65
3.1.1.	<i>Pelargonium zonale L.</i>	65
3.1.2.	<i>Plectranthus coleoides Benth.</i>	65
3.2.	GAJENJE I RAZMNOŽAVANJE BILJAKA.....	66
3.2.1.	<i>Gajenje i razmnožavanje biljaka P. zonale var. „Ben Franklin”</i>	66
3.2.2.	<i>Gajenje razmnožavanje biljaka P. zonale var. „Frank Headly” i P. coleoides</i>	66
3.3.	EKSPERIMENTALNI DIZAJN.....	67
3.3.1.	<i>Postavka eksperimenta za praćenje odgovora komponenti Asc-GSH ciklusa na izlaganje jakom sunčevom zračenju i tretman parakvatom</i> ... 67	
3.3.2.	<i>Postavka eksperimenata za praćenje odgovora metabolizma panaširanih biljaka na visok intenzitet PAR-a i ambijentalne doze UV-B zračenja</i>	69
3.3.2.1.	Simulatori sunčevog zračenja.....	69
3.3.2.2.	Uslovi i režimi zračenja.....	70
3.4.	PARAMETRI FOTOSINTEZE I TRANSPIRACIJE BILJAKA.....	73
3.4.1.	<i>Merenje fluorescencije hlorofila</i>	73
3.4.2.	<i>Merenje parametara izmene gasova</i>	74
3.5.	TRANSMISIONA ELEKTRONSKA MIKROSKOPIJA (TEM).....	75

3.5.1.	<i>Analiza ultrastrukture hloroplasta.....</i>	75
3.5.1.1.	Fiksiranje uzoraka.....	75
3.5.1.2.	Sečenje i priprema uzoraka.....	76
3.5.1.3.	Kompjuterska obrada skeniranih preseka.....	77
3.5.2.	<i>Imunocitohemijska detekcija askorbata i glutaciona.....</i>	77
3.5.2.1.	Fiksiranje uzoraka.....	77
3.5.2.2.	Sečenje i imunohemijsko obeležavanje uzoraka.....	78
3.5.2.3.	Kompjuterska obrada skeniranih preseka.....	79
3.6.	<i>BIOHEMIJSKI PARAMETARI BILJAKA P. ZONALE I P. COLEOIDES.....</i>	79
3.6.1.	<i>Ekstrakcija i određivanje fotosintetskih pigmenata u listovima biljaka P. zonale i P. coleoides.....</i>	80
3.6.2.	<i>Ekstrakcija i određivanje fenolnih jedinjenja u listovima biljaka P. zonale i P. coleoides.....</i>	81
3.6.2.1.	Ekstrakcija fenolnih jedinjenja.....	81
3.6.2.2.	Identifikacija i kvantifikacija fenolnih jedinjenja.....	81
3.6.3.	<i>Ekstrakcija i određivanje redukovanog i oksidovanog askorbata u listovima biljaka P. zonale i P. coleoides.....</i>	83
3.6.3.1.	Ekstrakcija askorbata.....	83
3.6.3.2.	HPLC analiza askorbata.....	84
3.6.4.	<i>Ekstrakcija i određivanje redukovanog i oksidovanog glutaciona u listovima biljaka P. zonale.....</i>	85
3.6.4.1.	Ekstrakcija glutaciona.....	85
3.6.4.2.	Redukcija glutaciona i derivatizacija tiolnih grupa.....	85
3.6.4.3.	Identifikacija i kvantifikacija SBD-F/GSH derivata.....	85
3.6.5.	<i>Ekstrakcija i određivanje rastvornih ugljenih hidrata iz listova biljaka P. zonale.....</i>	86
3.6.5.1.	Ekstrakcija rastvornih ugljenih hidrata.....	86
3.6.5.2.	Identifikacija i kvantifikacija rastvornih ugljenih hidrata.....	86
3.6.6.	<i>Ekstrakcija antioksidativnih enzima iz listova biljaka P. zonale i P. coleoides.....</i>	87
3.6.6.1.	Ekstrakcija peroksidaza III klase, katalaze i superoksid-dismutaze.....	88
3.6.6.2.	Ekstrakcija askorbat-peroksidaze.....	88
3.6.6.3.	Ekstrakcija monodehidroaskorbat-reduktaze, dehidroaskorbat-reduktaze i glutation-reduktaze.....	88

3.6.7.	<i>Određivanje sadržaja ukupnih rastvornih proteina u listovima biljaka P. zonale i P. coleoides</i>	89
3.6.8.	<i>Određivanje aktivnosti enzima u listovima biljaka P. zonale i P. coleoides</i>	89
3.6.8.1.	Određivanje aktivnosti POD.....	90
	- gvajakol kao supstrat.....	90
	- CA kao supstrat.....	90
	- FA kao supstrat.....	90
	- CGA kao supstrat.....	91
	- Cat kao supstrat.....	91
	- Q kao supstrat.....	91
3.6.8.2.	Određivanje aktivnosti SOD.....	91
3.6.8.3.	Određivanje aktivnosti CAT.....	92
3.6.8.4.	Određivanje aktivnosti APX.....	92
3.6.8.5.	Određivanje aktivnosti MDAR.....	92
3.6.8.6.	Određivanje aktivnosti DHAR.....	93
3.6.8.7.	Određivanje aktivnosti GR.....	93
3.6.9.	<i>Određivanje stepena karbonilacije rastvornih proteina iz listova biljaka P. zonale i P. coleoides</i>	93
3.6.10.	<i>Elektroforetsko razdvajanje proteina iz ekstrakata listova biljaka P. zonale</i>	94
3.6.10.1.	Vertikalna elektroforeza na poliakrilamidnom gelu pod nedenaturišućim uslovima (<i>PAGE</i>).....	94
	- razdvajanje APX izoformi.....	94
	- razdvajanje SOD, POD i CAT izoformi.....	95
3.6.10.2.	Vertikalna elektroforeza na poliakrilamidnom gelu pod denaturišućim uslovima (<i>SDS-PAGE</i>).....	95
3.6.10.3.	Izoelektrofokusiranje (IEF) proteina.....	96
3.6.10.4.	Vizuelizacija dobijenih proteinskih traka i izoformi na gelu.....	96
	- detekcija proteinskih traka.....	97
	- detekcija APX izoformi sa PAGE.....	97
	- detekcija CAT izoformi sa PAGE.....	98
	- detekcija POD izoformi sa PAGE i IEF.....	98
	- detekcija SOD izoformi sa PAGE i IEF.....	98
3.6.11.	<i>Imunoblot (Western blot)</i>	99

3.6.12.	<i>Ekspersija gena u listovima biljaka P. zonale</i>	100
3.6.12.1.	Izolovanje ukupne RNK.....	100
3.6.12.2.	Sinteza komplementarne DNK.....	101
3.6.12.3.	Kvantitativna polimerazna lančana reakcija (qPCR).....	102
3.7.	DETEKCIJA AKUMULIRANOG VODONIK-PEROKSIDA U LISTOVIMA BILJAKA <i>P. ZONALE</i> i <i>P. COLEOIDES</i>	102
3.8.	STATISTIČKA OBRADA PODATAKA.....	103
3.8.1.	<i>Statistička analiza odgovora komponenti Asc-GSH ciklusa listova P. zonale na izlaganje jakom sunčevom zračenju i tretman parakvatom</i>	103
3.8.2.	<i>Statistička analiza odgovora metabolizma panaširanih biljaka na visok intenzitet PAR-a i ambijentalne doze UV-B zračenja</i>	104
4.	REZULTATI	105
4.1.	RAZVOJ METODA ZA ODREĐIVANJE SADRŽAJA ASKORBATA I FENOLNIH JEDINJENJA U BILJNOM MATERIJALU.....	105
4.1.1.	<i>Metod za određivanje redoks-stanja Asc</i>	105
4.1.1.1.	Optimizacija uslova ekstrakcije Asc.....	106
4.1.1.2.	Optimizacija uslova redukcije DHA i oksidacije Asc.....	108
4.1.2.	<i>Metod za određivanje sadržaja fenolnih jedinjenja</i>	110
4.1.2.1.	Analiza fenolnih jedinjenja.....	110
4.1.2.2.	Optimizacija uslova ekstrakcije fenolnih jedinjenja.....	113
4.1.2.3.	Optimizacija uslova hidrolize glikozida fenolnih jedinjenja.....	115
4.1.2.4.	Profili fenolnih jedinjenja u listovima biljaka <i>P. zonale</i> , <i>P. coleoides</i> , <i>T. platyphyllos</i> i <i>A. altissima</i>	117
4.2.	ANTIOKSIDATIVNI SISTEM U ZELENOM I BELOM TKIVU LISTOVA BILJAKA <i>P. ZONALE</i> VAR. „BEN FRANKLIN”.....	119
4.2.1.	<i>Karakterizacija komponenata antioksidativnog sistema u zelenom i belom tkivu listova biljaka P. zonale var. „Ben Franklin”</i>	119
4.2.1.1.	Markeri oksidativnog stresa.....	119
4.2.1.2.	Redoks-stanje Asc i GSH.....	121
4.2.1.3.	Subćelijska lokalizacija Asc i GSH.....	121
4.2.1.4.	SOD: aktivnost, izoforme i distribucija.....	127
4.2.1.5.	CAT: aktivnost, izoforme i distribucija.....	128
4.2.1.6.	POD: aktivnost, izoforme i distribucija.....	129

4.2.1.7.	Aktivnosti enzima Asc-GSH ciklusa.....	132
4.2.1.8.	APX: izoforme i distribucija.....	132
4.2.2.	<i>Odgovor komponenti Asc-GSH ciklusa zelenog i belog tkiva listova biljaka P. zonale na povišen intenzitet sunčevog zračenja i tretman parakvatom.....</i>	135
4.2.2.1.	Dinamika promena redoks-stanja Asc i GSH.....	136
4.2.2.2.	Dinamika promena aktivnosti enzima Asc-GSH ciklusa.....	141
4.3.	IZLAGANJE BILJAKA <i>P. COLEOIDES</i> VISOKOM INTENZITETU PAR-A I AMBIJENTALNIM DOZAMA UV- B ZRAČENJA.....	146
4.3.1.	<i>Odgovor fotosinteze listova P. coleoides na visok intenzitet PAR-a i ambijentalne doze UV-B zračenja.....</i>	146
4.3.1.1.	Dinamika promene parametara fluorescencije <i>hl a</i>	146
4.3.1.2.	Dinamika promene parametara izmene gasova.....	147
4.3.1.3.	Sadržaj fotosintetskih pigmenata.....	151
4.3.1.4.	Promene u ultrastrukturi plastida.....	152
4.3.2.	<i>Odgovor fenolnog metabolizma zelenog i belog tkiva listova P. coleoides na visok intenzitet PAR-a i ambijentalne doze UV-B zračenja.....</i>	153
4.3.3.	<i>Odgovor antioksidativnog metabolizma zelenog i belog tkiva listova P. coleoides na visok intenzitet PAR-a i ambijentalne doze UV-B zračenja..</i>	156
4.3.3.1.	Markeri oksidativnog stresa.....	156
4.3.3.2.	Aktivnosti enzima APX, POD i CAT.....	157
4.4.	IZLAGANJE BILJAKA <i>P. ZONALE</i> VISOKOM INTENZITETU PAR-A I AMBIJENTALNIM DOZAMA UV- B ZRAČENJA.....	160
4.4.1.	<i>Odgovor fotosinteze listova P. zonale var. „Frank Headley” na visok intenzitet PAR-a i ambijentalne doze UV-B zračenja.....</i>	160
4.4.1.1.	Dinamika promene parametara fluorescencije <i>hl a</i>	160
4.4.1.2.	Dinamika promene parametara izmene gasova.....	161
4.4.1.3.	Sadržaj fotosintetskih pigmenata.....	163
4.4.1.4.	Promene u ultrastrukturi plastida.....	165
4.4.2.	<i>Odgovor metabolizma rastvornih ugljenih hidrata zelenog i belog tkiva listova P. zonale na visok intenzitet PAR-a i ambijentalne doze UV-B zračenja.....</i>	166
4.4.3.	<i>Odgovor fenolnog metabolizma zelenog i belog tkiva listova P. zonale na visok intenzitet PAR-a i ambijentalne doze UV-B zračenja.....</i>	168
4.4.3.1.	Konstitutivni profil fenolnih jedinjenja u zelenom i belom tkivu listova.....	169
4.4.3.2.	Uticaj UV-B zračenja na sadržaj fenolnih jedinjenja u zelenom i	

belom tkivu listova.....	169
4.4.3.3. Uticaj visokog intenziteta PAR- na sadržaj fenolnih jedinjenja u zelenom i belom tkivu listova.....	171
4.4.4. <i>Odgovor antioksidativnog metabolizma zelenog i belog tkiva listova P. zonale na visok intenzitet PAR-a i ambijentalne doze UV-B zračenja.....</i>	172
4.4.4.1. Markeri oksidativnog stresa.....	172
4.4.4.2. Aktivnosti enzima APX, CAT i POD.....	173
5. DISKUSIJA.....	175
5.1. ODREĐIVANJE REDOKS-STANJA ASC U LISTOVIMA.....	175
5.2. SIMULTANO ODREĐIVANJE FENOLNIH KISELINA I FLAVONOIDA U LISTOVIMA RAZLIČITIH BILJNIH VRSTA.....	177
5.3. ANTIOKSIDATIVNI SISTEM U ZELENO-BELIM LISTOVIMA <i>P. ZONALE</i>	182
5.3.1. <i>Akumulacija ROS u zelenom i belom tkivu listova P. zonale.....</i>	182
5.3.2. <i>Konstitutivni činioci antioksidativnog sistema zelenog i belog tkiva listova P. zonale su različiti.....</i>	183
5.3.2.1. Asc i GSH: sadržaj i distribucija.....	183
5.3.2.2. Enzimski antioksidanti.....	186
5.3.3. <i>Stimulacija Melerove reakcije sunčevom svetlošću i parakvatom aktivira komponente Asc- GSH ciklusa zelenog i belog tkiva listova biljaka P. zonale.....</i>	189
5.3.4. <i>Različitost i povezanost antioksidativnog sistema zelenog i belog tkiva listova panaširane muškatile.....</i>	192
5.4. UTICAJ UV-B ZRAČENJA I VISOKOG PAR-A NA METABOLIZAM ZELENOG I BELOG TKIVA LISTOVA <i>P. ZONALE</i>	195
5.4.1. <i>Prednost simulacije ambijentalnih doza UV-B zračenja u izučavanju dejstva na metabolizam biljaka.....</i>	195
5.4.2. <i>UV-B zračenje je stimulisalo asimilaciju CO₂ i provodljivost stoma u biljakama P. coleoides.....</i>	196
5.4.3. <i>UV-B zračenje je indukovalo razgradnju skroba u listovima biljaka P. zonale.....</i>	198
5.4.4. <i>Fotosintetski aparat obe panaširane vrste je uspešno aklimatizovan na visok intenzitet bele svetlosti.....</i>	200
5.4.5. <i>Transport ugljenih hidrata između zelenog i belog tkiva listova P. zonale izlaganih UV-B zračenju.....</i>	201
5.4.6. <i>Stimulacija fenilpropanoidnog i flavonoidnog biosintetskog puta UV-B zračenjem - antioksidativna i apsorbujuća uloga.....</i>	204
5.4.7. <i>Visok intenzitet PAR-a i ambijentalnih doza UV-B zračenja stimulišu antioksidativni metabolizam u obe ispitivane vrste. Veza sa fenolnim</i>	

<i>jedinjenjima</i>	208
5.4.8. <i>Integracija metaboličkog odgovora zelenog i belog tkiva listova P. coleoides na UV-B zračenje i visok intenzitet PAR-a</i>	210
5.4.9. <i>Integracija metaboličkog odgovora zelenog i belog tkiva listova P. zonale na UV-B zračenje i visok intenzitet PAR-a</i>	212
6. ZAKLJUČCI	216
7. LITERATURA	219
8. PRILOZI	243
9. BIOGRAFIJA AUTORA	xxi

1. UVOD I CILJEVI RADA

Panaširane biljke muškata (*Pelargonium zonale*) i tamjanika (*Plectranthus coleoides*) su izabrane za eksperimentalne model-sisteme ove disertacije kao predstavnici dve familije biljaka adaptiranih na visoke intenzitete sunčeve svetlosti. Panaširane biljke predstavljaju najčešći oblik biljnih himera (ćelija sa različitim genotipom u jednom organizmu). Panaširanost listova podrazumeva da na jednom listu postoje različito obojeni segmenti, najčešće zeleni i beli (ili žuti). Ćelije mezofila zelenih delova sadrže normalno razvijene i funkcionalne hloroplaste, dok plastidi ćelija belih delova ne sadrže ni hlorofil ni organizovane tilakoidne strukture, pa samim tim bele ćelije nisu fotosintetski aktivne. Panaširano lišće predstavlja odličan model sistem za istraživanje „izvor-uvir“ (“*source-sink*”) interakcija unutar samog lista, kao i za proučavanje uticaja reaktivnih kiseoničnih vrsta (*reactive oxygen species*, ROS) nastalih u procesu fotosinteze na antioksidativni sistem u listovima, u celini.

Reaktivne kiseonične vrste su „aktivirani“ oblici molekuskog kiseonika, nastali bilo ekscitacijom bilo višestepenom monovalentnom redukcijom. Prisustvo ROS, čak i u niskim koncentracijama, u ćelijama dovodi do oksidativnog oštećenja biomolekula što može dovesti do mutacija, inhibicije sinteze proteina, promene aktivnosti enzima i povećanja permeabilnosti i fluidnosti membrana. S druge strane, neke ROS prisutne u niskim koncentracijama predstavljaju signalne molekule koji učestvuju u regulaciji rasta, ćelijskog ciklusa, programirane ćelijske smrti, hormonskog metabolizma i aklimatizacije biljaka na uslove spoljne sredine.

Fotosinteza je najznačajniji izvor ROS u zelenom tkivu listova, čak i pri optimalnim uslovima za rast biljke. U fotosintezi ROS nastaju direktno u hloroplastima u procesima energetskeg transfera i transporta elektrona i, indirektno, u procesu fotorespiracije C3 biljaka u peroksizomima. Antioksidativni sistem predstavlja kompleksnu mrežu različitih enzima i antioksidanata male molekulske mase koje zajedno i orkestrirano deluju, u zavisnosti od specifične ROS i datog ćelijskog odeljka. Najvažnije komponente antioksidativnog sistema u biljkama podrazumevaju enzime superoksid-dismutazu, katalazu, peroksidaze III klase i komponente askorbat-glutationskog ciklusa i fenolna jedinjenja.

Mnogi abiotski i biotski faktori iz spoljašnje sredine izazivaju stvaranje visokih koncentracija ROS, odnosno porast oksidativnog pritiska u biljnim ćelijama. U svom prirodnom okruženju biljke su svakodnevno izložene visokom intenzitetu bele svetlosti. Kada je intenzitet svetlosti, odnosno fotosintetski aktivnog zračenja (PAR, 400-700 nm), visok toliko da je apsorbovana energija u višku u odnosu na metaboličku potrošnju, odnosno u uslovima visokog ekscitacionog pritiska, dolazi do pojačane redukcije kiseonika i stvaranja ROS koje potencijalno mogu da dovedu do inhibicije fotosinteze i CO₂ asimilacije. Ukoliko postojeći nivo antioksidanata nema dovoljan kapacitet da ukloni akumulirane ROS, bilo da je stvaranje ROS intenzivno, bilo da je postojeći nivo antioksidanata nizak, redoks homeostaza će se narušiti. Stanje koje nastaje u ćeliji može da se definiše kao oksidativni stres. Istovremeno, nastale ROS predstavljaju signal za ekspresiju gena koji su odgovorni za antioksidativnu zaštitu i održavanje redoks homeostaze.

Do površine zemlje dopire zračenje talasnih dužina većih od 290 nm kojima pripadaju UV-B (280-315 nm) i UV-A (315-400 nm) oblasti UV zračenja. UV-B zračenje od skora u biljnoj fiziologiji dobija poseban značaj. Naime, uprkos činjenici da visoke doze, i kratke talasne dužine, UV-B zračenja izazivaju modifikacije DNK, akumulaciju ROS, oksidativni stres i inhibiciju fotosinteze, niske, ekološki relevantne UV-B doze predstavljaju značajan regulator u rastu i razvoju biljaka. Indukcija biosinteze fenilpropanoida i flavonoida i aktivacija antioksidativnog metabolizma su glavni odgovori aklimatizacije biljaka na prirodne doze UV-B zračenja.

Predmet istraživanja ove teze bio je određivanje konstitutivnih komponenta antioksidativnog sistema u fotosintetski aktivnom i fotosintetski neaktivnom tkivu listova odabranih panaširanih vrsta. S obzirom na doprinos fotosinteze u stvaranju ROS, predmet

istraživanja bio je i definisanje i poređenje inducibilnog antioksidativnog odgovora u belom i zelenom tkivu listova izlaganih visokom intenzitetu PAR i parakvatu (metilviologenu), herbicidu koji izaziva pojačanu produkciju ROS na fotosistemu I. U drugom delu teze prućene su promene fotosintetske aktivnosti, antioksidativnog i sekundarnog metabolizma izazvanih UV-B zraćenjem, u „izvor“ i „uvir“ tkivu listova panaširanih biljaka.

Eksperimentalni deo ove teze je podeljen na četiri dela. Prvi deo se odnosi na metodološku problematiku u redoks biohemiji, odnosno na pouzdanu ekstrakciju i određivanje koncentracija najprisutnijih antioksidanata askorbata i glutaciona, čije se redoks stanje koristi kao marker oksidativnog stresa u ćelijama. Stoga je najpre pristupljeno uspostavljanju metoda koje bi omogućile pravilno precizno, reproduktivno i tačno određivanje koncentracija i aktivnosti antioksidanata i prooksidanata. Poseban izazov su predstavljali listovi biljaka bogati fenolnim jedinjenjima, koja mogu da oksiduju askorbat i pri tome uzrokuju pogrešne rezultate. Drugi deo obuhvata karakterizaciju komponenata antioksidativnog sistema u belom i zelenom tkivu listova panaširane muškatile i praćenje odgovora antioksidativnog sistema na izlaganje jakom sunčevom zraćenju i tretmanu parakvatom (Pq). Cilj ovog dela istraživanja odnosio se na ispitivanje da li su komponente antioksidativnog sistema različito distribuirane u fotosintetski aktivnim i fotosintetski neaktivnim ćelijama listova, kao i na ispitivanje razlika u odgovoru ova dva tkiva na primenjene tretmane.

Poznato je da se odgovor biljaka na UV-B zraćenje razlikuje u zavisnosti od UV-B:UV-A:PAR odnosa. Stoga je u trećem i četvrtom delu eksperimentalnog rada pažnja bila usmerena na izlaganje *P. coleoides* i *P. zonale* biljaka (redom) simuliranim prirodnim uslovima sunčevog zraćenja tokom sunčanih dana. Proučavan je odgovor fotosintetskog, antioksidativnog i fenolnog metabolizma panaširanih listova tamjanike i muškatile na visok intenzitet PAR i prirodan nivo UV-B zraćenja. U literaturi je pokazano da se neki odgovori biljaka na UV-B zraćenje preklapaju sa odgovorima na UV-A, plavu i belu svetlost, što može da ukazuje na međusobno unakrsnu toleranciju. U skladu sa tim, cilj je bio da se ispita da li se odgovor belih i zelenih ćelija listova obe vrste na primenjeno UV-B zraćenje razlikuje međusobno i u odnosu na pozadinsko osvetljenje. U četvrtom delu eksperimentalnog rada ispitivana je međusobna povezanost fotosintetskog, antioksidativnog, fenolnog metabolizma i metabolizma rastvornih ugljenih hidrata „izvor“ tkiva sa „uvir“ tkivom listova *P. zonale* izlaganih različitim svetlosnim režimima. Dodatni cilj je bio da se utvrdi da li postoji veza

između fotosintetskih asimilata i antioksidativnog i fenolnog metabolizma pri datim uslovima. I na kraju, poslednji zadatak bio je da se ispita da li postoji razlika u odgovoru primarnog i sekundarnog metabolizma oba tkiva listova, između ove dve različite, panaširane vrste, na zadate svetlosne režime.

Indukcija biosinteze sekundarnih metabolita (flavonoidi, fenilpropanoidi, terpenoidi) i antoksidanata (vitamin C, vitamin E, glutation) pod prirodnim UV-B dozama povećava nutritivnu i farmakološku vrednost biljaka i samim tim ima višestruk značaj za poljoprivredu, prehrambenu industriju i farmakologiju. Akumulacija ovih jedinjenja može imati zaštitnu ulogu prema drugim, u osnovi štetnim uticajima spoljne sredine, poput suše, infekcije patogenima i visokih temperatura. Ova unakrsna tolerancija, otpornost prema drugim štetnim faktorima, koja se razvija kod biljaka izlaganih UV-B zračenju ima takođe veliki značaj u poljoprivredi.

2. TEORIJSKI DEO

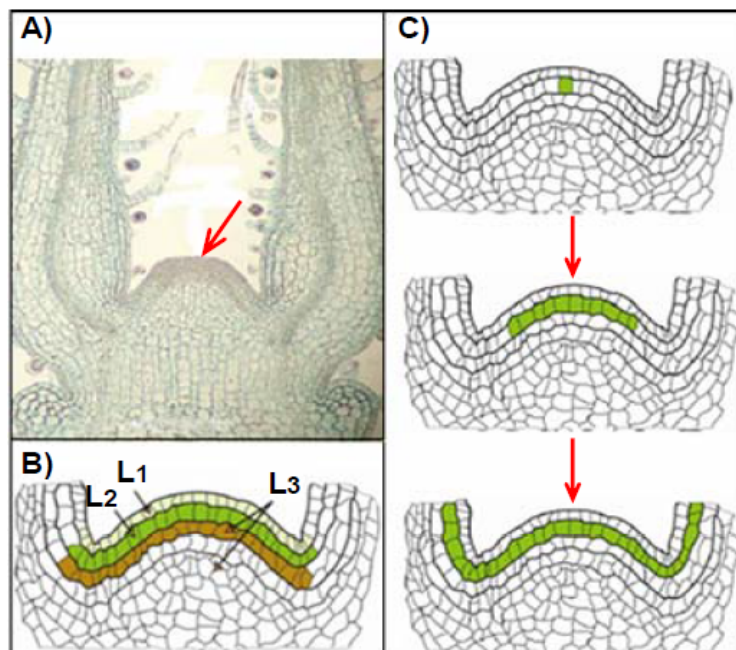
2.1. Panaširane biljke

2.1.1. Definicija panaširanosti i značaj panaširanih biljaka u naučnim istraživanjima

Organizmi čija tkiva sadrže ćelije sa različitim genotipom nazivaju se himerama (Tilney-Bassett 1986; Yu et al. 2007). Tip i genetička stabilnost nastalih himera određena je načinom i učestanošću deoba ćelija, ali i položajem sloja mutiranih ćelija u vrhu, apeksu, izdanka, slika 2.1A. Apikalni meristem izdanka se sastoji od ćelija koje imaju izražen proliferativni kapacitet i od kojih se formiraju sva biljna tkiva (Poething 1989; Grieger 2007). Meristem apikalnog dela izdanka dikotila se sastoji od tri sloja međusobno nezavisnih ćelija: spoljnog L1 sloja, od kog nastaje epidermis svih organa, L2 sloja, koji je osnov za razvoj palisadnog i gornjih slojeva sunderastog mezofila, polnih ćelija reproduktivnih organa i koji formira ivicu listova; i unutrašnjeg L3 sloja, koji formira sunderaste mezofilne slojeve oko centralne vene lista i većinu unutrašnjeg i provodnog tkiva biljaka, ali ne i ćelije koje se nalaze na ivici lista, slika 2.1B (Marcotrigiano & Bernatzky 1995; Ming Yin Li 2005, Charuvi et al. 2012). Mutacija ćelija u jednom od ovih slojeva dovešće do različitog genotipa između slojeva i takva biljka se naziva periklinalnom himerom, slika 2.1C (Tilney-Bassett 1963; Poething 1989).

Panaširane biljke predstavljaju najčešći oblik biljnih himera. Panaširanost listova podrazumeva da na jednom listu postoje različito obojeni segmenti, najčešće zeleni i beli (ili

žuti) (Grieve 1868; Marcotrigiano 1997; Yu et al. 2007; Sakamoto et al. 2009). Čelije mezofilnog sloja zelenih segmenata sadrže normalno razvijene i funkcionalne hloroplaste (Chapman & Camp 1932; Aluru et al. 2006; Yu et al. 2007). S druge strane, mezofilni sloj belih segmenata sadrži plastide koji nemaju hlorofil (nekad ni karotenoidne pigmente), niti organizovane tilakoide (Chapman & Camp 1932; Aphalo & Sánchez, 1986; Vaughn 1987; Aluru et al. 2001, Wetzler et al. 1994; Foudree et al. 2012; Sheue et al. 2012).



Slika 2.1. A) Fotomikrografija vrha izdanka biljke *Plectranthus* na kojoj je pokazan apikalni meristem između dva lista koja se razvijaju. B) Položaj tri različita sloja (L1, L2 i L3) u apikalnom meristemu dikotila. C) Razvoj periklinalne himere započinje mutacijom jedne ćelije u L2 sloju, od koje se antiklinalnim ćelijskim deobama mutacija proširuje na ceo L2 sloj. Modifikovana slika preuzeta iz Simpson (2006) i sa: <http://www.uky.edu/Ag/horticulture/Geneve/teaching/plantpropwebpages/geneticselection/geneticchimera.pdf>.

Postoje različiti tipovi panaširanosti listova, pa su samim tim brojni uzroci njihovih nastanaka. Otkrićem autonomnih genoma u mitohondrijama i hloroplastima i sposobnosti ovih organela da sintetišu proteine kodirane kako sa organelarnih, tako i sa jedarnih gena, šezdesetih-sedamdestih godina prošlog veka započeta su molekularna istraživanja sa panaširanim vrstama koje imaju zeleno-bele ili zeleno-žučkaste listove. Utvrđeno je da su

najčešći uzroci panaširanosti mutacije na jedarnim, mitohondrijalnim ili plastidnim genima (Tilney-Bassett & Almouslem 1989, Yu et al. 2007; Foudree et al. 2012).

Istorijski, panaširane biljke, a posebno muškatica (*Pelargonium zonale*), su imale veliku ulogu u ranim genetskim istraživanjima, tj. u otkriću novog načina nasleđivanja (na primeru nasleđivanja hloroplasta) ne-Mendelovog tipa (poznatijeg i kao materinsko nasleđivanje) (Tilney-Bassett 1975; Birky 1976; Sears 1980; Tilney-Bassett & Almouslem 1989, Yu et al. 2007). Izuzev pomenute uloge, zeleno-belo lišće je poslužilo kao odličan sistem u istraživanjima uticaja fotosintetske aktivnosti na odgovor stoma u istom organu tokom izlaganja nekom abiotskom stresu (Soldatini et al. 1998; Beerling & Woodward 1995, Aphalo & Sánchez 1986). Takođe, ove biljke predstavljaju pogodan model za ispitivanje prirode komunikacija između jedra, s jedne, i citoplazme, hloroplasta i mitohondrija sa druge strane (Wetzler et al. 1994; Rodermeil 2001, Aluru et al. 2001). Panaširano lišće nekih vrsta, među kojima i *P. zonale* je iskorišćeno kao sistem za ispitivanje uticaja disfunkcionalnih hloroplasta na funkciju mitohondrija (Toshoji et al. 2012) i za ispitivanje biogeneze hloroplasta (Foudree et al. 2012). I konačno, u ovoj disertaciji, panaširani listovi su predstavljali odličan model sistem za istraživanje „izvor-uvir“ („source-sink“) interakcija unutar samog lista (Aluru et al. 2007, 2009; Tcherkez et al. 2011), kao i za proučavanje uticaja reaktivnih kiseoničnih vrsta, nastalih u procesu fotosinteze, na antioksidativni sistem u listovima, u celini. „Izvor“ su fotosintetski aktivne, mezofilne ćelije listova koje stvaraju primarne asimilate, dok su „uvir“ ćelije primaoca asimilata koje nisu u stanju da vrše fotosintezu (ćelije belih segmenata listova, koren, delovi stabla koji rastu, vršni pupoljci, mladi listovi, cvetovi, plodovi i semena).

2.1.2. Panaširani *Arabidopsis mutant immutans (im)*

Biljka *Arabidopsis (Arabidopsis thaliana)* je popularni model organizam u biljnoj fiziologiji i genetici. U skladu sa tim, najopsežnija biohemijska i genomska istraživanja zeleno-belih panaširanih listova su rađena upravo sa mutantima panaširanih *Arabidopsis*, slika 2.2. Do sada je identifikovano desetak ovakvih mutanata *Arabidopsis* i to su: *immutans (im)*, *yellow variegated (var2)*, *variegated1 (var1)*, *variegated3 (var3)*, *chloroplast mutator (chm)*, *chloroplastos alterados1 (cla1)*, *pale cress (pac)*, *white cotyledons (wco)*, *thylakoid*

formation1 (thf1), *cab underexpressed (cue1)*, *albomaculans (am)* i *differential development of vascular associated cells (dov)* (Yu et al. 2007).

Najdetaljnija morfološka, citološka, biohemijska i molekularno-genetska istraživanja su sprovedena na mutantu *Arabidopsis immutans (im)* (slika 2.2) od strane tima Stiva Rodermela (Wetzel et al. 1994; Aluru et al. 2001, 2006, 2007, 2009; Rosso et al. 2006; Foudree et al. 2012). Kod *im* mutanta panaširanost je posledica nedostatka IM proteina (terminalne plastohinol-oksidge, PTOX), proteina koji je homolog sa alternativnom oksidgezom iz mitohondrija (Aluru et al. 2007; Foudree et al. 2012). Deficijencija ovog proteina u belim ćelijama vodi do preterane redukcije ('overreduction') plastohinonskog rezervoara u plastidima, što sprečava proces desaturacije fitoena i biosintezu karotenoida koji imaju fotoprotektivnu funkciju. Kao posledica toga, dolazi do fotoksidacije molekula hlorofila i sprečavanja razvoja

hloroplasta (Wetzler et al. 1994; Aluru et al. 2006; Rosso et al. 2006; Foudree et al. 2012). Istraživanja transkriptoma listova *im* mutanta pokazala su da oba tipa tkiva listova ekspimiraju enzime antioksidativnog i flavonoidnog i fenilpropanoidnog metabolizma, i to intenzivnije od zelenih listova običnog, divljeg tipa (*wt*) *Arabidopsis* (Aluru et al. 2009). Takođe, geni odgovorni za aktivnost fotosinteze i povezane procese se ne ekspimiraju u belom tkivu, dok se geni vezani za katabolizam saharoze, transport ugljenih hidrata i mitohondrijski elektron-transportni lanac pojačano ekspimiraju u zelenom tkivu listova *im* mutanata (Aluru et al. 2009).



Slika 2.2. Reprezentativna biljka *immutans* mutant gajen na 22 °C, i osvetljenosti od 5 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ prvih sedam dana, a naredne tri nedelje na 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Slika preuzeta iz Foudree et al. (2012).

2.1.3. Eksperimentalni modeli: panaširana muškatica i tamjanika

U eksperimentalnom delu ove disertacije upotrebljene su biljke sa panaširanim listovima i to muškatica (*Pelargonium zonale*) i tamjanika (*Plectranthus coleoides*). Ove biljke su periklinalne himere čiji listovi imaju belo obojenu marginu koja okružuje zeleni centar, što je ukazuje da je mutacija koja je dovela do deficijencije hloroplasta u ćelijama sloja L2. Tome u prilog svedoči i činjenica da mezofilni slojevi belih delova ne sadrže normalno razvijene

hloroplaste i da epidermis belih delova listova ima genotip identičan zelenim: ćelije zatvaračice stoma imaju razvijene hloroplaste (*Chapman & Camp 1932; Vaughn 1987*). Pošto kod dikotila L2 linija formira polne ćelije, biljka semena ovog varijeteta bi rezultirala potpunim nedostatkom hlorofila, što upućuje na vegetativno razmnožavanje ovih biljaka (*Grieger 2007; Ming-Yin 2005*).

2.1.3.1. Muškatla (*Pelargonium zonale* L.)

Muškatle su raznolika grupa biljaka različitog oblika i staništa. Mogu biti jednogodišnje i višegodišnje, zeljaste i drvenaste, žbunaste i polužbunaste. Listovi su im različitog oblika i veličine. Pripadaju porodici *Geraniaceae*, rodu *Pelargonium* i procenjuje se da broj vrsta iznosi oko 250 (*Bakker et al. 2000; Williams et al. 2000*). Taksonomska klasifikacija varijeteta „Frank Headly“ i „Ben Frenklin“ panaširane muškatle (slika 2.3.A) i varijeteta „variegata“ tamjanike (slika 2.5.A) korišćenih u ovom radu, prikazana je u tabeli 2.1.

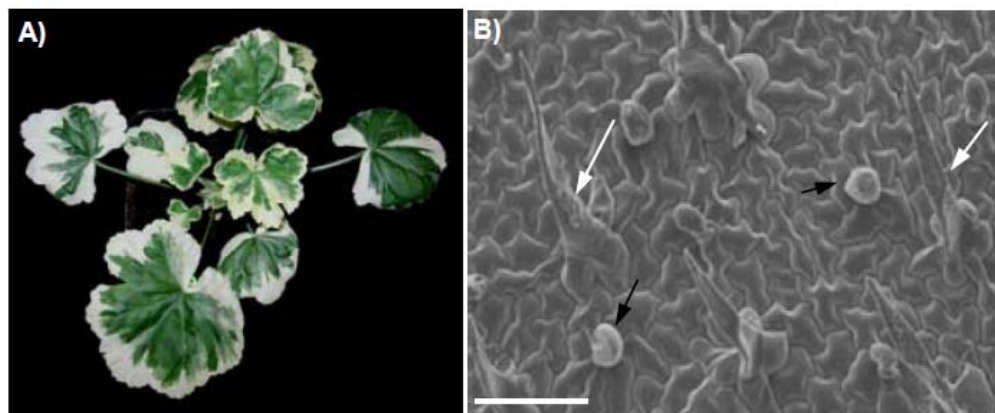
Tabela 2.1. Taksonomska klasifikacija muškatle i tamjanike po rangovima priznatim od *International Code of Botanical Nomenclature*. Glavni taksonomski rangovi su zadebljani.

TAKSONOMSKI RANG		MUŠKATLA	TAMJANIKA	OPIS RANGA
latinski	srpski			
Regnum	carstvo	<i>Plantae</i>	<i>Plantae</i>	biljke
<i>Subregnum</i>	podcarstvo	<i>Tracheophyta</i>	<i>Tracheophyta</i>	vaskularna biljka
<i>Superdivisio</i>	nadrazdeo	<i>Spermatophyta</i>	<i>Spermatophyta</i>	semenice
Divisio	razdeo	<i>Magnoliophyta</i>	<i>Magnoliophyta</i>	skrivenosemenice
Classis*	klasa	<i>Eudicotidae</i>	<i>Eudicotidae</i>	dikotile
<i>Subclassis</i>	podklasa	<i>Rosidae</i>	<i>Asteridae</i>	
Ordo	red	<i>Geraniales</i>	<i>Lamiales</i>	
Familia	familija	<i>Geraniaceae</i>	<i>Lamiaceae (Labiatae)</i>	zdravac/usnatice
Genus	rod	<i>Pelargonium</i> L'Hér.	<i>Plectranthus</i> L'Hér.	
Species	vrsta	<i>P. zonale</i> L.	<i>P. coleoides</i> Benth.	muškatla/tamjanika
<i>Varietas</i>	varijetet	„Frank Headly“, „Ben Frenklin“	„variegata“	

*Nishodno od razdela, klasifikacija je data na osnovu sistema genetskih klada (filogenih grupa) skrivenosemenica (*Angiosperm Phylogeny Group classification, APG II 2003*).

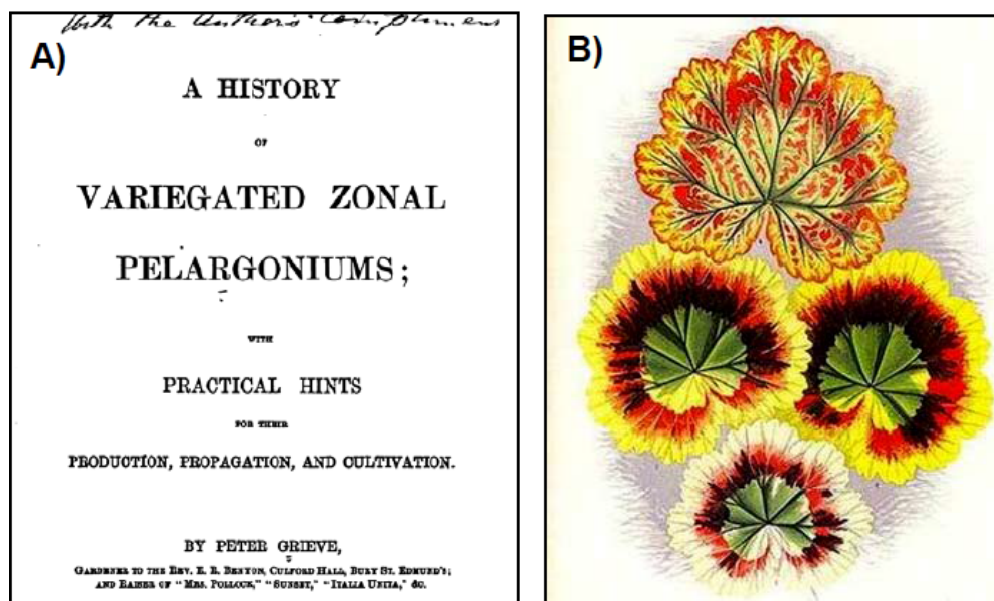
Oba varijeteta muškatile imaju dvobojne okrugle listove, sa nepravilnim belim ivicama i tamno zelenim središtem, slika 2.3.A. Skenirajućom elektronskom mikroskopijom (SEM) uočeno je da gornji epidermis listova prekrivaju gusto postavljene žlezdane i nežlezdane dlačice (trihome), slika 2.3.B. Varijetet „Frank Headley“ je višegodišnja, žbunasta biljka sa narandžasto-roze cvetovima bez jakog mirisa; hibrid koji datira iz 1957. godine (Grieger 2007).

Ime ‘*pelargonium*’ uveo je Johannes Burman 1738. godine od grčke reči ‘*pelagros*’ (πελαργός = rodin kljun) zbog oblika dela cveta. Oko 80% vrsta potiče iz južne Afrike (najviše oko Rta dobre nade), dok je nekoliko vrsta originalno iz Australije, istočne Afrike, Novog Zelanda, Bliskog istoka i sa ostrva Madagaskar, Sveta Helena i Tristan de Kunja (Bakker et al. 2000; Williams et al. 2000). Pretpostavlja se da su donesene u Evropu, u botaničku baštu u Lejdenu oko 1710-1715. godine, brodovima sa Rta dobre nade (Grieve 1868). Oko 1850. godine otpočeto je intenzivno gajenje i stvaranje različitih panaširanih *Pelargonium zonale* hibrida (*Pelargonium* × *Hortorum*), kao ukrasnih i baštenskih vrsta (*hortorum* je genitiv množine latinske reči ‘*hortus*’= bašta). Zbog jakih i raznolikih boja cvetova i listova postaju izuzetno tražene, a sa tim u vezi počinje i ispitivanje uzroka, porekla i nasleđivanja panaširanosti, slika 2.4 (Grieve 1868).



Slika 2.3. Panaširana muškatica, *Pelargonium zonale* L. cv. „Frank Headley“. A) Fotografija jedne od biljaka korišćenih u eksperimentalnom delu rada. B) SEM mikrografija gornjeg epidermisa lista gde se uočavaju epidermalne ćelije, kratke žlezdane trihome (peltate, crne strelice) i nežlezdane trihome (bele strelice). Skala predstavlja 100 μ m, snimano je na 15 kV.

Osim hortikulturnog značaja, muškatle sintetišu sekundarne metabolite koji imaju lekovita svojstva i koja su od davnina upotrebljavana u afričkoj tradicionalnoj medicini (Lalli 2005). Žlezdane trihome na površini listova mnogih vrsta muškatali proizvode terpenoide i aglikone flavonoida, pre svega flavonola (Williams et al. 1997; Saraswathi et al. 2011), dok nežlezdane trahome imaju zaštitnu ulogu (Lis-Balchin 2003).



Slika 2.4. Panaširane muškatle su zbog svojih raznobojnih listova postale omiljeno baštensko cveće polovinom 19. veka. A) Početna strana knjige Pitera Griva: *A history of ornamental foliaged pelargoniums* iz 1868. godine. B) Originalna hromolitografija trobojnih listova panaširanih muškatali (varijeteti: „Aurora borealis“, „Howarth Ashton“, „Peter Grieve“, „Miss Burdett Coutts“, redom) preuzeta iz Hibberd (1870).

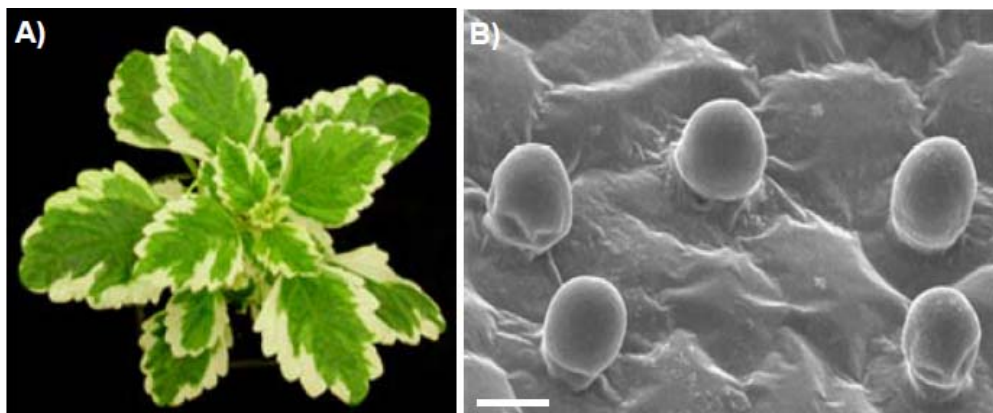
2.1.3.2. Tamjanika (*Plectranthus coleoides* Benth.)

Rod *Plectranthus* L'Hér. se sastoji od oko 300 vrsta koje su poreklom iz južne i istočne Afrike, Madagaskara, Indije i Australije (Codd 1975; Edwards et al. 2000; Marwah et al. 2007; Grayer et al. 2010). Ovaj rod pripada familiji *Lamiaceae* (Usnatica) i podfamiliji *Nepetoideae*. To su žbunaste i polužbunaste aromatične višegodišnje biljke, meko sukulentnih listova, prilagođene životu u sunčanim staništima sa sušnim sezonama (Edwards et al. 2000).

Listovi vrsta *Plectranthus* proizvode brojne mono-, seskvi- i di-terpene i fenolna jedinjenja sa jakim antioksidativnim kapacitetom (rozmarinska kiselina, flavonoli i flavoni),

koje skladište u žlezdama u obliku lisnih dlačica na površini listova (*Ascensão et al.* 1999; *Edwards et al.* 2000; *Abdel-Mogib et al.* 2002; *Porfirio et al.* 2010; *Rojas et al.* 2012). Upravo zbog hemijskog sastava, ove biljke se korise u tradicionalnoj, ali i modernoj medicini i farmaciji (*Abdel-Mogib et al.* 2002; *Ignacimuthu et al.* 2006; *Marwah et al.* 2007; *Grayer et al.* 2010; *Porfirio et al.* 2010).

U eksperimentalnom delu ovog rada upotrebljene su i panaširane *P. coleoides* biljke, varijetet „variegata“ (poznat i pod nazivom švedski bršljen). Ove biljke imaju zadebljane listove, sa zelenim centralnim delom i belom marginom, slika 2.5.A. Na površini listova tamjanika uočavaju se brojne kratke, prave žlezdane dlake sa glavama, sastavljene od jedne ili više ćelija, slika 2.5.B.



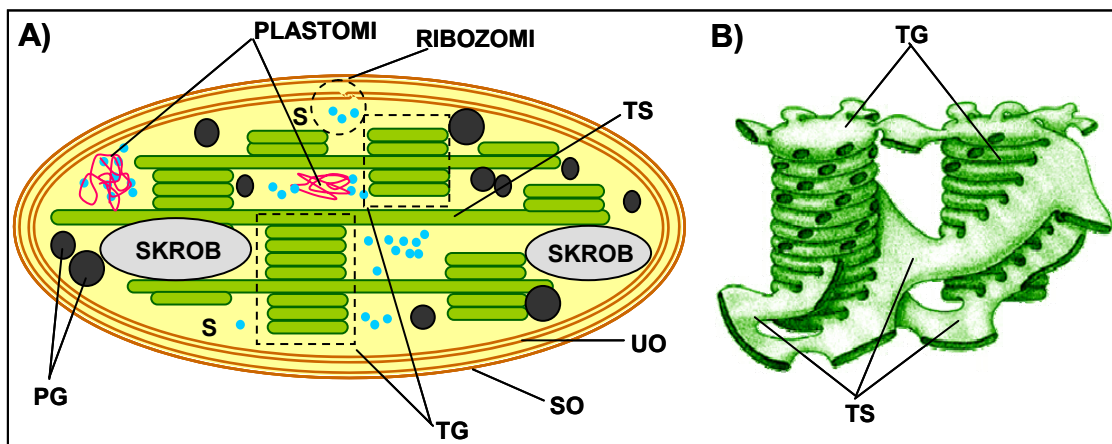
Slika 2.5. Panaširana tamjanika, *Plectranthus coleoides* Benth. A) Fotografija jedne od biljaka upotrebljenih u eksperimentalnom delu rada. B) SEM mikrografija gornjeg epidermisa lista sa epidermalnim ćelijama i kratkim, loptastim žlezdanim trihomama (peltatama). Skala predstavlja 20 μm , snimano je na 15 kV.

2.2. Kratak pregled fotosinteze C₃ biljaka

Fotosinteza obuhvata niz precizno regulisanih reakcija od fotooksidacije vode do asimilacije CO₂ uz korišćenje energije elektromagnetnog zračenja vidljive svetlosti. Cilj ovog poglavlja je da ukaže na osnovne principe kojima fotosintetski aktivne ćelije C₃ biljaka konvertuju svetlosnu energiju u energiju za sintezu, prvenstveno, molekula ugljenih hidrata i da naglasi glavne mehanizme regulacije fotosintetskih procesa u hloroplastima zelenih ćelija listova panaširanih biljaka.

2.2.1. Hloroplasti

U biljkama, fotosinteza se odigrava u hloroplastima. Hloroplasti su plastidi zelene boje, koja potiče od molekula hlorofila. Prisutni su u listovima u ćelijama mezofilnih slojeva (palisadni i sunderasti), ćelijama nezrelih cvetova i plodova, ćelijama stabla zeljastih biljaka, ćelijama zatvaračica stoma, a odsutni u epidermalnim ćelijama. Hloroplasti viših biljaka su okruglastog, sočivastog oblika sa dužom osom oko 5-10 i kraćom oko 2.5 mikrona, slika 2.6.A (Staehelein 2003, Wise 2006).



Slika 2.6. Hloroplasti viših biljaka. A) Shematski prikaz glavnih komponenata hloroplasta. B) dijagram koji ilustruje položaj tilakoida grana (TG) i tilakoida stroma (TS) u prostoru (modifikovano iz Staehelein 2003). PG, plastoglobuli; S, stroma; SO, spoljašnja ovojnica; UO, unutrašnja ovojnica.

Svaki hloroplast je obavijen dvema membranama, unutrašnjom i spoljašnjom ovojnicom, između kojih se nalazi vodeni matriks debljine 10-20 μm (Staehelein 1986; Nešković *et al.* 2003). Ovojnice kontrolišu transport šećernih i lipidnih metabolita, ali i unos

proteina i proteinskih subjedinica sintetisanih u citosolu pomoću hetero-oligomernih membranskih proteinskih kompleksa (*Staehein 2003; Vothknecht & Soll 2007*). Unutrašnjost hloroplasta ispunjava viskozni, polugelasti, vodeni matriks – stroma i kontinualna mreža membranskih struktura – tilakoida, slika 2.6.A (*Wise 2006*). Pod elektronskim mikroskopom se jasno uočavaju dva tipa organizacije tilakoida: tilakoidi grana (jedna na drugu naslagane vrecaste strukture) i tilakoidi stroma (ostali, linearni deo tilakoida koji je u kontaktu sa stromom), slika 2.6.A, B (*Wise 2006*). U tilakoidima grana naspramne membrane su u međusobnom kontaktu. Unutrašnjost tilakoida se naziva lumen. U membrani tilakoida se nalaze pigmentno-proteinski kompleksi koji apsorbuju svetlost, omogućavaju transfer ekscitona do krajnjih primaoca i stvaranje redukcionih ekvivalenata i ATP. U stromi se nalaze enzimi uključeni u redukciju CO₂ (Kalvin-Bensonov ciklus), kiseonika, azota i sintezu aminokiselina, sintezu lipida, metabolizam sumpora, zatim više kopija cirkularne DNK (plastomi) usidrenih u tilakoide, ribozomi, granule skroba i plastoglobuli, slika 2.6.A (*Heldt 2005; Wise 2006*). Plastoglobuli su loptaste, lipoproteinske strukture koje primarno predstavljaju skladište za višak plastohinona-9, tokoferola, karotenoida i drugih lipida koji ne mogu biti smešteni u tilakoidima (*Lichtenthaler 2007; Bréhélin & Kessler 2008*). Pretpostavlja se da su uključeni u metabolizam prenilhinona i karotenoida, i imaju važnu ulogu u održavanju homeostaze tilakoida.

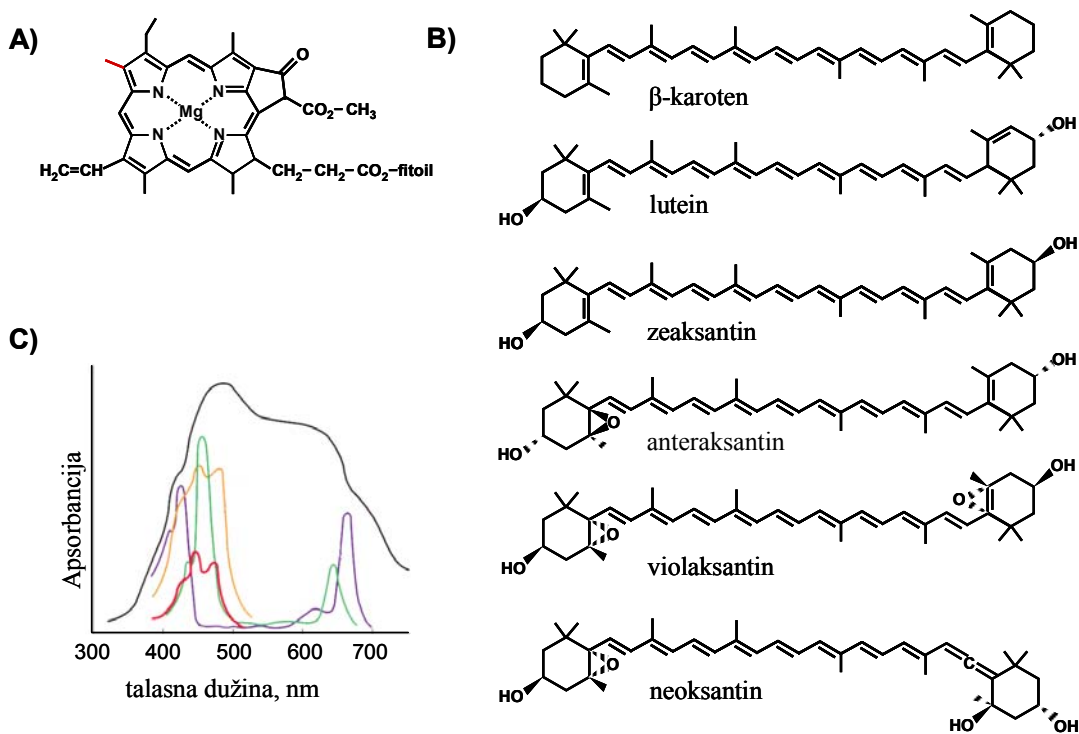
Svetlost ima važnu ulogu u formiranju i oblikovanju tilakoida (stepena razvijenosti, odnosa stroma/grana i količine i sastava fotosintetskih pigmenata), ali i u organizaciji drugih komponenata hloroplasta, kao što su plastoglobuli i skrob (*Staehein 2003; Lichtenthaler 2007; Heyneke et al. 2013*). Smatra se da se na intenzivnoj svetlosti, tokom venjenja i pri oksidativnom stresu povećava broj i zapremina plastoglobula, jer se u njima akumuliraju degradacioni produkti tilakoida i manje količine pigmenata (*Ladygin 2004; Austin et al. 2006; Lichtenthaler 2007; Heyneke et al. 2013*). Svetlost je važan signal, kako za metabolizam hloroplasta, tako i za njihovo pozicioniranje u ćeliji (*Wise 2006*).

Literaturni podaci o ultrastrukturi plastida u belim ćelijama listova panaširanih biljaka nisu konzistentni, već zavise od proučavane vrste (*Evenari 1989; Wetzler et al. 1994; Chen et al. 1999; Wang et al. 2000*). U belim delovima panaširanih mutanta *Arabidopsis*, plastidi su nalik amiloplastima koji ne sadrže skrobne granule, nemaju organizovane lamelarne strukture i nemaju fotosintetske pigmente, a uočavaju se manji plastoglobuli i vakuolarna tela (*Wetzler*

et al. 1994; *Aluru et al.* 2001). U žutim segmentima listova panaširanog duvana plastidi se odlikuju vezikularnim, umesto lamelarnim strukturama, nema plastoglobula, ni skrobnih granula (*Wang et al.* 2000). U svim „albino“ plastidima pokazana je niža ekspresija gena odgovornih za fotosintetsku aktivnost (*Wetzler et al.* 1994; *Aluru et al.* 2009).

2.2.2. Apsorpcija, prenos i hvatanje svetlosti i prenos elektrona

U višim biljkama proces fotosinteze pokreće svetlost vidljivog dela spektra (VIS), od 400-700 nm, koja se naziva i fotosintetski aktivno zračenje (PAR). Proces apsorpcije, transfera i hvatanja svetlosne energije se dešava u tilakoidnim membranama u okviru dve odvojene jedinice, fotosistema I (PS I) i fotosistema II (PS II) (*Nešković et al.* 2003; *Baker et al.* 2007). Fotosistemi sadrže osnovne fotosintetske jedinice: komplekse za sakupljanje svetlosti (*'light harvesting complex'*, LHC), reakcione centre i primarne akceptore elektrona. Kompleksi za sakupljanje svetlosti se sastoje iz polipeptidnih subjedinica, lipida i fotosintetskih pigmenata: hlorofila (*hl*) *a* i *b*, β -karotena i ksantofila (luteina, neoksantina, violaksantina, anteroksantina i zeaksantina), slika 2.7.A, B. Ilustracije radi, svaka od tri peptidne subjedinice LHC II sadrži 14 molekula *hl a* i *b* i četiri molekula ksantofila: luteina, neoksantina i violaksantina, koji su precizno orjentisani u tilakoidnoj membrani, na rastojanjima manjim od 6 nm (*Standfuss et al.* 2005). Hlorofili apsorbuju plavu i crvenu svetlost, a karotenoidi žutu i narandžastu, slika 2.7.C. Ksantofili predstavljaju zaštitne i periferne antena pigmente koji okružuju hlorofile reakcionih centara, dok su molekuli β -karotena postavljeni u središtu uz reakcione centre (*Demmig-Adams et al.* 1996). Vezivanjem za transmembranske proteine iz kompleksa za sakupljanje svetlosti postiže se precizna orijentacija molekula pigmenata u tilakoidnim membranama (*Heldt* 2005).



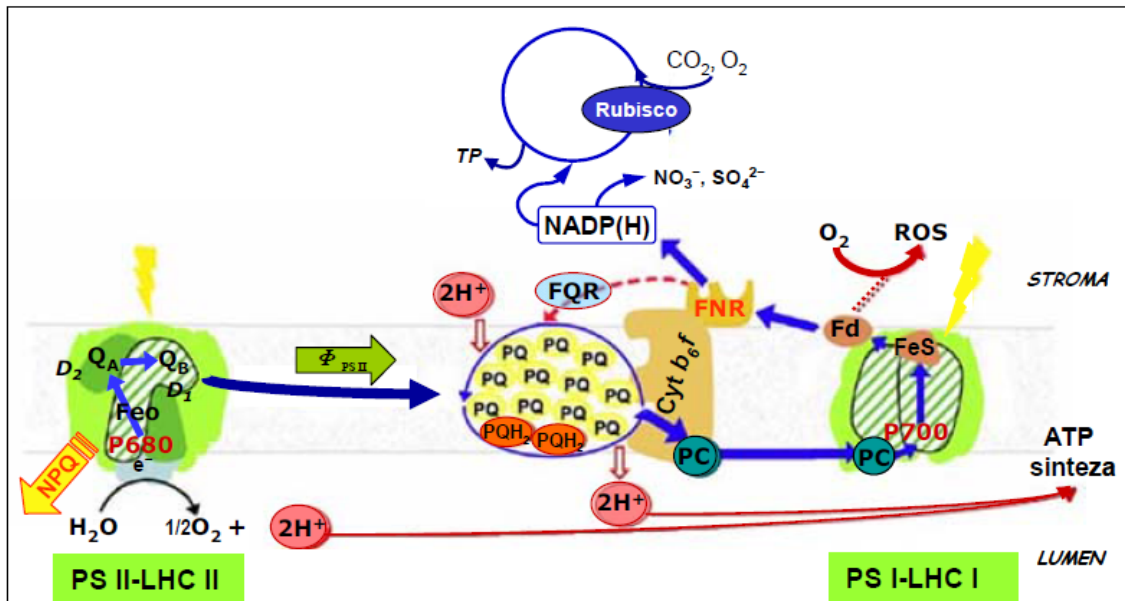
Slika 2.7. A) Struktura molekula hlorofila *a* (crvenim je označena metil grupa koja je kod hlorofila *b* zamenjena formil grupom). B) Struktura molekula β -karotena i ksantofila. C) Apsorpcija sunčeve svetlosti od strane fotosintetskih pigmentata: crno, spektar sunčeve svetlosti koja dopire do površine Zemlje; zeleno, hlorofil *b*; lila, hlorofil *a*; narandžasto, β -karoten; crveno, lutein. Prerađena slika iz: Nelson & Cox (2005).

Kada molekuli perifernih antena pigmenta apsorbuju fotone, ekscituju se, a zatim rezonantnim transferom predaju ekcituranu energiju susednim molekulima (Nobel 2005; Foyer *et al.* 2012). Za efikasan proces prenosa ekscitirane energije (ekscitona) neophodno je da molekuli pigmentata budu pravilno orjentisani u tilakoidnoj membrani i na odgovarajućim rastojanjima (Heldt 2005; Nobel 2005; Standfuss *et al.* 2005). Pobuđivanjem, molekuli *hl* prelaze u jedno od dva singletna stanja, $^1hl^*$, i u tom obliku se ekscitoni prenose (Niyogi 2000; Foyer *et al.* 2012). Transfer energije započinje od pigmentata koji apsorbuju svetlost manje talasne dužine (veće energije) ka onima koji apsorbuju svetlost veće talasne dužine (manje energije), sve do molekula *hl a* koji predstavlja reakcioni centar, pri čemu se deo energije oslobađa kao toplota (Cheng & Fleming 2009). Pod optimalnim uslovima više od 95% apsorbivane svetlosti se prenese do reakcionih centara (Nobel 2005; Cheng & Fleming 2009). Usporavajući korak predstavlja prenos ekscitovane energije sa molekula karotenoida na molekul *hl* (van Grondelle *et al.* 1994).

„Zarobljavanje“ energije svjetlosti je fotohemijski proces koji se dešava u molekulima *hl* reakcionih centara oba fotosistema i podrazumeva razdvajanje naelektrisanja, odnosno prelazak ekscitovanog elektrona na susedni akceptor, dok u hl^+ njegovo mesto popunjava elektron susednog donora (Heldt 2005; Nobel 2005; Baker et al. 2007). Reakcione centre u oba fotosistema čine dimeri hlorofila *a*, ($hl\ a$)₂; u PS I ovaj dimer ima apsorpcioni pik na 700 nm (P700), a u PS II na 680 nm (P680) (Heldt 2005). U slučaju reakcionog centra P680 primarni donor elektrona je molekul vode, a primarni akceptor je feofitin, dok je u slučaju P700 donor elektrona citohrom *b₆f*, a akceptor je *A₀* (monomer *hl a*), slika 2.8. Efikasnost kojom se dešava razdvajanje naelektrisanja u P680* i P700* na datom PAR, odnosno udeo kvanta apsorbovane svetlosti koji dovodi do redukovanja primarnog akceptora elektrona naziva se radna efikasnost PS II, $\Phi_{PS\ II}$ (Baker et al. 2007; Baker 2008).

Sa ekscitiranog P680* elektron prelazi na feofitin, a njegovo mesto popunjavaju elektroni otpušteni pri razlaganju molekula vode (stromalna strana tilakoida), slika 2.8 (Baker et al. 2007). Elektroni sa feofitina prelaze na plastohinon (PQ) *Q_A* koji je fiksiran u PS II, a zatim na plastohinonski molekul *Q_B*, koji biva redukovan do plastohinola (PQH₂), koji napušta PS II. Sa PQ rezervoara u tilakoidnim membranama, elektroni prelaze na kompleks citohtoma *b₆/f* (cyt *b₆f*) i plastocijanina (PC) sa lumenske strane tilakoida, slika 2.8 (Dietz & Pfannschmidt 2011; McDonald et al. 2011). Ovi prenosioci elektrona formiraju fotosintetski elektron-transportni lanac (ETL). Ekscitirani reakcioni centar P700* predaje elektrone susednom akceptoru *A₀*, a zatim transfer ide preko filohinona (*A₁*), tri Fe-S klastera: *F_x*, *F_A* i *F_B*, na feredoksin (Fd) na stromalnoj strani tilakoida i konačno, pomoću feredoksin-NADP⁺-oksidoreduktaze (FNR) NADP⁺ se redukuje, slika 2.8 (Nelson & Cox 2005; Dietz & Pfannschmidt 2011). Ekscitirani reakcioni centar P700⁺ nadoknađuje izgubljeni elektron sa PC. Plastohinoni, PC i Fd su solubilni prenosioci elektrona, koji se slobodno kreću kroz tilakoidnu membranu (Heldt 2005; McDonald et al. 2011). Ukupan rezultat linearnog elektronskog transfera (od vode na PS II, preko cyt *b₆f*, PS I do Fd) je stvaranje reduktivnih ekvivalenta, NADPH, i ATP (Baker et al. 2007; Foyer et al. 2012). ATP nastaje pomoću ATP-sintaze, na sličan način kao i u mitohondrijama, na račun proton-motorne sile. Proton-motornu silu čini razlika u transtilakoidnom potencijalu i ΔpH , koja nastaje redukovanjem PQ elektronima poreklom sa molekula vode na stromalnoj strani membrane tilakoida, i zatim

oksidovanjem PQH_2 na lumenskoj strani tilakoida pri čemu se protoni otpuštaju u lumen, slika 2.8.



Slika 2.8. Uprošćena shema fotosintetskog elektronskog transporta pod optimalnim uslovima za rast biljke. Pod optimalnim uslovima, plastohinonski rezervoar je uglavnom oksidovan, $[PQ] > [PQH_2]$, pošto je brzina potrošnje elektrona (redukcija CO_2 , NO_3^- i SO_4^{2-} , i fotorespiracija) veća u odnosu na brzinu razdvajanja naelektrisanja na P680*. Dominantan je linearni elektronski tok (debele plave strelice), odnosno transfer elektrona od PS II (razlaganje molekula vode) do PS I (stvaranje NADPH) i kvantna efikasnost PS II ($\Phi_{PS II}$) je maksimalna (zelena strelica). Međutim, čak i pod optimalnim uslovima, sistemi za zaštitu fotosinteze, nefotohemijско gašenje (NPQ) na PS II (zavisno od ΔpH i ksantofila; žuta strelica) i cikličan elektronski tok oko PS I (isprekidana crvena strelica) su aktivni. Čak 10% elektrona iz linearnog puta odlazi na fotoredukciju kiseonika na PS I (nastanak reaktivnih kiseoničnih vrsta, ROS; crvena strelica). LHC, kompleks za sakupljanje svetlosti; Q_A i Q_B , primarni plastohinonski akceptori na PS II; $cyt\ b_6/f$, citohrom b_6/f kompleks; PC, plastocijanini; Fd, feredoksin; FNR, feredoksin-NADP⁺-oksidoreduktaza; FQR, feredoksin-plastohinon-oksidoreduktaza; TP, triozofosfati. Shema je crtana prema *McDonald et al.* 2011.

Alternativno, elektroni sa PS I mogu da se vrte na PQ pomoću enzima feredoksin-plastohinon-oksidoreduktaze (FQR) ili preko hloroplastne NADPH zavisne dehidrogenaze NDH, slike 2.8 i 2.9 (*McDonald et al.* 2011). Ovakav tok elektrona se naziva ciklični elektronski tok oko PS I, u kom se održava razlika u pH, ali ne nastaje NADPH (*Baker et al.* 2007; *Rumeau et al.* 2007). Ciklični elektronski tok je značajan za regulisanje ATP/NADPH odnosa u hloroplastima (*Niyogi* 2000; *Baker et al.* 2007; *Foyer et al.* 2012; *Hüner et al.* 2012). Pseudociklični transport elektrona podrazumeva prelaz elektrona sa PS I na molekularni kiseonik, umesto na NADP⁺, pri čemu nastaju reaktivne kiseonične vrste, slika 2.8. Ova reakcija se naziva i Melerova (*Mehler*) reakcija i biće detaljnije objašnjena u poglavlju 2.3.2.1.

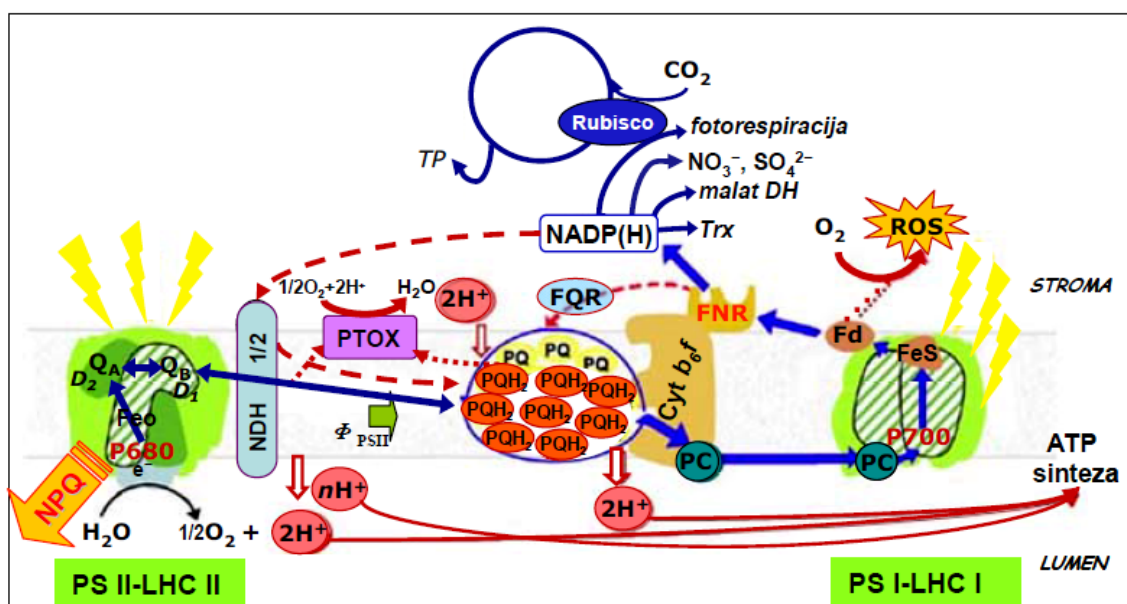
Fluks elektrona kroz linearni ili ciklični transport je određen efikasnošću cyt b₆f kompleksa da oksiduje PQH₂ (Heldt 2005; Foyer et al. 2012). Optimalni pH za redukciju cyt b₆f kompleksa je 6.5-7.2, tako da pad pH lumena dovodi do usporavanja elektronskog transfera. Prostorna razdvojenost i autonomnost PS I i PS II u apsorbovanju fotona i prenosu elektrona takođe doprinosi da se u određenim uslovima promeni odnos njihovog učešća u transferu elektrona. Fotosistem II sa pridruženim LHC II i cyt b₆f se dominantno nalaze u tilakoidima grana, u membranama koje naležu jedna na drugu, dok su PS I i ATP sintaza uglavnom locirani na tilakoidima strome, ili po obodu tilakoida grana u kontaktu sa stromom (Heldt 2005; Nelson & Cox 2005). Ova razdvojenost onemogućava nekontrolisano prelivanje ekscitona sa PS II na PS I (reakcionom centru PS I je potrebna niža energija za ekscitaciju nego PS II). Redukcija PQ do PQH₂ je najsporiji proces u elektronskom transportu, jer zavisi od brzine njihove difuzije kroz tilakoidnu membranu. Zato je odnos [PQ]/ [PQH₂] idealan kao senzor za nebalansiranu ekscitaciju PS II i PS I i kao signal koji kontroliše aktiviranje genske ekspresije (Dietz & Pfannschmidt 2011; McDonald et al. 2011).

2.2.3. Regulacija fotosintetskog transporta elektrona

U situacijama kada je biljka izložena nekom spoljnom stresoru, kao što su suša, visok intenzitet PAR, niske i visoke temperature ili nedostatak nutrijenata, apsorbuje se više energije nego što fotosintetski metabolizam može produktivno da iskoristi i nastaje visok ekscitacioni pritisak (Ort 2001; Baker et al. 2007; Baker 2008; McDonald et al. 2011). Ukoliko se višak ekscitacione energije ne bi kontrolisao i regulisao, prenosioci elektrona bi bili uglavnom redukovani, što bi izazvalo ozbiljna oštećenja fotosintetskog aparata (Niyogi 2000; Foyer & Noctor 2000; Mullineaux & Karpinski 2002; Rumeau et al. 2007; Foyer et al. 2012). Čak i pod normalnim, optimalnim uslovima, fotosintetski aparat bi se brzo inaktivirao bez adekvatnih sistema zaštite, slika 2.9. U skladu sa tim neki sistemi zaštite su konstitutivni, a neki inducibilni. U ovom poglavlju biće pomenuti neki od njih, dok će oni koji uključuju nastanak reaktivnih kiseoničnih vrsta biti pomenuti u poglavlju 2.3.2.1.

U konstitutivnu zaštitu od viška ekscitovane energije spada rasipanje preko tripletnog hlorofila (Niyogi 2000; Mullineaux & Karpinski 2002). Naime, apsorpcija viška fotona može

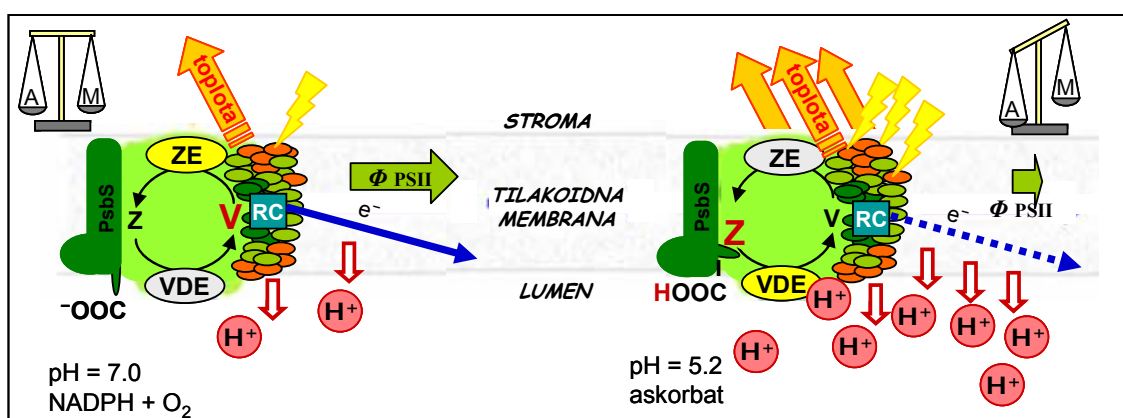
da izazove akumulaciju ekscitacione energije u pigmentima u LHC II i da na taj nači produži životni vek $^1P680^*$, pri čemu raste mogućnost da se konvertuje u tripletno stanje, $^3P680^*$ (Niyogi 2000). Tripletni oblik hlorofila u reakcionom centru nije u stanju da započne transfer elektrona. Energija sa $^3P680^*$ se prenosi na karotenoide koji ga okružuju i koji su u stanju da je otpuste kao toplotu. Utvrđeno je da se 4-25% apsorbovanih fotona rasipa preko tripletnog ventila (Niyogi 2000). Tripletni hlorofil sam po sebi nije opasan, ali predstavlja opasnost po fotosintetski aparat, jer u interakciji sa kiseonikom stvara singletni kiseonik, koji je visoko reaktivan (Hideg et al. 1994; Asada 2006; Krieger-Liszkay et al. 2008; videti pododeljak 2.3.2.1).



Slika 2.9. Uprošćena shema fotosintetskog transporta elektrona pri uslovima povišenog ekscitacionog pritiska. U ovakvoj situaciji, plastohinonski rezervoar je uglavnom redukovan, $[PQH_2] > [PQ]$, jer je akceptorska strana PS I ograničena, pa se elektroni se vraćaju na Q_A i opada kvantna efikasnost PS II ($\Phi_{PS II}$) (zeleno strelica). Višak elektrona biva značajno preusmeren sa linearnog (plave pune strelice), na ciklični transport oko PS I uz učešće PTOX i hloroplastne NAD(P)H-dehidrogenaze (NDH, isprekidane crvene strelice). Pojačani su putevi alternativnih potrošača elektrona: fotorespiracija, malatni ventil, tireodoksin (Trx) i redukcija kiseonika u okviru PS I (Melerova reakcija koju prati značajna akumulacija ROS) i PTOX (hlororespiracija) – tačkaste crvene strelice. Ciklični elektronski tok doprinosi sniženju pH lumena, pa se pojačava termalno rasipanje na PS II (NPQ, žuta strelica). Ukoliko je PS II preterano ekscitiran, nastaje singletni kiseonik i dolazi do stvaranja oštećenja na D1 subjedinici PS II. U isto vreme ROS stvorene na PS I oštećuju komponente reakcionog centra PS I. Skraćenice kao i na slici 2.8.

Odnos ATP/NADPH ima značajnu ulogu u aktivaciji i regulaciji fotosinteze tokom brzih, dnevnih variranja intenziteta svetlosti i dostupnosti CO_2 u toku dana, i u aklimatizaciji na stresne uslove (Baker 2008; Foyer et al. 2012). Na ovaj odnos značajno utiču

fotorespiracija, fiksiranje azota, metabolizam mitohondrija i ostali alternativni potrošači elektrona, redukcija SO_4^{2-} i SO_3^{2-} , malatni ventil, ciklični i pseudociklični elektronski transfer (Niyogi 2000; Mullineaux & Karpinski 2002; Foyer et al. 2012). Ciklični elektron-transport umanjuje udeo Melerove reakcije na PS I i značajno snižava pH lumena tilakoida, što predstavlja signal za supresiju linearnog elektronskog transporta i aktiviranje nefotohemijskog gašenja fluorescencije hlorofila (NPQ) i zaštite PS II od stvaranja singletnog kiseonika, slika 2.9 (Demmig-Adams et al. 1996; Niyogi 2000; Ort 2001; Standfuss et al. 2005). Zakišeljavanje lumena aktivira violaksantin-deepoksidazu (VDE), enzim sa lumenske strane tilakoida koji katalizuje pretvaranje violaksantina u zeaksantin kroz tzv. ksantofilski ciklus, slika 2.10.



Slika 2.10. Uprošćena shema nefotohemijskog gašenja (NPQ) (zavisnog od ΔpH i ksantofilskog ciklusa) na PS II pod niskim i visokim ekscitacionim pritiskom. Kada su uslovi optimalni, odnosno apsorpcija svetlosti (A) od strane pigmentata sa LHC II kompleksa i razdvajanje naelektrisanja na reakcionom centru (RC) manja od ukupne potrošnje elektrona ekscitacioni pritisak je nizak. Tad je ΔpH između strome i lumena tilakoida niska, violaksantin-deepoksidaza (VDE) je neaktivna, dominantan je linearni elektronski tok (plave strelice), $\Phi_{\text{PS II}}$ je visok (zeleno), a NPQ je nisko. Zeaksantin-epoksidaza (ZE) je aktivna i violaksantin (V) je dominantan ksantofil. Kada antena pigmenti apsorbuju višak svetlosti, pH lumena postaje nizak, ZE se inaktivira, a VDE aktivira, karboksilna grupa na lumenskoj strani PsbP subjedinice PS II je protonovana i dominantni ksantofil je zeaksantin. NPQ je značajno, linearni elektronski tok je oslabljen i $\Phi_{\text{PS II}}$ je nizak. M, metabolička potrošnja.

Optimalni pH enzima VDE je 5.2, a ulogu reduktanta ima askorbat (Asc) (Rockholm & Yamamoto 1996). S druge strane, na pH 5 karboksilna grupa PsbS, proteinske subjedinice PS II, je u protonovanom obliku, što uzrokuje konformacionu promenu koja omogućava interakciju sa nastalim zeaksantinom i nefotohemijšku de-ekscitaciju $^1hl^*$, odnosno rast NPQ (Demmig-Adams et al. 1996; Gilmore 1997; Niyogi 2000, Ort 2001; Mullineaux & Karpinski 2002; Baker 2008; Heber 2012). Konverzija violaksantina u zeaksantin (koji je nepolarniji)

omogućava jače vezivanje za proteinsku subjedinicu, a prisustvo 11 konjugovanih dvostrukih veza (u odnosu na 9 u slučaju violaksantina) čini da zeaksantin može da primi eksciton od $^1hl^*$ bilo koje orijentacije, za razliku od violaksantina kojem je za to neophodno prisustvo blisko postavljenog *hl*, koplanarnog π -sistema (Standfuss et al. 2005). Proces NPQ je reverzibilan, i čim se razlika pH smanji, VDE je inaktivirana, a zeaksantin-epoksidaza na stromalnoj strani uz prisustvo NADPH i kiseonika vraća zeaksantin u violaksantin (Demmig-Adams et al. 1996a,b; Baker 2008). Koliko je ovaj način zaštite fotosinteze od visokog ekscitacionog pritiska bitan, svedoči i činjenica da 10-40% totalnih karotenoida u listovima čine ksantofili koji učestvuju u NPQ (Rockholm & Yamamoto 1996).

Strategije rasipanja viška apsorbovane svetlosne energije u vidu toplote mogu da umanje do 50% apsorbovanih fotona (Asada 2000). U slučajevima kada ni to nije dovoljno, postaje važno aktiviranje alternativnih potrošača ('sink') elektrona, slika 2.9. Naime, elektroni iz linearnog elektronskog toka prvenstveno su „namenjeni“ procesima asimilacije (redukcije) CO₂, a zatim i redukciji azota i sumpora u hloroplastima (Niyogi 2000; Dietz & Pfannschmidt 2011; Foyer et al. 2012). Kada su ovi procesi ograničeni (posebno dostupnost CO₂), čak i uz aktivno termalno rasipanje u PS II stvara se višak elektrona (Baker 2008). Upošljavanje alternativnih potrošača i akceptora elektrona sprečava prekomernu redukciju molekula PQ. Najefikasniji alternativni potrošači elektrona su fotorespiracija i pseudociklični elektronski transport (Asada 2000; odeljak 2.2.5 i pododeljak 2.3.2.1). Značajan potrošač reduktanata iz linearnog elektronskog toka je malat-dehidrogenaza, odnosno NADPH-zavisna redukcija oksalacetata do malata, tzv. malatni ventil (slika 2.9), koja se odvija u hloroplastima, a nastali malat se „izvozi“ u citosol, gde se može re-oksidovati u oksalacetat (Niyogi 2000, Foyer & Shigeoka 2011). Malatni ventil u optimalnim uslovima troši oko 5% elektrona iz ETL (Foyer et al. 2012). Tireodoksini (Trx), familija malih proteina sa sekvencom Cys-Gly-Pro-Cys i mogućnosti formiranja disulfidne veze, takođe predstavljaju alternativne akceptore elektrona (Baier & Dietz 2005). Učestvuju u redoks-regulaciji više enzima u stromi hloroplasta, među njima i prethodno pomenute malat-dehidrogenaze (Heldt 2005; Foyer et al. 2012).

Hlororespiracija predstavlja još jedan način usmeravanja elektrona na molekulski kiseonik u tilakoidima stroma. Podrazumeva transport elektrona sa PS I preko NAD(P)H na PQ pomoću NDH, a zatim oksidaciju PQH₂ i redukciju O₂ do H₂O pomoću PTOX, slika 2.9 (Rumeau et al. 2007; McDonald et al. 2011; Foyer et al. 2012). Ovaj mehanizam ispitivan je

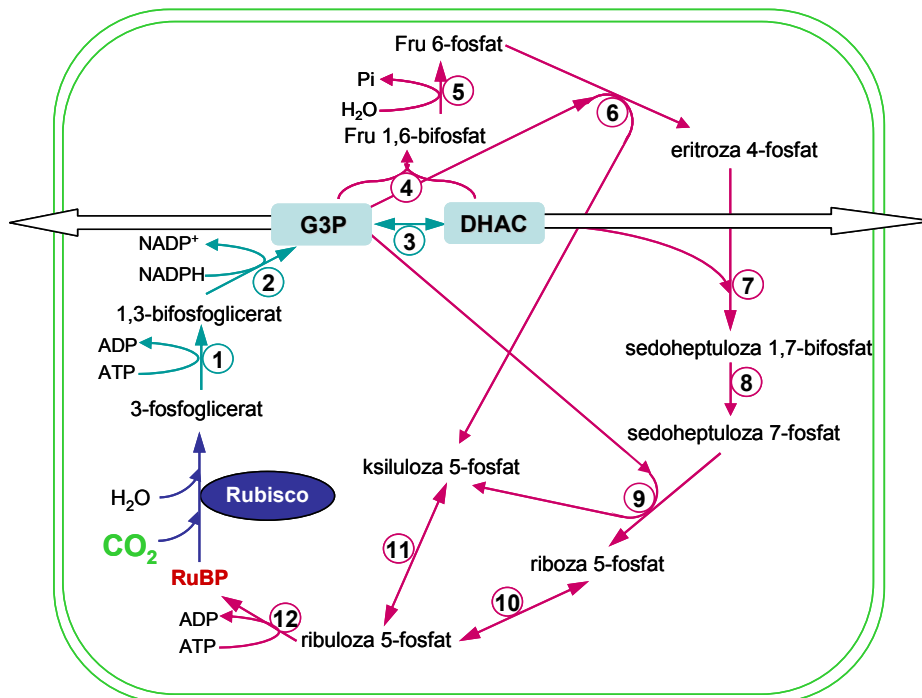
na panaširanim *im* mutantima Arabidopsisa. Kao što je u poglavlju 2.1.2. pomenuto, u belom tkivu listova *im* mutanta dolazi do prekomerne redukcije PQ prenosioca usled nedostatka ovog mehanizma zaštite. Uočeno je da PTOX premošćava stanja kada je dostupnost akceptora PS I ograničena i relaksira PS II kroz oksidaciju PQH₂, slika 2.9 (McDonald *et al.* 2011; Hüner *et al.* 2012).

U zaključku, u optimalnim uslovima brzina razdvajanja naelektrisanja na P700* i redukovanja molekula PQ je u ravnoteži sa brzinom oksidovanja PQH₂ kroz redukciju CO₂ (Kalvin-Bensonov ciklus), azota i sumpora, slika 2.8. Kada se ravnoteža poremeti (bilo usled preterane apsorpcije svetlosti – visok PAR, ili usled usporene redukcije CO₂ – ograničena dostupnost CO₂, npr. usled zatvorenosti stoma, ili usporeni biohemijski procesi, dolazi do pojačanog ekscitacionog pritiska. Tada zaštitni mehanizmi termalno rasipaju višak ekscitirane energije (tripletni ventil, NPQ) ili stimulišu alternativne potrošače elektrona (fotorespiracija, pseudociklični elektron transport na PS I, hlororespiracija, malatni ventil, tireodoksin), slike 2.9 i 2.10.

2.2.4. Asimilacija CO₂ – Kalvin-Bensonov ciklus

Hemijska energija, u obliku ATP i NADPH nastalih nakon apsorpcije svetlosti i transporta elektrona kroz ETL prvenstveno se koristi za asimilaciju CO₂ i nastanak trio- i pentozofosfata u stromi hloroplasta u Kalvin-Bensonovom ciklusu. Ovaj ciklus podrazumeva tri faze: fiksiranje CO₂, redukciju 3-fosfoglicerata i regeneraciju ribulozo-1,5-bifosfata (RuBP), slika 2.11 (Nešković *et al.* 2003; Nelson & Cox 2005). U prvoj fazi, reakciju vezivanja CO₂ za RuBP i nastanak dva molekula 3-fosfoglicerata katalizuje RuBP karboksilaza/oksigenaza (Rubisco). Enzim Rubisco se sastoji iz osam većih, katalitičkih subjedinica koje kodiraju geni na plastomu i osam manjih subjedinica koje su kodirane genomom (Heldt 2005; Nelson & Cox 2005). U aktivnom mestu krucijalan je Lys²⁰¹ ostatak. Da bi enzim bio aktivan ε-NH₃⁺ grupa Lys mora biti karbamoilovana. Za nju je koordinativno vezan Mg²⁺, koji orjentiše supstrate u pravilnu poziciju i polarizuje CO₂, pripremajući ga tako za nukleofilni napad sa intermedijera nastalog od RuBP. Brzina karboksilacije Rubisco je jako mala (samo tri molekula CO₂ se vezuju za RuBP u sekundi), te je zato ovaj ključan enzim veoma zastupljen u stromi (čak do 50% rastvornih proteina listova otpada na njega) (Heldt 2005). Druga faza Kalvin-Bensonovog ciklusa podrazumeva fosforilaciju 3-fosfoglicerata

najpre do 1,3-bifosfoglicerata uz utrošak ATP, a zatim redukciju do gliceraldehid-3-fosfata (G3P) pomoću G3P dehidrogenaze (NADPH je specifičan za stromalnu izoformu, dok citosolna izoforma može da koristi i NADH), slika 2.11. Triozo-fosfat-izomeraza pretvara G3P u dihidroksi-aceton (DHAC); DHAC i G3P su u ravnoteži (96% je u formi DHAC, a 4% u G3P). Oba triozo-fosfata (TP), i G3P i DHA, mogu da se transportuju iz hloroplasta preko TP-fosfatnog antiportera. Treća faza Kalvin-Bensonovog ciklusa podrazumeva seriju reakcija kondenzacija, počevši od G3P i DHAC, kojima se regeneriše RuBP uz utrošak ATP molekula, slika 2.11.



Slika 2.11. Shema Kalvin-Bensonovog ciklusa u stromi hloroplasta. Faza fiksiranja CO₂ prikazana je strelicama tamno-plave boje, faza redukcije 3-fosfoglicerata strelicama tirkizne boje, a strelicama ružičaste boje prikazana je faza regeneracije ribulozo-1,5-bifosfata (RuBP), reduktivni pentozofosfatni put. Enzimi: (1) 3-fosfoglicerat kinaza; (2) gliceraldehid-3-fosfat-dehidrogenaza; (3) triozo-fosfat izomeraza; (4) transaldolaza; (5) Fru-1,6-bifosfat-fosfataza; (6) transketolaza; (7) transaldolaza; (8) sedoheptulozo-1,7-bifosfat-fosfataza; (10) ribozo-5-fosfat-izomeraza; (11) ribulozo-5-fosfat-epimeraza; i (12) ribulozo-5-fosfat-kinaza. G3P, gliceraldehid-3-fosfat; DHAC, dihidroksi-aceton; Rubisco, RuBP karboksilaza/oksigenaza.

Reakcije u kojima učestvuju aldolaze, ketolaze i fosfataze nazivaju se reduktivni pentozofosfatni put. Početnom reakcijom između G3P i DHAC, pomoću transaldolaze, nastaje fruktoza-1,6-bifosfat (Fru-1,6-bifosfat), ključni intermedijer koji predstavlja raskršće puteva sinteze saharoze u citosolu (transportni oblik ugljenih hidrata) ili skroba (u stromi) i procesa regeneracije RuBP. Iz Fru-1,6-bifosfata pomoću Fru-1,6-bifosfataze nastaje Fru-6-fosfat

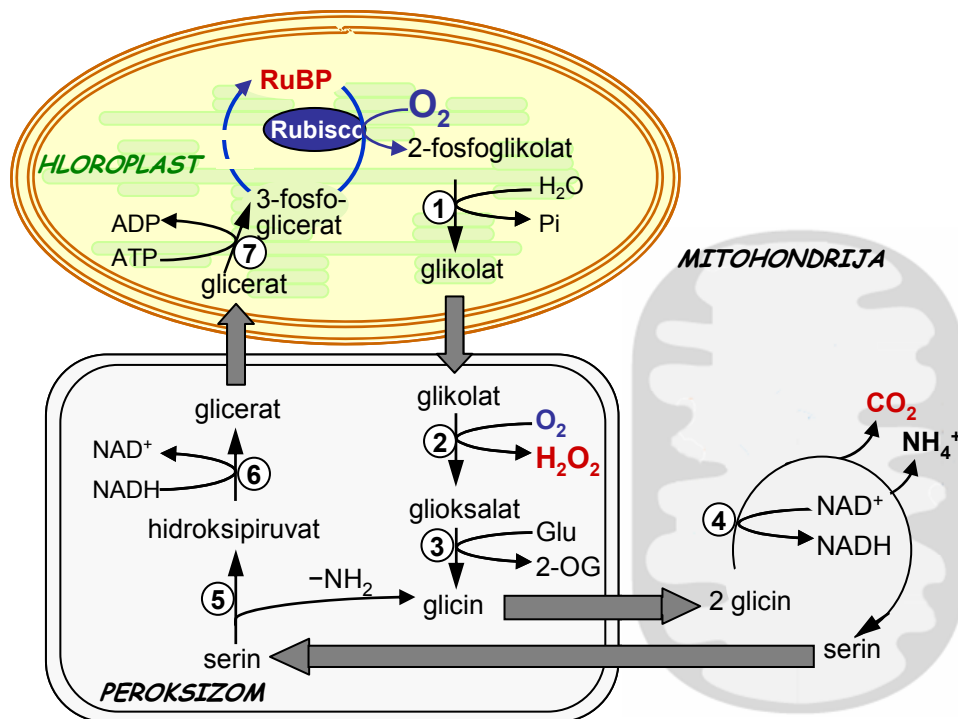
(ireverzibilno), a kombinacijom sa G3P nastaje eritroza-4-fosfat, važan prekursor za šikimatni put, uvod u biosintetski put fenolnih jedinjenja (pododeljak 2.4.2.4). Finalno, kroz sve tri faze iz tri molekula CO₂ i tri molekula RuBP nastaje šest molekula G3P, od kojih se pet troši na regeneraciju RuBP, a neto rezultat je jedan molekul G3P, uz utrošak od devet molekula ATP i šest NADPH (ATP/NADPH=1.5). Kako se u fotosintetskom linearnom elektronskom transportu maksimalno dobija ATP/NADPH odnos od 1.3, porast ovog odnosa se obezbeđuje intenziviranjem pseudocikličnog i cikličnog transporta.

Sve ove reakcije su zavisne od svetlosti, dešavaju se samo kada se odvija transfer elektrona (*Laing et al.* 1981). Naime, kao što je već pomenuto, tokom apsorpcije svetlosti i transporta elektrona kroz ETL, pH strome raste do blago baznog (pH=7-8) što je praćeno porastom koncentracije Mg²⁺ ([Mg²⁺]_{STROMA}=3-6 mM, [Mg²⁺]_{LUMEN}=1-3 mM) (*Laing et al.* 1981). Upravo viši pH i viša [Mg²⁺] u stromi stimuliše karbamilaciju Lys²⁰¹ u aktivnom mestu Rubisco, a time i njegovu aktivnost (*Heldt 2005; Nelson & Cox 2005*). Štaviše, aktivnosti stromalne Fru-1,6-bifosfataze, sedoheptulozo-1,7-bifosfataze i ribulozo-5-fosfat kinaze su najveće na pH oko 8 i [Mg²⁺] > 5 mM (*Laing et al.* 1981).

Kalvin-Bensonov ciklus je kontrolisan i preko redoks regulacije tiolnih grupa Cys aminokiselinskih ostataka neophodnih za aktivnost četiri ključna enzima (ribulozo-5-fosfat kinaze, sedoheptulozo-1,7-bifosfataze i hloroplastnih izoformi Fru-1,6-bifosfataze i G3P dehidrogenaze), slika 2.11 (*Laing et al.* 1981). Ovi enzimi su aktivni kada su dva Cys ostatka redukovana, a neaktivni kada formiraju disulfidnu vezu (*Heldt 2005; Nelson & Cox 2005*). Elektroni sa PS I prelaze na Fd, a odatle delimično i na Trx pomoću Fd-Trx reduktaze, slika 2.9. Redukovani Trx redukuje kritične S–S veze ovih enzima i aktiviraju ih (*Dietz & Pfannschmidt 2011*). Kontrola aktivnosti ova četiri enzima je dinamičan proces, jer se simultano dešava i oksidacija tiolnih grupa molekulskim kiseonikom (ali i drugim prooksidantima, npr. vodonik-peroksidom) (*Laing et al.* 1981; *Baier & Dietz 2005; Dietz & Pfannschmidt 2011*). Step aktivacije ovih enzima zapravo će zavistiti od brzine redukcije S–S veza. Alosterne modifikacije supstratom, kao npr. u slučaju pomenutih bifosfataza, dovode do pada redoks-potencijala tiolnih grupa, što ubrzava redukciju S–S veza pomoću Trx (*Heldt 2005*). Pošto se u stromi hloroplasta obavlja i oksidativni pentozofosfatni put (OPPP), dakle pored sinteze šećera dešava se i njihova degradacija, neophodna je stroga regulacija metabolizma ugljenika.

2.2.5. Fotorespiracija

Fotorespiracija predstavlja niz reakcija koje su posledica nespecifičnosti Rubisco enzima samo za CO_2 . Nakon vezivanja RuBP u aktivnom mestu, Rubisco može da veže i kiseonik i da nagradi 3-fosfoglicerat koji učestvuje u Calvin-Bensonovom ciklusu i 2-fosfoglikolat, proizvod koji je nepotreban metabolizmu, slika 2.12. Iako je koncentracija CO_2 potrebna da se enzim poluzasiti mnogo niža od potrebne koncentracije O_2 ($K_M[\text{CO}_2] = 9 \mu\text{M}$, $K_M[\text{O}_2] = 535 \mu\text{M}$), brzina reakcije sa O_2 je veća, jer je koncentracija O_2 u vazduhu i u stromi mnogo veća od koncentracije CO_2 (Heldt 2005). Zapravo svaki treći do peti vezani RuBP će učestvovati u sporednoj reakciji oksigenacije.



Slika 2.12. Shema fotorespiracije (glikolatnog puta). Glikolat formiran u stromi hloroplasta se oksiduje u peroksizomima, pri čemu nastaje vodonik-peroksid, a zatim se transaminuje do glicina. U mitohondrijama se dva molekula glicina kondenzuju, dekarboksiluju i nastaje serin, koji prelazi u peroksizome, redukuje se do glicerata i kao 3-fosfoglicerat pridružuje Calvin-Bensonovom ciklusu. Enzimi: (1) 2-fosfoglicerat fosfataza; (2) glikolat oksidaza; (3) serin: glioksilat aminotransferaza; (4) glicin dekarboksilaza; (5) glutamat: glioksilat aminotransferaza; (6) reduktaza α -hidroksi kiseline i (7) glicerat kinaza.

Brzina fotorespiracije zavisi od odnosa CO_2 i O_2 rastvorenih u stromi hloroplasta, i kada je taj odnos smanjen (npr. visoke temperature ili suša) biće favorizovana oksigenacija u

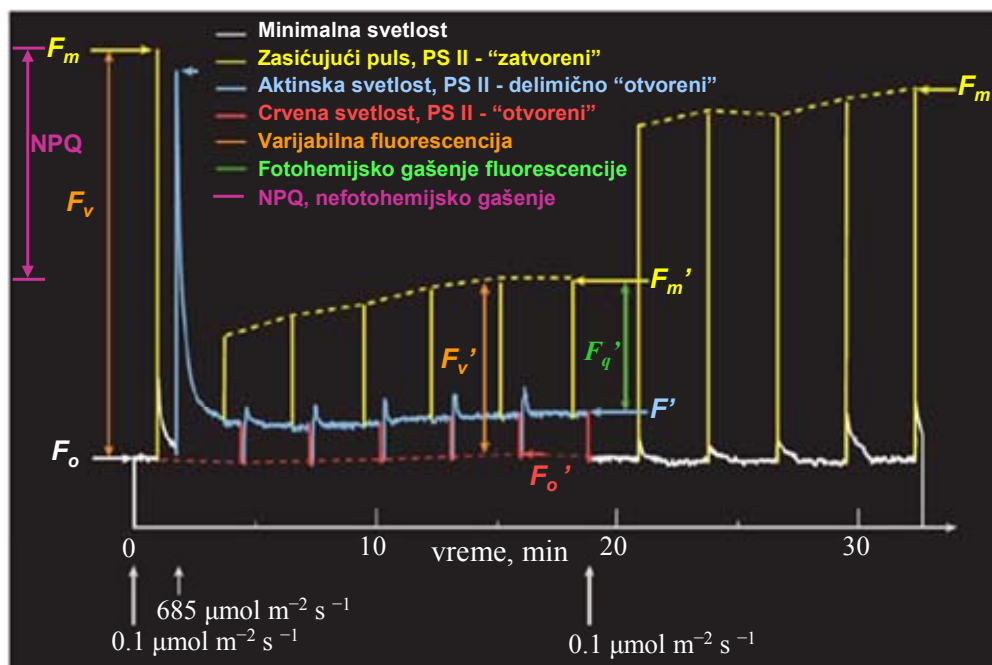
odnosu na karboksilaciju. Evolutivno, pretpostavlja se da biljke ne favorizuju maksimalnu brzinu fotosinteze, već je optimizuju, pošto fotorespiracija, iako energetski skup proces, predstavlja važan zaštitni mehanizam u situacijama visokog ekscitacionog pritiska.

Nastali molekul 2-fosfoglikolata se defosforiluje u stromi hloroplasta do glikolata, koji prelazi u peroksiziome gde redukuje molekulski kiseonik uz stvaranje vodonik-peroksida, a sam biva oksidovan u glioksilat od kojeg transaminacijom nastaje glicin, slika 2.12. Ova prostorna odvojenost H_2O_2 , glioksilata i glikolat-oksidaze se smatra preventivom, s obzirom na to da su oba metabolita izuzetno reaktivna i da mogu da inaktiviraju enzime sa $-SH$ grupama bitnim za katalitičku aktivnost. U mitohondrijama dva molekula glicina se kondenzuju, dekarboksiluju i nastaje serin i NADH. Serin se u peroksizomima konvertuje u glicerat, koji prelazi u hloroplaste i fosforilovan se vraća u Kalvin-Bensonov ciklus, slika 2.12. Od četiri atoma ugljenika (dva molekula 2-fosfoglicerata) nastaje jedan molekul 3-fosfoglicerata (3C atoma) i jedan molekul CO_2 se oslobađa, tako da minimalni gubici fotosintetskih produkata iznose 25% (Heldt 2005). Odnos ATP/NADPH koji nastaje kada je samo oksigenacija aktivna iznosi 1.75, a u kombinaciji sa karboksilacijom iznosi 1.62 (Noctor et al. 2002; Foyer et al. 2012). Dakle, u zavisnosti od koncentracije CO_2 u listovima, odnos ATP/NADPH usled fotorespiracije će varirati od 1.5 -1.75.

2.2.6. Efikasnost fotosinteze i fotosistema II

U prethodnim poglavljima (prvenstveno u poglavlju 2.2.2.) opisano je da svetlosna energija koju antena pigmenti PS II apsorbuju, može da se iskoristi u fotohemijskom procesu razdvajanja naelektrisanja na P680* i prenosa elektrona kroz ETL do $NADP^+$, i da može da se rasipa u obliku toplote (NPQ) ili kao fluorescencija *hl a* (1-2% apsorbovane svetlosti) (Maxwell & Johnson 2000; Baker 2008). Ova tri procesa su kompetitivna, pa tako prelaz elektrona na Q_A umanjuje, gasi fluorescenciju i to se naziva fotohemijskim gašenjem, dok se proces termalnog rasipanja (NPQ) naziva nefotohemijsko gašenje (Mullineaux & Karpinski 2002; Baker 2008). Pod pretpostavkom da se intenzitet fluorescencije *hl a* ne menja i pod uslovom da se procesi NPQ i fotohemije razdvoje, moguće je merenjem fluorescencije *hl a* pratiti intenzitet fotohemijskih reakcija. U mraku, nema apsorpcije energije, pa su akseptori Q_A maksimalno oksidovani i kaže se da su svi reakcioni centri PS II „otvoreni“, spremni za

ekscitaciju (Maxwell & Johnson 2000; Baker 2008). Ako se listovi biljaka adaptiranih na mrak osvetle veoma kratkim (<1 s) pulsem (bljeskom) svetlosti minimalnog intenziteta ($0.1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) i dalje će svi reakcioni centri PS II biti otvoreni (Q_A maksimalno oksidovan), a fluorimetar će detektovati minimalnu (F_o) fluorescenciju *hl a*, slika 2.13 (Genty et al. 1989; Baker et al. 2007; Baker 2008). Smatra se da ova fluorescencija potiče od PS II, jer PS I ima zanemarljiv doprinos fluorescenciji na talasnim dužinama ispod 700 nm (Baker 2008).



Slika 2.13. Analiza gašenja fluorescencije *hl a* pomoću modulovane fluorescencije. List adaptiran na mrak izlagan je različitim intenzitetima PAR. Parametri označeni apostroфом odgovaraju listu izlaganom aktinskom svetlu. Različite boje označavaju različite svetlosne tretmane. Objašnjenja su data na slici i u tekstu. Modifikovana slika preuzeta iz Baker (2008).

Ukoliko se zatim isti listovi osvetle kratkim, ali zasićujućim pulsom svetlom od nekoliko hiljada $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, Q_A će biti maksimalno redukovani i detektovaće se maksimalna fluorescencija (F_m), slika 2.13 (Genty et al. 1989; Maxwell & Johnson 2000). U tom momentu reakcioni centri će biti „zatvoreni“, nesposobni za dalje fotohemijske procese, a NPQ se neće odvijati ili će biti zanemarljiv (Baker 2008). U toku narednih 15-20 min fluorescencija *hl a* će opet početi da opada do nekog ravnotežnog nivoa, zbog porasta brzina druga dva kompeticijska procesa, slika 2.13 (Maxwell & Johnson 2000). Odnos razlike F_m i

F_o , tzv. varijabilne fluorescencije listova adaptiranih na mrak (F_v), i F_m predstavlja maksimalan kvantni prinos fotohemije PS II, odnosno redukcije Q_A :

$$(F_m - F_o)/F_m = F_v/F_m \text{ (Baker et al. 2007; Baker 2008).}$$

Pošto se svi molekuli *hl a* posmatrane površine lista ne pobuđuju istom energijom, nisu na istim energetske nivoima, pa definiciju maksimalnog kvantnog prinosa PS II ne treba smatrati apsolutno tačnom (Baker 2008). Ona je opšte prihvaćena za praćenje stresa kod biljaka, gde se uzima da kod nestresiranih biljaka F_v/F_m obično iznosi oko 0.83, dok se u slučajevima stresa PS II smanjuje, i to se smatra fotoinhibicijom (Maxwell & Johnson 2000; Baker 2008; Foyer et al. 2012). Smanjenje F_v/F_m je obično praćeno porastom NPQ. Treba imati u vidu da je fluorescencija srazmerna intenzitetu upadne svetlosti, ali i udelu svetlosti koju list zapravo apsorbira (obično 0.84) i udelu PS II u distribuciji energije između PS I i PS II, za koji se obično uzima da je po 50% za oba (Maxwell & Johnson 2000; Baker et al. 2007; Baker 2008; Foyer et al. 2012). Neki spoljni uslovi mogu da izmene ove činioce, menjajući osobine površine listova, koncentraciju (ne)fotosintetskih pigmenta i odnos PS II i PS I u apsorbovanju svetlosti (Baker et al. 2007). Zato F_v/F_m treba uzimati sa rezervom, čak i kada se porede stanja biljaka izlaganih stresu. Takođe, treba imati u vidu da PQ, ali ne i PQH₂, gasi fluorescenciju *hl a*, mada su greške koje mogu ovako nastati male (Baker 2008).

U listovima biljaka koji su adaptirani na aktinsku svetlost, reakcioni centri PS II su delimično „otvoreni“ i tada je moguće detektovati ustaljenu, ravnotežnu fluorescenciju *hl a*, F' (Slika 2.13). Ako se, kao u slučaju listova adaptiranih na mrak, osvetle kratkotrajnim, intenzivnim PAR, „otvoreni“ reakcioni centri će postati „zatvoreni“ i detektovaće se maksimalna fluorescencija listova adaptiranih na svetlo F_m' (Slika 2.13). Razlika između F_m' i F' je F_q' i odnosi se na gašenje F_m' fotohemijskim procesima:

$$F_q' = F_m' - F'; \quad \Phi_{PSII} = F_q' / F_m' = \frac{F_m' - F'}{F_m'}$$

Odnos F_q'/F_m' (Φ_{PSII}) teorijski predstavlja kvantni prinos PS II u momentu pre primene zasićujućeg pulsa i direktno je proporcionalan efikasnosti linearnog elektronskog protoka kroz PS II (Genty et al. 1989; Baker 2008). Iz tog ugla, Φ_{PSII} predstavlja radnu efikasnost PS II, odnosno efikasnost kojom „otvoreni“ reakcioni centri PS II koriste apsorbovanu svetlost za fotohemijske procese (Maxwell & Johnson 2000). Radna efikasnost PS II se može meriti na

različitim intenzitetima PAR i pod različitim spoljnim uslovima. Brzina linearnog transporta elektrona kroz PS II (ETR) je data jednačinom:

$$\text{ETR} = \text{PAR} \times 0.5 \times 0.84 \times \Phi_{\text{PS II}},$$

gde se 0.5 odnosi na jednak udeo PS I i PS II u stvaranju elektrona, a 0.84 je udeo upadne svetlosti koja se u proseku apsorbira u mezofilnom sloju listova (*Maxwell & Johnson 2000; Baker 2008*). Merenjem fluorescencije *hl a*, vrednost NPQ može da se izračuna prema Stern-Volmer-ovoj jednačini:

$$\text{NPQ} = (F_m - F_m')/F_m' \text{ (Bilger \& Björkman 1990; Baker 2008)}.$$

Ako se listovi zaklone od aktinskog svetla (prekrivanjem crnom, neprovidnom tkaninom) i osvetle slabim pulsem ($30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ u trajanju od 4 s) svetlosti iz daleke crvene oblasti ($>720\text{-}730 \text{ nm}$) koja preferencijalno ekscituje PS I, tako da su svi Q_A oksidovani, detektuje se F_o' - minimalna fluorescencija u listovima adaptiranim na svetlo, slika 2.13 (*Maxwell & Johnson 2000; Baker 2008*). Razlika F_m' i F_o' je varijabilna fluorescencija listova adaptiranih na svetlo (F_v'), dok odnos F_v'/F_m' predstavlja maksimalan kvantni prinos fotohemije PS II na datom PAR:

$$(F_m' - F_o')/F_m' = F_v'/F_m' \text{ (Genty et al. 1989; Maxwell \& Johnson 2000)}.$$

Ovaj odnos bi odgovarao maksimalnom kvantnom prinosu PS II kad bi svi Q_A bili redukovani, odnosno kada NPQ ne bi bio aktivan (*Genty et al. 1989; Baker et al. 2007*). Promena u odnosu F_v'/F_m' upućuje na promene u efikasnosti NPQ (*Maxwell & Johnson 2000*). Odnos F_q'/F_v' predstavlja udeo radne u maksimalnoj efikasnosti PS II koja je ostvarena na datom PAR, što se vidi iz jednačine:

$$\frac{\frac{F_q'}{F_m'}}{\frac{F_v'}{F_m'}} = \frac{F_q'}{F_v'}$$

Ovaj parametar (F_q'/F_v') se naziva faktor efikasnosti PS II i predstavlja koncentraciju otvorenih reakcionih centara PS II samo pod uslovom da svaki PS II ima svoje, nezavisne antena pigmente (*Genty et al. 1989; Maxwell & Johnson 2000; Baker 2008*). Po tom principu, razlika: $1 - F_q'/F_v'$ predstavlja udeo zatvorenih reakcionih centara (*Maxwell & Johnson 2000*).

Faktor efikasnosti PS II je pogodan za ispitivanje da li je promena u radnoj efikasnosti PS II nastala usled promene u NPQ ili usled promene u sposobnosti pobuđenog PS II da prenosi elektrone na Q_A . Iz tog ugla posmatrano, to je mera stepena fotohemijskog gašenja (*Baker 2008*). Sa porastom PAR, opada $\Phi_{PS II}$, samim tim i F_v'/F_m' i F_v'/F_m' , a NPQ raste. Na visokim vrednostima PAR, udeo $\Phi_{PS II}$ u F_v'/F_m' opada, ne zbog porasta NPQ koji se brzo zasićuje, nego zbog otežanog oksidovanja Q_A u okviru PS II usled porasta odnosa $[PQH_2]/[PQ]$, odnosno nemogućnosti sistema nishodno od PS II da iskoristi nastali NADPH, bilo zbog usporenog Calvin-Bensonovog ciklusa, dostupnosti CO_2 ili smanjene brzine izvoza TP iz hlороplasta u ostale organele (*Baker 2008*).

Merenjem listova C3 biljaka u uslovima u kojima je fotorespiracija smanjena (atmosfera sa 1-2% O_2), kvantni prinos asimilacije CO_2 (Φ_{CO_2}) je linearno zavisano od $\Phi_{PS II}$ (kao i kod C4 biljaka):

$$\Phi_{CO_2} = \Phi_{PSII} \times udeo_{PSII} \times \frac{1}{k},$$

gde je k broj elektronskih ekvivalenata iz linearnog elektronskog toka potreban za asimilaciju jednog molekula CO_2 (*Genty et al. 1989; Fryer et al. 1998; Baker et al. 2007; Baker 2008*). Kada je asimilacija CO_2 glavni potrošač elektrona iz linearnog ETL, $k=4$. Kada je fotorespiracija uključena, vrednost k je niža. Na ovaj način je moguće utvrditi stepen učešća alternativnih elektronskih potrošača (fotorespiracije, pseudocikličnog elektronskog transporta, voda-voda ciklusa) pod različitim abiotskim i biotskim stresorima (*Fryer et al. 1998; Vanacker et al. 1998; Asada 2000; Maxwell & Johnson 2000; Baker 2008; Surabhi et al. 2009*). Ilustracije radi, ukoliko se NADPH pojačano koristi u nekom drugom procesu (NADPH oksidaza u plazminoj membrani u procesu oksidativnog 'burst'-a) to će se videti kroz porast stepena fotohemijskog gašenja i kroz porast $\Phi_{PS II}$ (*Vanacker et al. 1998*).

U zaključku, merenje fluorescencije *hl a* savremenim fluorimetrima sa modulisanom amplitudom pulsne svetlosti u kombinaciji sa merenjem izmene gasova (CO_2 i H_2O) listova u specijalnim zatvorenim kivetama, moguće je na jedan lagan, neinvanzivan način u komorama za gajenje i u polju meriti stanje fotosinteze, njene najosetljivije komponente- PS II i pratiti fluks elektrona kroz različite metaboličke puteve (*Maxwell & Johnson 2000*).

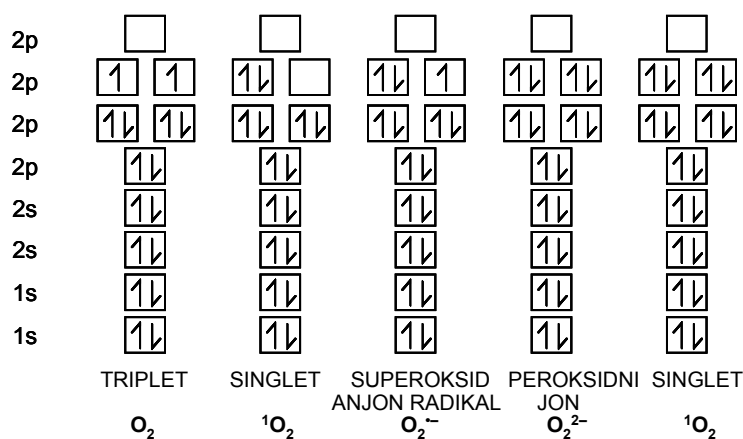
2.3. Reaktivne kiseonične vrste (ROS): hemija i stvaranje *in vivo*

U ovom poglavlju definisane su ROS, uslovi i ćelijski odeljci u kojima se stvaraju, sa posebnim akcentom na fotosintetsku aktivnost. Prostorna specifičnost nastanka ROS je od ključne važnosti za razlike u odgovorima belog i zelenog tkiva listova na različite spoljne uslove.

2.3.1. Radikali i ROS

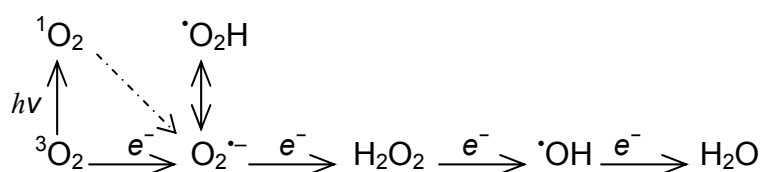
Radikal je svaka hemijska vrsta (atom, jon ili molekul) koja ima jedan ili više nesparenih elektrona u poslednjem sloju (*Halliwell & Gutteridge 2007*). Radikali mogu da nastanu kada atom ili molekul „izgubi“ ili „dobije“ jedan elektron, ili pri homolitičkom cepanju kovalentne veze. Prisustvo nesporenog elektrona čini radikale jako reaktivnim, sa veoma kratkim vremenom života.

Iako se prisustvo kiseonika u atmosferi smatra osnovnim uslovom za život viših organizama, izvesni oblici kiseonika mogu da budu veoma štetni za sve, pa i za biljne ćelije. Molekulski kiseonik (O_2) je triplet, ima dva nesparena elektrona paralelnih spinova u dve odvojene orbitale, slika 2.14. To svojstvo ga čini delimično inertnim u reakcijama sa organskim jedinjenjima, za koje je uobičajeno da imaju dva sparena elektrona (*Apel & Hirt 2004; Halliwell & Gutteridge 2007*). Po Paulijevom principu isključenja, O_2 može da reaguje samo sa vrstom koja ima dva nesparena elektrona suprotnog spina od spina njegovih elektrona (*Asada 2006*).



Slika 2.14. Elektronska konfiguracija kiseonika i njegovih oblika.

Ako tripletni kiseonik apsorbuje dovoljno energije da promeni spin jednog svog elektrona on prelazi u singletno stanje (*Krieger-Liszka* 2005; *Asada* 2006). Na ovaj način prevaziđena je spinska restrikcija, pa singletni kiseonik postaje daleko reaktivniji sa organskim molekulima. Drugi način na koji tripletni kiseonik može da se aktivira bazira se na višestepenoj monovalentnoj redukciji, slika 2.15. U „aktivirane“ oblike kiseonika, ROS, ubrajaju se radikali: superoksid-anjon-radikal ($O_2^{\cdot-}$), hidroksil-radikal ($\cdot OH$), peroksil-radikali ($LOO\cdot$) i neradikalske vrste: singletni kiseonik (1O_2), vodonik-peroksid (H_2O_2) i ozon (O_3) (*Halliwell & Gutteridge* 2007).



Slika 2.15. Shema niza monovalentnih redukcija molekulskog kiseonika (triplet) do vode. Redoks-potencijal parova: $O_2/O_2^{\cdot-} = -0.33$; $O_2^{\cdot-}/H_2O_2 = 0.94$; $H_2O_2/\cdot OH = 0.46$; $\cdot OH/H_2O = 2.18$; $O_2/H_2O = 0.82$ (preuzeto iz *Foyer & Noctor* 2000).

Prisustvo ROS može da ima štetne efekte na DNK i RNK (oksidacije pojedinačnih nukleozida), proteine (karbonilacija amoniokiselinskih ostataka) i polinezasićene lipide (lipidna peroksidacija) (*Buettner* 1993; *Stadtman & Levine* 2003; *Apel & Hirt* 2004; *Grimsrud et al.* 2008). Negativni efekti se pojačavaju u autokatalizovanim lančanim radikalnim reakcijama. Krajnje posledice štetnog dejstva ROS u ćeliji su mutacije, inhibicija -sinteze proteina, promene aktivnosti enzima i povećavanje permeabilnosti i fluidnosti membrana (*Halliwell & Gutteridge* 2007)

Štetno dejstvo ROS zavisi od vremena njihovog poluživota, odnosno redoks-potencijala, rastvorljivosti, mesta stvaranja i od sposobnosti ćelje da se odbrani, tabela 2.2. Neke ROS, kao što je vodonik-peroksid, su relativno stabilne u biološkim sistemima i mogu da prolaze kroz membrane i difunduju dalje od mesta nastanka (*Neill, Desikan & Hancock* 2002; *Bienert et al.* 2007). S druge strane, hidroksil-radikal je vrsta koja ima najveći redukcionni potencijal u biološkim sistemima (*Buettner* 1993) i u stanju je da brzinom $10^9 M^{-1} s^{-1}$ oksiduje sve strukture u ćeliji, odnosno da odmah po trenutku nastanka reaguje sa molekulima koji se nalaze u direktnom susedstvu, tabela 2.2.

Međutim, ROS nemaju samo štetno dejstvo na ćelijske komponente. Zajedno sa reaktivnim azotnim vrstama (RNS) kao što je azot(II)-oksid (NO[•]) predstavljaju signalne molekule koji učestvuju u regulaciji rasta, ćelijskog ciklusa, programirane ćelijske smrti, hormonskog metabolizma i aklimatizacije na uslove spoljne sredine (Neill, Desikan & Hancock 2002; Foyer & Noctor 2003; 2009b; Mittler 2004; Foyer & Shigeoka 2011; Suzuki et al. 2012; Hideg et al. 2013).

Tabela 2.2. ROS: oznake i vreme poluživota u ćelijama pod optimalnim uslovima za rast.

ROS	oznaka	naziv	vreme poluživota u ćeliji (s)
	O ₂ ^{•-}	superoksid-anjon-radikal	1-4·10 ⁻⁶ ^a
	•OH	hidroksil-radikal	10 ⁻⁹ ^a
radikali	•OH ₂	hidroperoksil-radikal	7 ^a
	LOO [•]	lipidni peroksil-radikal	7 ^a
	NO [•]	azotoksid-radikal	4-5 ^a
	¹ O ₂	singletni kiseonik	2·10 ⁻⁷ ^b
molekuli	H ₂ O ₂	vodonik-peroksid	10 ⁻³ -10 ⁻⁵ ^a
	R ₂ O ₂	organski peroksid	minuti ^a

Izvori: ^aHalliwel & Gutteridge 2007; Krieger-Liszkay 2005.

2.3.2. Stvaranje ROS u biljnim ćelijama

Nastanak ROS u biljnim ćelijama je neizbežna posledica metabolizma biljaka (Mittler 2004, Foyer & Shigeoka 2011). Najznačajniji izvor ROS u zelenom tkivu listova, čak i pri optimalnim uslovima za rast, je svakako fotosintetski ETL i fotorespiracija (Noctor et al. 2002; Foyer & Noctor 2003; Asada 2006; Foyer & Shigeoka 2011).

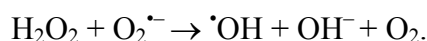
Plazmina membrana je takođe važno mesto nastanka ROS u procesu odbrane od patogena u tzv. oksidativnom prasku, ‘oxidative burst’ (Apostol et al. 1989; Lamb & Dixon 1997; Wojtaszek 1997; Bolwell et al. 2002; Romero et al. 2007). Tom prilikom se akumulira O₂^{•-}, nastao pomoću NADPH oksidaze prisutne u plazminoj membrani (Lamb & Dixon 1997; Neill, Desikan & Hancock 2002; Cheeseman 2007) i H₂O₂, koji nastaje dismutacijom O₂^{•-} i direktno u reakciji peroksidaza III klase ćelijskog zida na alkalnom pH (Bolwell et al. 2002),

ili oksidovanjem NADH u prisustvu fenola i metala (*Hadži-Tašković Šukalović et al. 2005*). Takođe, tokom elongacije ćelija, sa ciljem da se strukture ćelijskog zida opuste, u reakcijama katalizovanim apoplastnim peroksidazama nastaje $\cdot\text{OH}$ (*Chen & Schopfer 1999, Liskay et al. 2003*). Vodonik-peroksid prisutan u apoplastu, je neophodan za normalan razvoj biljne ćelije. On predstavlja supstrat za peroksidaze III klase koje oksiduju fenolna jedinjenja, što vodi ka njihovoj polimerizaciji i formiranju lignina i suberina u sekundarnom ćelijskom zidu (*Lewis & Yamamoto 1990; Liskay et al. 2003*).

U mitohondrijama ROS (pre svega $\text{O}_2^{\cdot-}$ i H_2O_2) nastaju redukcijom molekuskog kiseonika elektronima koji „cure” iz kompleksa I i III elektron-transportnog lanca (oko 0.1-4% ukupnih elektrona se ovako gubi) (*Saran et al. 1998; Møller 2001; Nelson & Cox 2005; Murphy 2009*). Rezultati na osnovu modelovanja pokazuju da se brzina stvaranja ROS u mitohondrijama biljnih ćelija na svetlu i u mraku ne razlikuje značajno (*Foyer & Noctor 2003*). Tokom klijanja semena, u glioksizomima, u procesu oksidacije masnih kiselina, stvara se glioksilat, čijom oksidacijom pomoću acil-koenzim A oksidaze nastaje H_2O_2 (*Tolbert & Essner 1981; Scandalios et al. 1997*).

Ostali izvori H_2O_2 u biljkama su enzimi flavon-oksidge, kao npr. ‘germin like’ oksalat-oksidge prisutna u plazminoj membrani, ksantin-oksidge u peroksizomima i glioksizomima, zatim monoamin- i poliamin-oksidge, ciklooksigenaze i lipoksigenaze, dok je familija citohrom-*P450*-reduktaza u endoplazmatičnom retikulumu značajan proizvođač $\text{O}_2^{\cdot-}$ (*Del Río et al. 2003; Mittler 2004; Cheeseman 2007*).

Ksantin/ksantin-oksidge sistem za stvaranje $\text{O}_2^{\cdot-}$ iz peroksizoma je takođe izvor $\cdot\text{OH}$ (*Beauchamp & Fridovich, 1970; Mhamdi et al. 2010b*), koji zapravo nastaje u reakciji superoksid-anjon-radikala sa peroksidom, u Haber-Vajssovoj (*Haber-Weiss*) reakciji:



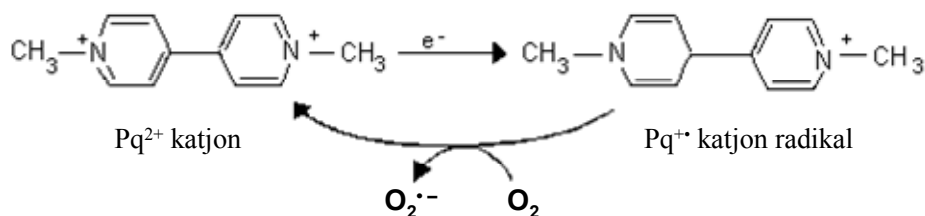
Srećom, ova reakcija u ćelijama je jako spora (*Buettner & Jurkiewicz 1996; Wojtaszek 1997*). Međutim, joni prelaznih metala prisutni čak i u tragovima (kao npr. u puferima koji se koriste u laboratorijskom radu gde prosečna koncentracija metalnih jona iznosi oko 1 μM) je katalizuju (*Buettner & Jurkiewicz 1996*). Hidroksil-radikal nastaje i u reakciji reduktivnog cepanja vodonik-peroksida (ili nekog organskog peroksida) redukovanim prelaznim metalom, kakav je Fe^{2+} ili Cu^+ (*Buettner 1993*). Ova reakcija se naziva Fentonova reakcija:



Kompleksiranjem jona metala (kao npr. gvožđe vezano u hemu) menja se redoks-potencijal metala (Buettner & Jurkiewicz 1996; Saran et al. 1998). Helirani Fe^{2+} : Fe(II)EDTA, Fe(II)DETAPAC, Fe(II)citrat ili Fe(II)cyt c mogu da reaguju sa molekulskim kiseonikom stvarajući $\text{O}_2^{\bullet-}$ ili da učestvuju u Fentonovoj reakciji (Buettner 1993; Saran et al. 1998). Prooksidanti poput $\text{O}_2^{\bullet-}$ ili Asc mogu da ponovo redukuju $\text{Fe}^{3+}(\text{Cu}^{2+})$ do $\text{Fe}^{2+}(\text{Cu}^+)$, čime čine metalne jone ponovo katalitički aktivnima.

2.3.2.1. Stvaranje ROS u fotosintezi

Fotosinteza je glavni izvor ROS, nastalih direktno u procesima transfera energije i transporta elektrona u hloroplastima (Foyer & Noctor 2003; Asada 2006; Foyer et al. 2012) i indirektno, u procesu fotorespiracije u peroksizomima (Foyer & Shigeoka 2011; Munné-Bosch et al. 2013). U hloroplastima, najznačajnije je stvaranje $\text{O}_2^{\bullet-}$ u okviru PS I u Melerovoj reakciji (odjeljak 2.2.2) i stvaranje singletnog kiseonika u okviru PS II (Apel & Hirt 2004; Asada 2006; Krieger-Liszkay et al. 2008; Foyer & Shigeoka 2011; Foyer et al. 2012). Nastali $\text{O}_2^{\bullet-}$ na PS I se superoksid-dismutazom disproporcioniše na H_2O_2 i O_2 , a H_2O_2 se zatim uklanja pomoću Asc-peroksidaze, uz potrošnju Asc kao donora elektrona (Asada 2000, 2006; Polle et al. 2001; Foyer & Noctor 2011). Oksidovani oblici askorbata mogu da se redukuju direktno elektronima sa PS I (sa Fd) u voda-voda ciklusu, ili sa NADPH enzimima askorbat-glutationskog (Asc-GSH) ciklusa (Asada 1999, 2000, 2006). Pri optimalnim uslovima, Meler-peroksidazna reakcija troši oko 10% elektrona lineranog elektronskog toka (Foyer & Noctor 2003; Foyer et al. 2012). Ovaj udeo raste u uslovima stresa, pa se voda-voda ciklus smatra značajnim alternativnim potrošačem elektrona sa PS II (Asada 1999; Foyer et al. 2012). Do stimulacije Melerove reakcije dolazi i dejstvom bipiridinskog herbicida parakvata (Pq) ili metilviologena (Donahue et al. 1997; Choi et al. 2001). U hloroplastima biljaka izloženih svetlu, katjon parakvata, Pq^{2+} , preuzima elektron sa PS I ($E^\circ = -446$ mV) pri čemu se redukuje u monokatjonski radikal $\text{Pq}^{\bullet+}$ plave boje, nakon čega odmah redukuje molekulski kiseonik do $\text{O}_2^{\bullet-}$ slika 2.16 (Babbs et al. 1989; Scarpeci et al. 2008; Hawkes 2013). Re-oksidovani Pq^{2+} započinje novi ciklus redukcije i oksidacije. Slično Fenton-ovoj reakciji, u Winterbourn-ovoj reakciji $\text{Pq}^{\bullet+}$ može da redukuje i prelazne metale, poput Fe^{3+} koji zatim sa peroksidom grade $\text{}^{\bullet}\text{OH}$, ili da direktno u reakciji sa H_2O_2 gradi $\text{}^{\bullet}\text{OH}$ (Babbs et al. 1989).



Slika 2.16. Redoks reakcije parakvata (Pq; 1,1'-dimetil-4,4'-piridilijum-jon). Pq^{2+} katjon se redukuje elektronom sa PS I i nastali katjon radikal trenutno redukuje molekularni kiseonik, stvarajući $O_2^{\cdot-}$. Kako reoksidovan Pq katjon može opet da preuzima elektron sa PS I, ova lančana reakcija ubrzava stvaranje $O_2^{\cdot-}$ na PS I što finalno dovodi do ozbiljnih oštećenja hloroplasta i smrti ćelija.

Pseudocikličnim tokom elektrona se održava transtilakoidna ΔpH , što aktivira NPQ mehanizam rasipanja viška apsorbirane energije, te se smanjuje mogućnost za preteranu redukciju PQ rezervoara i stvaranje singletnog kiseonika (Asada 2000). S druge strane, ovaj ciklus može da se posmatra i kao izvor oksidativnih signala koji dalje regulišu gensku ekspresiju (Foyer & Noctor 2009a; Foyer et al. 2012; Munné-Bosch et al. 2013).

Kao što je u poglavlju 2.2.3. već bilo navedeno, pri povišenom ekscitacionom pritisku na PS II može da nastane $^3P680^*$, koji prenosi energiju molekularnom kiseoniku, pri čemu se stvara singletni kiseonik (Hideg et al. 1994; Nioygui 2000; Krieger-Liszkay 2005; Asada 2006; Krieger-Liszkay et al. 2008). Singletni kiseonik, ukoliko se ne ukoni, prvenstveno oštećuje D1 subjedinicu, ali i ostale subjedinice PS II, molekule hlorofila i lipida tilakoida, stvarajući lipidne 'carbon centred' radikale i lipidne peroksil-radikale koji započinju lančanu radikalsku reakciju (Asada 2006; Krieger-Liszkay 2005; Krieger-Liszkay et al. 2008). Singletni kiseonik je odgovoran za većinu (više od 90%) primećenih neenzimskih peroksidacija lipida tilakoidnih membrana (Triantaphylidès et al. 2008). Reakcioni centar PS II se obnavlja na svakih 20-30 min, ali oštećenja nastaju kada je brzina stvaranja $^3P680^*$ veća od brzine de-ekscitacije karotenoidima i tokoferolom i brzine reparacije subjedinica PS II. Osim singletnog, na PSII mogu da nastanu i $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 i $\cdot OH$, ali to nisu značajne količine (Foyer & Noctor 2000; Asada 2006).

U procesu fotorespiracije C3 biljaka, tokom oksidacije glikolata u peroksizomima nastaju značajne količine H_2O_2 (odjeljak 2.2.5) (Foyer & Noctor 2000, 2003; Noctor et al. 2002a). U suštini, rezultati dobijeni na osnovu modelovanja (Noctor et al. 2002a) pokazuju da se u listovima C3 biljaka izloženih optimalnim uslovima za rast, H_2O_2 najbrže stvara u peroksizomima (oko $10 \mu M m^{-2} s^{-1}$), zatim u hloroplastima ($4 \mu M m^{-2} s^{-1}$), a najsporije u

mitohondrijama ($<182 \mu\text{M m}^{-2} \text{s}^{-1}$ u mraku i $<216 \mu\text{M m}^{-2} \text{s}^{-1}$ na svjetlu) (Foyer & Noctor 2003; Foyer & Shigeoka 2011).

2.3.2.2. ROS kao signalni molekuli

Uloga ROS nastalih u procesu fotosinteze nije samo negativna (Apel & Hirt 2004; Mittler 2004; Foyer & Noctor 2005, 2009b; Suzuki et al. 2012). Neki od njih predstavljaju značajne signale iz hloroplasta za reprogramiranje genske ekspresije u nukleusu, tzv. retrogradni prenos signala (Piñas Fernández & Strand 2008; Pogson et al. 2008; Hüner et al. 2012; Foyer & Shigeoka 2011). Vodoni-peroksid koji nastaje iz $\text{O}_2^{\cdot-}$ na PS I i u fotorespiraciji i singletni kiseonik su glavni retrogradni signali u hloroplastima koji dovode do reprogramiranja genske ekspresije u jedru (Mullineaux & Karpinski 2002; Fryer et al. 2003; Krieger-Liszkay 2005; Scarpeci et al. 2008; Foyer & Noctor 2009b; Suzuki et al. 2012; Munné-Bosch et al. 2013). Pojačana akumulacija singletnog kiseonika dovodi do ekspresije gena odgovornih za programiranu ćelijsku smrt, ali i gena uključenih u aklimatizaciju biljaka na oksidativni stres (Krieger-Liszkay 2005; Pogson et al. 2008; Foyer & Shigeoka 2011). Singletni kiseonik ima jako kratko vreme života da bi predstavljao signal *per se*, pa se pretpostavlja da oksidovani degradacioni proteinski produkti D1 subjednice PS II ili degradacioni produkti hlorofila mogu preko specifičnih transportera da napuste hloroplaste i uđu u nukleus, postajući tako sekundarni glasnici (Krieger-Liszkay 2005). Za akumulirani $\text{O}_2^{\cdot-}$ i H_2O_2 u hloroplastima je dokazano da predstavljaju sekundarne glasnike u indukciji ekspresije gena antioksidativne zaštite, različite od onih koje indukuje $^1\text{O}_2$ (Mullineaux & Karpinski 2002; Fryer et al. 2003). Vodoni-peroksid iz peroksizoma može da direktno utiče na $\text{Ca}^{2+}/\text{CAM}$ signalni put, a može indirektno, menjajući redoks-stanja tiolnih grupa, kako specifičnih enzima tako i traskripcionih faktora ili redoks-stanja glutaciona, da utiče na gensku ekspresiju (Mullineaux & Karpinski 2002; Neill, Desikan & Hancock 2002; Queval et al. 2011; Foyer & Shigeoka 2011). Utvrđeno je da H_2O_2 u zajedno sa NO^{\cdot} , Asc i abscisinskom kiselinom utiče na otvaranje i zatvaranje stoma (Mullineaux & Karpinski 2002; Neill, Desikan & Hancock 2002). Takođe je pokazano je da H_2O_2 indukuje ekspresiju gena koji kodiraju proteine hlororespiratornog puta i biosinteze antocijana (Mullineaux & Karpinski 2002; Vanderauwera et al. 2005; Foyer & Shigeoka 2011).

2.4. Antioksidativni sistem u biljkama

Održavanje redoks homeostaze je od esencijanog značaja za biljni metabolizam sa ciljem da se izbegne preterana oksidacija ili redukcija ćelijskih komponenata (Polle 1997; Foyer & Noctor 2011). Po opštoj definiciji koju su dali Halliwell i Gutteridge (2007), antioksidanti su bilo koje supstance koje, u nižoj koncentraciji u odnosu na potencijalni supstrat koji bi se oksidovao, mogu da značajno odlože ili inhibiraju oksidaciju tog supstrata. Samim tim, antioksidativnost može biti izražena na više nivoa. Mnogi antioksidanti su u stanju da direktno uklanjaju ('scavenge') ROS, doniranjem ili primanjem elektrona, a da pri tome sami postanu stabilni radikali ili molekuli. Stabilizacija radikala se postiže delokalizacijom π -elektrona i rezonancijom (u slučaju flavonoida, tokoferola ili askorbata) (Rice-Evans et al. 1996; Cao et al. 1997). Gašenje ili 'quenching' je proces u kome se pobuđeni molekul (npr. $^1\text{O}_2$) de-ekscituje transferom ekscitovane energije do drugog molekula (karotenoida ili tokoferola u ovom slučaju), koji višak energije oslobađaju u obliku toplote i tako se vraćaju u osnovno stanje (Standfuss et al. 2005; Krieger-Liszkay 2005; Halliwell & Gutteridge 2007). Osim direktnog dejstva, antioksidanti mogu da deluju indirektno i da sprečavaju nastanak ROS, kao npr. flavonoidi sa *orto*-dihidroksilnim grupama koji mogu da kompleksiraju jone metala i tako sprečavaju nastanak ROS u Fentonovoj ili Haber-Vajsovoj reakciji (Rice-Evans et al. 1996; Chen & Ahn 1998; Agati & Tattini 2010). Takođe, kao sekundarni antioksidanti mogu da regenerišu oksidovani oblik primarnog antioksidanta, npr. Asc regeneriše oksidovani α -tokoferol, a α -tokoferol β -karoten (Buettner 1993; Smirnov 2008; Foyer & Shigeoka 2011).

Da bi antioksidativni sistem bio shvaćen na pravi način, potrebno je imati u vidu da je to integrisan sistem, kompleksna mreža različitih enzima koji direktno uklanjaju ROS, neenzimskih molekula i enzima koji recikliraju oksidovane antioksidante i koji omogućavaju održavanje njihovog redoks stanja (Apel & Hirt 2004; Munné-Bosch et al. 2013). Svi oni zajedno i orkestrirano deluju, u zavisnosti od date ROS i datog ćelijskog odeljka. Upravo mikro uslovi (pH, prisustvo metala u tragovima...) specifični za svaki ćelijski odeljak određuju i da li će se neki molekul ponašati kao antioksidant ili kao prooksidant. U ovom poglavlju poseban akcenat je dat na komponente antioksidativnog sistema odgovora muškatle i tamjanike, na uslove primenjene u ovom radu.

al. 1997; Willekens et al. 1997; Mittler 2004), a u apoplastu i vakuolama peroksidaze III klase (POD), Asc i fenolna jedinjenja (Takahama 2004; Kukavica et al. 2009; Ferreres et al. 2011), slika 2.17. U Asc-GSH ciklusu se H_2O_2 redukuje do vode, uz oksidaciju Asc pomoću APX, da bi se dalje uz učešće više enzima i glutaciona oksidovani askorbat regenerisao, uz krajnju potrošnju NADPH, slika 2.17. Komponente ovog ciklusa se nalaze u hloroplastima, citosolu, peroksizomima i mitohondrijama (Jiménez et al. 1997; Noctor & Foyer 1998a; Shigeoka et al. 2002; Mittler 2004; Asada 2006).

2.4.1.1. Superoksid-dismutaza (SOD, EC 1.15.1.1)

Superoksid-dismutaza (SOD) disproporcioniše $O_2^{\bullet-}$ u molekularni kiseonik i vodonik-peroksid (Asada 1999; 2006). S obzirom na to da predstavlja prvu liniju antioksidativne odbrane, SOD je lokalizovana u svim ćelijskim kompartmentima gde dolazi do nastanka $O_2^{\bullet-}$, slika 2.17 (Polle et al. 2001; Alscher et al. 2002).

U zavisnosti od metalnog kofaktora, u biljkama postoje tri tipa metaloenzima SOD: MnSOD, FeSOD i Cu/ZnSOD (Alscher et al. 2002). Glavna SOD je Cu/ZnSOD koja se nalazi u stromi hloroplasta, ali i u citosolu, peroksizomima i apoplastu (Asada 1995; Ogawa et al. 1995; Mittler 2004; Bogdanović et al. 2006; Miura et al. 2010). MnSOD se kod svih ispitanih vrsta nalazi u mitohondrijama, ali je detektovana i u apoplastu i ćelijskom zidu (Weisiger & Fridovich 1973; Vanacker et al. 1998; Møller 2001; Kukavica et al. 2009; Morina et al. 2010). Najmanje zastupljen tip SOD u ćeliji je FeSOD, koja se nalazi isključivo u stromi hloroplasta nekih biljnih vrsta (npr. *Glycine max*, *Arabidopsis thaliana* i *Ginkgo biloba*) (Alscher et al. 2002; Mittler 2004; Kukavica & Veljović Jovanović 2004). Cu/ZnSOD i FeSOD se inhibiraju vodonik-peroksidom brzinom od $0.8 M^{-1} s^{-1}$ i $0.6 M^{-1} s^{-1}$, a KCN inaktivira Cu/ZnSOD, ne i FeSOD (Shigeoka et al. 2002). MnSOD je aktivna i u prisustvu H_2O_2 i cijanidnog jona (Weisiger & Fridovich 1973; Alscher et al. 2002; Kukavica et al. 2009)

Konstanta brzine reakcije disproporcionisanja $O_2^{\bullet-}$ pomoću sva tri tipa SOD *in vitro* iznosi $2 \times 10^9 M^{-1} s^{-1}$, što je najveća brzina među enzimskim reakcijama, ograničena brzinom difuzije (Asada 1999; Murphy 2008). Kada se uzme u obzir viskoznost strome hloroplasta, brzina iznosi $2.4 \times 10^8 M^{-1} s^{-1}$ (Asada 1999). Značajna osobina hloroplastne izoforme Cu/ZnSOD jeste njena mikro-kompartimentalizacija, odnosno grupisanje oko PS I kompleksa, gde je u položaju da gotovo momentalno uklanja nastali $O_2^{\bullet-}$ (Ogawa et al., 1995; Asada

2000). *Ogawa* i saradnici (1995) su pokazali da se oko 70% Cu/ZnSOD slabim jonskim interakcijama i hidrofobnim silama vezuje za tilakoidnu membranu sa stromalne strane, u domenu stroma tilakoida i na obodima tilakoida grana.

2.4.1.2. Katalaza (CAT, EC 1.11.1.6)

Katalaza (CAT) je homotetramer i svaki monomer sadrži hem prostetičnu grupu u aktivnom mestu (*Willekens et al.* 1997; *Scandalios et al.* 1997). Odlikuje se izuzetno visokom brzinom reakcije (organičena brzinom difuzije) i niskim afinitetom za vodonik-peroksid (*Willekens et al.* 1997; *Scandalios et al.* 1997; *Mhamdi et al.* 2010b). Bifunkcionalnost CAT se ogleda u tome da pri $[H_2O_2] < 1 \mu M$ ima peroksidativnu aktivnost, odnosno potreban joj je donator elektrona (npr. Asc, etanol), dok pri višim koncentracijama H_2O_2 disproporcioniše peroksid na vodu i O_2 (*Scandalios et al.* 1997; *Mhamdi et al.* 2010b). Mihaelis-Mentenina konstanta za H_2O_2 iznosi od 40 do 600 mM (*Mhamdi et al.* 2010b), što ukazuje da u fiziološkim uslovima CAT funkcioniše daleko ispod kapaciteta, ali da efikasnost raste u slučaju porasta koncentracije vodonik-peroksida. Sve ispitivane vrste skrivenosemenica sadrže tri CAT izoforme, koje predstavljaju tri klase, zavisno od tkiva u kome se nalaze (*Willekens et al.* 1997; *Mhamdi et al.* 2010b). Klasa I je dominantna u fotosintetskom tkivu, klasa II u vaskularnm tkivu i listovima i klasa III u reproduktivnom tkivu i semenima (*Willekens et al.* 1997). U zreloj rozeti model biljke *Arabidopsis*, detektovane su sve tri klase, s tim što je klasa III najmanje zastupljena (*Mhamdi et al.* 2010b). Katalaze se prvenstveno nalazi u peroksizomima (u peroksizomima *Arabidopsis*a utvrđeno je prisustvo sve tri klase), mada je detektovana i u mitohondrijama kukuruza, slika 2.17 (CAT-3, koja pripada klasi II) (*Scandalios*, 1997; *Mittler* 2004; *Mhamdi et al.* 2010b).

U zaključku, katalaza se smatra energetske vrlo efikasnim enzimom, ne samo zbog katalitičkih osobina, već i zbog toga što je jedini je antioksidantni enzim koji ne troši redukcionu ekvivalente i ne produkuje nove ROS (*Bienert et al.* 2007, *Mhamdi et al.* 2010b).

2.4.1.3. Peroksidaze III klase (POD, EC 1.11.1.7)

Sve klase peroksidaza (ima ih tri) imaju hem grupe u aktivnom mestu i sličnu trodimenzionalnu strukturu (*Cheeseman* 2007). Klasa III peroksidaza predstavlja brojnu grupu glikozilovanih izoformi, različitih po masi, pI vrednosti, pH optimumu, lokalizaciji u ćeliji i

afinitetu prema supstratu (Cheeseman 2007; Kukavica et al. 2009, 2012; Morina et al. 2013). U biljci *Arabidopsis* identifikovane su 73 sekvence koje kodiraju različite izoforme POD (Cheeseman 2007). Nalaze se u vakuoli, apoplastu (solubilne, i jonski i kovalentno vezane za ćelijski zid) i citosolu, slika 2.17 (Takahama & Oniki 1997; Liskay et al. 2003; Takahama 2004; Mittler 2004; Kukavica et al. 2009, 2012; Ferreres et al. 2011). Zajedničko im je da su nespecifične, tj. da mogu da koriste veliki broj fenolnih jedinjenja, amine, indole, alkaloida i sulfonate kao donore elektrona za redukciju H_2O_2 (Ferreres et al. 2011). Štaviše, hidroksibenzojeve kiseline (siringinska, SyA; vanilinska i protokatehuinska, PrcA), hidroksicinamične kiseline (kafeinska, CA; *p*-kumarna, *p*-CA i ferulinska kiselina, FA) i njihovi derivati (estri, npr. rosmarinska, RA i hlorogena kiselina, CGA), katehin (Cat), kvercetin (Q), kaempferol (K), antocijani i hormon indol-3-sirćetna kiselina, IAA su zapravo endogeni supstrati za POD (Yamasaki et al. 1997; Chan et al. 1999, Ward et al. 2003; Takahama 2004; Hadži-Tašković Šukalović et al. 2005; Cheeseman 2007; Ferreres et al. 2011). Najčešće pominjana i najviše izučavana POD je poreklom iz rena (*horseradish peroxidase*, HRP) koja može da oksiduje gvajakol, pirogalol, ABTS, CN^- , NADH, tiol jedinjenja i IAA (Halliwell & Gutteridge 2007).

U uslovima u kojima se H_2O_2 značajno stvara u hloroplastima i peroksizomima, dolazi do njegove difuzije u vakuolu (Mullineaux & Karpinski 2002; Takahama 2004; Ferreres et al. 2011), ili u slučaju oksidativnog 'burst'-a iz apoplasta kroz akvaporine i peroksioprine u plazminoj membrani u citosol te ili susedne ćelije (Neill, Desikan & Hancock 2002; Bienert et al. 2007). U vakuoli i apoplastu POD uz učešće Asc i fenolnih jedinjenja efikasno detoksikuju H_2O_2 (Takahama & Oniki 1997; Ferreres et al. 2011). Funkcije POD u apoplastu i ćelijskom zidu su izuzetno važne za svakodnevni metabolizam i rast biljne ćelije, jer polimerizovanjem hidroksicinamil- (koniferil-, sinapil-, cinamil- i *p*-kumaril-) alkohola nastaje lignin koji daje stabilnost sekundarnom ćelijskom zidu (Lewis & Yamamoto 1990; Ward et al. 2003). Uz to, oksidovanjem auksina, IAA, POD učestvuju u njegovom katabolizmu (Liskay et al. 2003). Zato je njihova funkcija važna kod zarastanja povreda, odbrani od patogena i u sezonskom venjenju listova (Bolwell et al. 2002; Kukavica & Veljović Jovanović 2004; Cheeseman 2007). Međutim, POD mogu da proizvode H_2O_2 u ćelijskom zidu (Chen & Schopfer 1999; Bolwell et al. 2002) ili oksidujući NADH u prisustvu *p*-kumarne kiseline kao fenolnog kofaktora, dok prisustvo Mn^{2+} (0.25 mM) katalizuje reakciju (Hadži-Tašković Šukalović et al. 2005).

2.4.1.4. Askorbat-peroksidaza (APX, EC 1.11.1.11)

Askorbat-peroksidaza se ubraja u peroksidaze I klase (Raven 2003; Wada et al. 2003). Njena osnovna uloga je u detoksikaciji H_2O_2 u hloroplastima, ali i drugim ćelijskim odeljcima, slika 2.17 (Nakano & Asada 1981; Jiménez et al. 1997; Noctor & Foyer 1998a; Shigeoka et al. 2002; Asada 1992, 2006; Mittler 2004).

Za redukciju jednog molekula H_2O_2 APX troši dva molekula Asc, koji se oksiduju do mono-(semi)dehidroaskorbil-radikala (MDA \cdot) (Schigeoka et al. 2002; Asada 2006). Monodehidroaskorbil-radikal spontano disproporcioniše na Asc i dehidroaskorbat (DHA), slika 2.17. Za razliku od CAT, APX ima visok afinitet za vodonik-peroksid (Mittler & Zilinskas 1991a; Willekens et al. 1997).

U listovima model biljke Arabidopsisa, spanaća, čaja, graška, pšenice, kukuruza, duvana i pirinča identifikovane su različite izoforme APX: tri APX izoforme locirane u hloroplastima: dve solubilne, stromalna (sAPX) i lumenska (koja se retko pominje u drugim vrstama, APX4 u Arabidopsisu) i membranska, tilakoidna (tAPX); dve solubilne u citosolu (cAPX; u Arabidopsisu: APX1 i APX2), mitohondrijama (mitAPX) i u mikrotelima (peroksizomima i gliksizomima, mAPX; u Arabidopsisu: APX3 i APX5), slika 2.17 (Mittler & Zilinskas 1991a,b; Asada 1992, Miyake et al. 1993; Jiménez et al. 1997; Ishikawa et al. 1998; Yosimura et al. 1998; Leonardis et al. 2000; Schigeoka et al. 2002, Raven 2003; Mittler 2004; Ishikawa & Schigeoka 2008). Peroksizomalna izoforma APX je vezana za citosolnu stranu membrane ovih organela, slika 2.17 (del Rio et al. 2003). Tilakoidna APX je ukotvljena u tilakoide stroma u blizini PS I i zajedno sa Cu/ZnSOD čini tilakoidni sistem za detoksikaciju $O_2^{\cdot-}$ i H_2O_2 (Asada 2000, 2006). Koliko je važna uloga APX u biljnoj ćeliji svedoče i brojne studije u kojima se APX izoforme značajno ekspimiraju u slučajevima kada su biljke bile izlagane abiotkim stresorima (Karpinski et al. 1997; Kubo et al. 1999; Yosimura et al. 2000; Schigeoka et al. 2002; Mittler 2004; Kangasjärvi et al. 2008). Hloroplastne APX, mitAPX i mAPX su monomeri, a je cAPX homodimer. Molekulske mase monomera variraju od 27 do 35 kDa (Raven 2003). Različite izoforme pokazuju različit afinitet prema Asc, a najveći afinitet pokazuju mitohondrijska i hloroplastne izoforme (Yosimura et al. 1998; Schigeoka et al. 2002).

Najkarakterističnija osobina svih APX izoformi je izuzetna nestabilnost u odsustvu Asc. Kada je u okruženju enzima $[Asc] < 20 \mu M$, polovina aktivnosti hloroplastnih izoformi se inhibira za manje od 30 sekundi, dok su cAPX i mAPX nešto tolerentnije i njihovo vreme poluživota iznosi oko 1 sat i više (Hossain & Asada 1984; Nakano & Asada 1987; Miyake & Asada 1992; Schigeoka et al. 2002; Wada et al. 2003; Ishikawa & Shigeoka 2008). Nestabilnost je posledica oksidativne degradacije hema, usled razlike u konformaciji ovih izoformi. U hloroplastnim APX, propionski ostatak hema izloženiji je oksidativnom dejstvu (npr. H_2O_2), jer aminokiselinski ostatak Arg¹⁶⁹ gradi vodonične veze sa karbonilnim grupama Asn¹⁸⁹ i Pro¹⁹⁰ koji se nalaze u domenu petlje koja nedostaje u cAPX (Wada et al. 2003). U oba slučaja, pokazano je da se molekul Asc vezuje sa propionskim ostatkom hema, čime ga stabilizuje (Wada et al. 2003).

2.4.1.5. Monodehidroaskorbat-reduktaza (MDAR, EC 1.6.5.4).

Monodehidroaskorbat-reduktaza (MDAR) redukuje MDA^{\bullet} nastao oksidacijom Asc koristeći NADH ili NADPH kao elektron donor, u zavisnosti od izoforme, slika 2.17 (Hossain et al. 1984; Smirnoff 2000; Asada 2006; Foyer & Noctor 2011). MDAR sadrži flavin-adenin-dinkuleotid (FAD) prostetičnu grupu i tiolnu grupu u aktivnom mestu (Hossain & Asada 1985; Bérczi & Møller 2000). To je jedini do sada poznati enzim koji koristi organski radikal kao supstrat, a pokazano je da redukuje i fenoksi-radikale (npr. poreklom od kvercetina, kafeinske, ferulinske i hlorogene kiseline) koristeći NAD(P)H kao donor elektrona na sličan način kao i MDA^{\bullet} (Sakihama et al. 2000). Ovaj enzim je lokalizovan u hloroplastima, citosolu, mitohondrijama, peroksizomima, plazma membrani i u apoplastu listova, slika 2.17 (Hossain et al. 1984; Jiménez et al. 1997; Vanacker et al. 1998; Bérczi & Møller 2000; Mittler 2004; Leterrier et al. 2005). Citosolna i hloroplastna izoforma imaju bazniji pI u odnosu na peroksizomalnu (Leterrier et al. 2005). Peroksizomalna izoforma MDAR je transmembranska i u stanju je da oksiduje NADH iz matriksa peroksizoma i da prenese elektrone do MDA^{\bullet} u citosolu, slika 2.17 (del Rio et al. 2003). Kako je koncentracija Asc u apoplastu jako niska, smatra se da je MDAR u ovom odeljku zadužena za re-redukciju fenoksi-radikala nastalih u reakcijama sa POD (Sakihama et al. 2000).

Porast aktivnosti MDAR je uočena nakon izlaganja biljaka visokom intenzitetu PAR (Gechev et al. 2003), niskim temperaturama (Oidaira et al. 2000) i UV-B zračenju (Kubo et

al.1999). Ekspresija peroksizmalne izoforme MDAR u Arabidopsisu se indukuje izlaganjem biljaka niskim temperaturama i mehaničkim povređivanjem (Leterrier et al. 2005).

2.4.1.6. Dehidroaskorbat-reduktaza (DHAR, EC 1.8.5.1)

Dehidroaskorbat-reduktaza (DHAR) redukuje DHA do Asc, uz učešće GSH (Hossain & Asada 1984b; Polle 2001; Yamasaki et al. 1999; Mittler 2004). U početku se smatralo da se DHA redukuje GSH neenzimski u ćeliji (Foyer & Halliwell 1976) pošto je *in vitro* ova reakcija moguća (Yamasaki et al. 1999). Prvo izolovanje i prečišćavanje ovog enzima je urađeno iz hloroplasta spanaća (Hossain & Asada 1984b). Kasnije je potvrđeno prisustvo novih izoformi DHAR u citosolu, peroksizomima i mitohondrijama, slika 2.17 (Urano et al. 2000; del Rio et al. 2003; Mittler 2004). Hloroplastna izoforma ima veći afinitet za DHA, dok je citosolna otpornija na visoke temperature (Amako et al. 2006). Pokazano je da je DHAR monomer, Mm između 24 i 27 kDa, da je neglikozilovan i da mu je za aktivnost neophodna aktivnost tiol grupa (Hossain & Asada 1984; Urano et al. 2000; Amako et al. 2006).

Transformisane biljke sa povećanom ekspresijom DHAR pokazuju veću toleranciju na povišene koncentracije soli, tretman metilviologenom i ozonom (Chen & Gallie 2004, Lee et al. 2007), dok biljke koje imaju nižu aktivnost DHAR imaju smanjenu asimilaciju CO₂, nižu koncentraciju *hl a* u listovima i sporije rastu (Chen & Gallie 2006).

2.4.1.7. Glutation-reduktaza (GR, EC 1.6.4.2)

Glutation-reduktaza je enzim prisutan kod svih organizama, neophodan za prevođenje molekula oksidovanog (GSSG) u dva molekula redukovanog glutaciona (GSH), uz utrošak NADPH kao elektronskog donora (Foyer & Halliwell 1976; Noctor & Foyer 1998a, Mittler 2004). U biljkama je postoje dva gena koja kodiraju GR1 i GR2 izoforme (Mhamdi et al. 2010a). GR1 je citosolna izoforma, čija je aktivnost pokazana i u peroksizomima, a GR2 je hloroplastna izoforma, prisutna i u mitohondrijama (Jiménez et al. 1997; Mittler 2004; Mhamdi et al. 2010a). Fiziološka uloga GR2 još nije u potpunosti objašnjena. Skorašnja istraživanja su pokazala da je GR1 potrebna za rast biljaka u optimalnim uslovima (Mhamdi et al. 2010a). Pokazano je da je uloga GR1 izoforme povezana sa putevima H₂O₂ i hormonske regulacije kontrole dužine dana i odgovora na napade patogena (Mhamdi et al. 2010a).

2.4.2. Neenzimski antioksidanti

Osim enzima, u direktnom uklanjanju ROS, kao što $O_2^{\cdot-}$, $\cdot OH$, 1O_2 učestvuju hidrofilni molekuli Asc, GSH i određena fenolna jedinjenja, zajedno sa lipofilnim α -tokoferolom i karotenoidima (Buettner 1993; Mittler 2004; Smirnov 2008). Ovi molekuli zahtevaju prisustvo enzima ili drugih metabolita za svoju regeneraciju, ali se na kraju ceo sistem oslanja na reduktivne ekvivalente u formi NADPH koji se preferencijalno obnavljaju u fotosintetskom linearnom elektronskom transferu (Noctor & Foyer 1998a; Mittler 2004; Foyer & Shigeoka 2011).

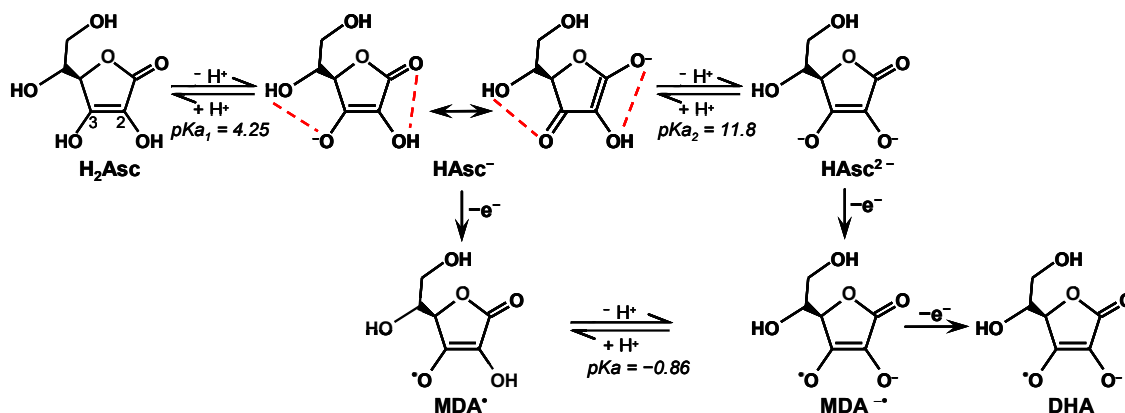
Najzastupljeniji neenzimski antioksidanti u biljkama su Asc i GSH i oni zajedno sa peroksiredoksinima imaju glavnu ulogu u detoksikaciji H_2O_2 , ali imaju i tačno definisane, različite uloge u prenosu redoks-signalu (Foyer & Shigeoka 2011; Munné-Bosch et al. 2013).

2.4.2.1. Askorbat

L-Askorbat, vitamin C, je najzastupljeniji i najvažniji hidrofilni antioksidant u biljkama (Noctor & Foyer 1998a; Foyer & Noctor 2003, 2011). Osim redoks puferovanja, Asc je važan za rast i razvoj biljne ćelije (Smirnov 2000; Veljović Jovanović et al. 2001; Foyer & Noctor 2011). Prisutan je u hloroplastima, jedru, peroksizomima, citosolu, mitohondrijama, vakuoli i apoplastu, slika 2.17 (Foyer et al. 1983; Vanacker et al. 1998; Smirnov 2000; Veljović Jovanović et al. 2001; Takahama 2004; Foyer & Noctor 2009b; Zechmann 2011; Zechmann et al. 2011; Heyneke et al. 2013). Imunohistohemijskim metodama pokazano je da je koncentracija Asc u model biljci Arabidopsisu najveća u peroksizomima, citosolu i jedru, a zatim u hloroplastima, mitohondrijama i vakuoli (Zechmann 2011). Askorbat je prisutan u gotovo svim biljnim tkivima, izuzev suvih semena (De Gara et al. 1997). Važnost Asc za metabolizam biljne ćelije ogleda se u činjenici da zeleni listovi uglavnom sadrže veću koncentraciju Asc nego hl; Asc čini više od 10% ukupnih rastvornih ugljenih hidrata (Noctor & Foyer 1998a; Leferink et al. 2009; Gest et al. 2012). Totalni sadržaj Asc u listovima zavisi ne samo od vrste biljnog tkiva, već i od stadijuma razvoja, dostupnosti nutrijenata, temperature, dnevnog ritma, kvaliteta i kvantiteta svetlosti i oksidativnog pritiska iz spoljne sredine (Veljović Jovanović et al. 2001; Kukavica & Veljović-

Jovanović 2004; Bartoli et al. 2006, 2009; Foyer & Noctor 2011; Gest et al. 2012; Page et al. 2012; Morina et al. 2013; Heyneke et al. 2013).

Askorbat može da se sintetiše u zelenom tkivu, ali i u onom koje ne sadrži hlorofil, tako da se smatra da njegova biosinteza ne zavisi od fotosinteze (Noctor & Foyer 1998a). Utvrđeno je da biosinteza Asc u biljkama počinje od guanozin-difosfat-manoze (GDP-Man), preko GDP-galaktoze (GDP-Gal) i L-Gal-1,4-laktona (GalL) (Smirnov 2000, 2008; Valpuesta & Botella 2004). Poslednji korak oksidacije GalL do Asc obavlja enzim GalL-dehidrogenaza (GalLDH, EC 1.3.2.3) koja je aktivna kada je tiolna grupa u aktivnom mestu redukovana (Leferink et al. 2009). Ovaj enzim je vezan za kompleks I respiratornog lanca u unutrašnjoj membrani mitohondrija (periferni membranski protein) i elektrone sa GalL koristi da redukuje cyt c (Millar et al. 2003; Leferink et al. 2009; Schertl et al. 2012).



Slika 2.18. Hemijska struktura askorbata i njegovih proizvoda disocijacije i oksidacije. Na fiziološkom pH askorbat je u obliku monoanijona (HAsc^-) koji je rezonantno stabilizovan. Lako se oksiduje do MDA^\bullet (takođe stabilizovan rezonancijom) i zatim do DHA. Crvenim isprekidanim linijama su prikazane intramolekulske vodonične dve rezonantne strukture HAsc^- .

Askorbinska kiselina je slaba, diprotična kiselina, slika 2.18. Endiolna grupa C2-C3 u konjugaciji sa karbonilnom grupom laktonskog prstena čini proton sa hidroksilne grupe na C3 kiselim ($\text{pK}_{a1} = 4.25$) za razliku od C2 hidroksilnog protona ($\text{pK}_{a2} = 11.8$). Zato je na fiziološkom pH dominantni oblik (mono)anjon (HAsc^-) koji je stabilizovan rezonancijom i intramolekulskim vodoničnim vezama, slika 2.18. Askorbinska kiselina postoji u ravnoteži između dva tautomerna oblika, keto- i enolnog. U alkalnim rastvorima favorizovan je enolni tautomer, a u kiselim stabilniji oblik je keto-izomer.

Gubitkom elektrona iz C2-C3 endiolne grupe nastaje rezonantno stabilan radikal, MDA^\bullet (slika 2.18) sa delokalizovanim π -elektronima iznad tri C atoma. Radikal MDA^\bullet

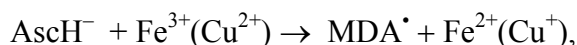
spontano disproporcioniše na Asc i DHA brzinom oko $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ na pH 7 (*Hossain & Asada* 1985). Ukoliko se brzo ne redukuje do Asc, DHA se ireverzibilno degradira otvaranjem laktonskog prstena, preko 2,3-diketogulonata do L-treonata, oksalata ili tartarata (*Deutsch* 2000; *Valpuesta & Botella* 2004; *Green & Fry* 2005; *Debolt et al.* 2007).

U ćelijama su prisutni svi produkti oksidacije askorbata, ali je najviše redukovanog Asc, koji se regeneriše preko Asc-GSH ciklusa (*Noctor & Foyer* 1998a; *Noctor* 2006). Pošto ovaj ciklus troši NADPH u hloroplastima, smatra se alternativnim potrošačem elektrona linearnog elektronskog transfera. Redoks-stanje Asc u apoplastu reguliše enzim Asc-oksidaža (AO, EC 1.10.3.3), lokalizovana u ćeljskom zidu, tako što katalizuje oksidaciju Asc i istovremeno redukciju O_2 do H_2O_2 (*Pignocchi et al.* 2003; *Green & Fry* 2005). Redoks koeficijent Asc se definiše kao odnos redukovanog i ukupnog askorbata i predstavlja indikator redoks-stanja ćelije, odnosno marker stepena oksidativnog stresa (videti potpoglavlje 2.5). Unutarćeljski redoks koeficijent Asc u zdravim biljkama je izuzetno visok i iznosi oko 0.85-0.95 (*Sanmartin et al.* 2003; *Noctor* 2006; *Foyer & Noctor* 2011). Niže vrednosti ukazuju na pojačanu akumulaciju ROS kao npr. u listovima graška (*Kalbin et al.* 1997) ili ječma (*Hideg et al.* 2006) izlaganih visokim nivoima UV-B zračenja. Ćelije u kulturi, kao što su ćelije duvana BY-2 linije, imaju niži redoks koeficijent (0.73-0.88; *De Pinto et al.* 1999). Takođe, niži redoks koeficijent Asc je često detektovan u apoplastu (*Veljović Jovanović et al.* 2001; *Pignocchi et al.* 2003; *Sanmartin et al.* 2003; *De Pinto & De Gara* 2004, *Kärkönen & Fry* 2006).

Funkcije Asc u biljkama su mnogobrojne. Askorbat ima centralnu ulogu u zaštiti fotosinteze kroz više funkcija (*Noctor & Foyer* 1998a; *Smirnoff* 2000, 2008; *Foyer & Noctor* 2011). Prvo, Asc predstavlja supstrat za APX i prvi reduktant u uklanjanju H_2O_2 , nastalog u Melerovoj reakciji na PS I. Kao što je pomenuto u pododjeljku 2.3.2.1. nastao MDA^\bullet radikal može direktno da prima elektrone sa Fd i učestvuje u voda-voda ciklusu, čime relaksira PS II pri povišenom ekscitacionom pritisku (*Miyake & Asada* 1992; *Asada* 2000; 2006). Askorbat učestvuje i u Asc-GSH ciklusu u drugim ćeljskim odeljcima, slika 2.17. Sledeća važna uloga Asc u fotosintezi je u termalnom rasipanju viška ekscitirane energije (NPQ) u okviru PS II, gde predstavlja kofaktor za VDE (odjeljak 2.2.3). Pri visokim intenzitetima PAR kada je kompleks za razdvajanje vode inaktiviran, Asc može da posluži kao privremeni donor elektrona reakcionom centru PS II (*Munné-Bosch* 2013). Kao sekundarni antioksidant

redukuje oksidovanu formu α -tokoferola (Buettner 1993; Smirnov 2008). Askorbat je u stanju da neenzimski gasi $^1\text{O}_2$ i da direktno redukuje $\text{O}_2^{\cdot-}$ i $^{\cdot}\text{OH}$ (Buettner & Jurkiewicz 1996; Smirnov 2008). Kao što je napomenuto, fenoksi-radikali nastali u reakciji uklanjanja H_2O_2 u vakuolama pomoću POD mogu da se redukuju pomoću Asc i MDA^{\cdot} . Na taj način Asc i MDA^{\cdot} mogu da budu posmatrani i kao sekundarni donori elektrona za peroksidaznu reakciju uklanjanja H_2O_2 u vakuoli i apoplastu (Takahama & Oniki 1997; Takahama 2004; Ferreres et al. 2011).

Osim antioksidativne uloge, Asc može da bude i prooksidant, posebno u prisustvu tragova jona prelaznih metala (npr. Cu^{2+} i Fe^{3+}) kako je i pokazano *in vitro* (Kanner et al. 1977; Buettner & Jurkiewicz 1996). Kao jako redukujuće sredstvo on može da redukuje prelazne metale:



aktivirajući ih za učešće u Fentonovoj i Haber-Vajsovoj reakciji (odjeljak 2.3.2). Prisutan u niskim koncentracijama Asc se ponaša kao prooksidant, a u višim kao antioksidant.

Askorbat učestvuje u deobi ćelija i regulaciji ćelijskog ciklusa; nedostatak u meristemskim ćelijama zaustavlja ćelijski ciklus u G1 fazi (Noctor & Foyer 1998a). Učestvuje u biosintezi hormona: abscisinske i giberelinske kiseline i etilena (Foyer & Noctor 2011). Zatim, kao kofaktor hidroksilaza koje učestvuju u formiranju hidroksiprolina, Asc je uključen u sintezu ekstenzina, potrebnog u stvaranju vakuola, širenju ćelijskog zida i elongaciji biljnih ćelija (Noctor & Foyer 1998a). Hidroksilaciju C-prstena flavonoida u sintezi flavona, flavonola i antocijanidina katalizuju flavanon-3 β -hidroksilaza, flavonol- i antocijanidin-sintaza (slika 2.18), za čiju je aktivnost, pored kofaktora 2-oksoglutarata i Fe^{2+} , potreban i Asc (pododjeljak 2.4.2.4; Forkman et al. 1980; Springob et al. 2003; Turnbull et al. 2004, Page et al. 2012).

U metodološkom smislu, nakon svega što je pomenuto, jasno je da je pouzdana ekstrakcija i određivanje redukovanog i oksidovanog oblika askorbata priličan izazov. Da bi dobijeni redoks koeficijent Asc bio pouzdan marker oksidativnog stresa u lišću, ekstrakciju Asc treba raditi na hladnom, na niskom pH, u prisustvu helatora metala i inhibitora AO (u tu svrhu može se dodati se NaN_3 u ekstrakcionu medijum) (Sanmartin et al. 2003; Eitenmiller et al. 2008). Problem nastaje i pri određivanju Asc iz listova bogatim fenolnim jedinjenjima, upravo zbog pomenute reaktivnosti sa fenoksi-radikalima.

2.4.2.2. Glutation

Glutation u biljnim ćelijama postoji u redukovanom obliku (GSH; tripeptid, γ -Glu-Cys-Gly), u oksidovanom, disulfidnom obliku (GSSG, vezan za još jedan GSH) ili kao mešoviti disulfid (GS-SP, vezan za tiolnu grupu proteina) (Noctor & Foyer 1998a; Lamotte et al. 2000; Meyer & Hell 2005; Noctor et al. 2011). Veza γ -COOH grupe Glu sa amino-grupom Cys razlikuje glutacion od klasičnih peptidnih veza u proteinima.

Koncentracija ukupnog glutaciona u ćelijama se kreće u opsegu 1-5 mM, dok je sadržaj u listovima oko 100-1000 nmol po g svežeg tkiva (Noctor & Foyer 1998a, 1998b; Cuypers et al. 2001; Noctor et al. 2011). Kao i u slučaju Asc, i koncentracija GSH u tkivu zavisi od više faktora (Veljović Jovanović et al. 2001; Diaz-Vivancos 2010; Mhamdi et al. 2010a; Noctor et al. 2011). Glutation se sintetiše u dva koraka počevši u plastidima, pomoću enzima γ -glutamilstein-sintetaze, a zatim uz učesće glutacion-sintetaze u plastidima ili u citosolu fotosintetski aktivnih i neaktivnih ćelija (Noctor et al. 2002b; Kopriva & Rennenberg 2004; Meyer & Hell 2005; Koprivova et al. 2010). Skora istraživanja su pokazala da je glutacion najzastupljeniji u mitohondrijama, jedru, citosolu i peroksizomima, zatim u plastidima, a zanemarljivo niske koncentracije nađene su u vakuoli (0.03-0.04 mM) (Zechmann et al. 2008; Queval et al. 2011; Han et al. 2013; Heyneke et al. 2013; Tolin et al. 2013). Pod određenim abiotičkim stresorima ovaj poredak može da se promeni (Queval et al. 2011; Heyneke et al. 2013). Prihvaćeno je da ga u apoplastu nema, ili da je prisutan u zanemarljivo maloj količini (Vanacker et al. 1998; Pignocchi et al. 2003; Zechmann et al. 2008), mada se apoplasti i vakuole smatraju mestom katabolizma GSSG (Masi et al. 2007; Noctor et al. 2011). Naime, u plazminoj membrani, ćelijskom zidu i tonoplastu se nalaze različite izoforme γ -glutamil transpeptidaze (GGT1-4; EC 2.3.2.2) koja započinje degradaciju GSSG (Masi et al. 2007; Ferretti et al. 2009; Destro et al. 2010). U skladu sa tim su i rezultati tima Antonia Masija, koji ukazuju na prisustvo glutaciona u apoplastu *ggt1⁻* mutanata Arabidopsisa (Masi et al. 2007; Ferretti et al. 2009; Tolin et al. 2013).

Brojne funkcije GSH u ćeliji vezane su za njegovo redoks-stanje, mogućnost konjugovanja i za metabolizam sumpora (Noctor & Foyer 1998a; Lamotte et al. 2000; Kopriva & Rennenberg 2004; Noctor et al. 2011). Glutation je pre svega, važan činilac u održavanju redoks-stanja u ćeliji (Foyer & Noctor 2005; Noctor 2006). Kao i u slučaju Asc,

redoks-stanje glutationa: $[GSH]/([GSH]+2[GSSG])$, smatra se indikatorom oksidativnog stresa u ćelijama (Noctor & Foyer 1998a; Meyer & Hell 2005; Foyer & Noctor 2011). U optimalnim uslovima redoks-stanje varira između 0.83-0.95 i održava se uglavnom pomoću GR, ali i Trx i peroksiredoksinog sistema (Noctor & Foyer 1998a; Queval & Noctor 2007; Mhamdi et al. 2010a; Foyer & Shigeoka 2011). Redukovani glutation, osim što predstavlja kofaktor DHAR u Asc-GSH ciklusu, predstavlja kofaktor i glutation-peroksidazi koja ga koristi u direktnoj redukciji H_2O_2 u hloroplastima (Noctor et al. 2002b).

Tiolne grupe enzima neophodne za enzimsku aktivnost predstavljaju osnovu regulacije mnogih procesa u ćeliji. Vodonik-peroksid koji se akumulira kao posledica spoljnih faktora učestvuje, preko oksidacije tiolnih grupa, u modifikaciji enzimske aktivnosti i transkripcionih faktora koji dovode do promene u genskoj ekspresiji (Mullineaux & Karpinski 2002; Neill, Desikan & Hancock 2002). Glutation štiti redoks stanje ovih tiolnih grupa i zapravo predstavlja tiolni pufer u ćeliji (Meyer & Hell 2005; Noctor 2006). U skorije vreme pokazana je njegova direktna uloga u indukciji ekspresije gena odgovornih za održavanje redoks-stanja tokom deoba ćelija i u NO^* i H_2O_2 zavisnim signalnim putevima u ćeliji (Noctor et al. 2002b; Diaz-Vivancos et al. 2010; Mhamdi et al. 2010a; Munné-Bosch et al. 2013). Ovo poslednje se odnosi na aktivnost GR1, potrebne za održavanje optimalnog redoks-stanja GSH potrebnog za pozitivnu regulaciju gena uključenih u prenos signala putem hormona jasmonske kiseline tokom prilagođavanja biljaka različitoj dužini dana (Mhamdi et al. 2010a). U skorije vreme, u Arabidopsisu je pokazana veza i između redoks-stanja GSH i metabolizma i transporta IAA u korenu (Koprivova et al. 2010). Utvrđeno je da značajno smanjenje odnosa $[GSH]/[GSSG]$ predstavlja signal koji vodi u ćelijsku smrt ili dormanciju (Kranner et al. 2006).

Glutation gradi netoksične komplekse sa metalima olakšavajući time njihovo odvajanje u vakuoli (Cobbett et al. 2002; Meyer & Hell 2005; Foyer & Noctor 2011). Konjugacijom GSH, pomoću glutation S-transferaze, sa ksenobioticima ili metabolitima, poput antocijanidina ili IAA, omogućen je njihov transport i deponovanje u vakuoli (Noctor et al. 2002b; Meyer & Hell 2005; Koprivova et al. 2010). Glutation je i prekursor u sintezi fitohelatina, proteinskih molekula koji heliraju jone teških metala i omogućavaju njihovo odlaganje u vakuoli (Cobbett et al. 2002; Koprivova et al. 2010; Noctor et al. 2011).

2.4.2.3. Fenolna jedinjenja

Fenolna jedinjenja su široko rasprostranjena klasa sekundarnih metabolita sa brojnim strukturnim i zaštitnim ulogama u biljkama (Gould & Lister 2005; Lattanzio et al. 2006; Agati & Tattini 2010). Biosinteza fenola, preko šikimatskog puta, zavisi od dostupnih prekursora: fosfoenolpiruvata (PEP) iz glikolitičkog puta i eritrozo-4-fosfata (E4P) iz reduktivnog pentozofosfatnog puta (opisano u poglavlju 2.2.4). Svi enzimi šikimatskog puta su locirani u plastidima, a povezanost sa linearnim elektronskim transportom obezbeđuje i činjenica da je za aktivnost prvog enzima koji katalizuje ligaciju PEP i E4P neophodno prisustvo redukovano Trx (Tzin & Galili 2010). Preko 20% ugljenika koji se fiksira u fotosintezi se usmerava u šikimatski put (Jensen et al. 1986), u kom nastaje horizmat, a od njega zatim fenilalanin i tirozin, prekursori svih fenolnih jedinjenja (Tzin & Galili 2010; Vogt 2010), što samo ukazuje na važnost fenolnih jedinjenja za metabolizam biljaka.

U hemijskom smislu, fenolna jedinjenja su jedinjenja koja u svojoj strukturi sadrže aromatični prsten sa najmanje jednom hidroksilnom grupom. Osnovni gradivni blok za izgradnju polifenola predstavlja fenililpropanoidna jedinica (C₆-C₃; Pereira et al. 2009). Na osnovu kompleksnosti hemijske strukture, prirodna fenolna jedinjenja se dele na: hidroksibenzojeve kiseline (HBA, C₆-C₁), hidroksicinamične kiseline (HCA, C₆-C₃), kumarine (C₆-C₃), flavonoide (C₆-C₃-C₆), proantocijanidine [(C₆-C₃-C₆)_n], stilbene (C₆-C₂-C₆), lignane (C₆-C₃-C₃-C₆) i lignine [(C₆-C₃)_n], slika 2.19 (Antolovich et al. 2000). U odnosu na prirodu C₃ elementa, flavonoidi se dele na flavone, flavon-3-ole, flavanone, flavanole, izoflavone, halkone i antocijanidine, slika 2.19 (Neill 2002; Marais et al. 2006, Lattanzio et al. 2006).

Ovakvu raznolikost obezbeđuju mnogi enzimi: hidroksilaze i oksigenaze iz porodice Cyt P450, oksidoreduktaze, ligaze, transferaze koji su uglavnom organizovani u multienzimske komplekse (Winkel 2004; Petrusa et al. 2013). Ovi kompleksi, poput flavonoidnog metabolona su locirani na citosolnoj strani membrane endoplazmatičnog retikuluma (Saslowsky & Winkel-Shirley 2001, Winkel 2004), mada su pojedini enzimi detektovani i u hloroplastima, vakuolama, jedru i u citosolu (Saslowsky et al. 2005; Tian et al. 2008; Wang et al. 2010; Petrusa et al. 2013). Konjugovanjem sa GSH pomoću GSH-S transferaze ili pomoću vezikula, sintetisani flavonoidi, aglikoni ili glikozidi, se preko

Fenoli se gotovo uvek akumuliraju kao posledica izlaganja biljaka abiotskim i biotskim stresorima (*Dixon & Paiva 1995, Winkel-Shirley 2002; Neill & Gould 2003, Michalak 2006; Ferreres et al. 2011*). Koji će se fenoli akumulirati zavisi od biljne vrste, funkcije fenola, ali i od tipa stresa (*Gould & Lister 2005; Hernández et al. 2009; Agati et al. 2012*). Strukturna uloga fenola se bazira na tome što izgrađujući lignin ulaze u sastav sekundarnog ćelijskog zida biljaka (*Dixon & Paiva 1995*). Polimerizacijom, lignin formira unakrsne kovalentne veze sa polimerima polisaharida i proteina i ojačava ćelijski zid, čineći ga otpornim na mehaničko i enzimsko delovanje, čime ćelijski zid postaje prva linija odbrane protiv patogena, insekata i ostalih herbivora (*Lattanzio et al. 2006*). Fenilpropanoidi, posebno derivati HCA, učestvuju u izgradnji ćelijskog zida, esterifikujući različite molekule ugljenih hidrata (*Agati et al. 2012*). Osim toga, glikozidi fenilpropanoida i flavonoida se akumuliraju u vakuolama epidermalnih ćelija (*Gould et al. 2002; Ferreres et al. 2011*). Zbog jake apsorpcije u UV-oblasti spektra, flavonoidi (oko 260 i 350-380 nm) i HCA (oko 310-330 nm) u epidermisu predstavljaju štit, zaklon mezofilnim ćelijama od UV komponente sunčevog zračenja (*Chen & Ahn 1998; Morales et al. 2010; Pollastri & Tattini 2011; Agati et al. 2012*).

S druge strane, antocijani imaju maksimume apsorpcije oko 260-280 nm i od 515-550 nm, pa cijanični listovi (crvenkasti listovi bogati antocijanima) apsorbuju zeleni deo PAR srazmerno logaritmu njihove koncentracije (*Neil 2002*). Kao posledica toga, cijanični listovi imaju sniženu kvantnu efikasnost PS II (*Neill & Gould 2003; Hughes 2005*). Međutim, antocijani apsorbuju svetlost koja bi predstavljala višak molekulima *hl* u mezofilu i tako štite fotosintetski aktivne ćelije od pojačanog ekscitacionog pritiska i potencijalnog fotooksidativnog stresa (*Gould et al. 1995; Neill 2002*). U prilog tome je i činjenica da je biosinteza antocijana stimulirana povišenim intenzitetom PAR i niskim temperaturama (*Neill 2002; Neil & Gould 2003; Hughes 2005; Page et al. 2012; Heyneke et al. 2013*).

Važnu ulogu fenolna jedinjenja imaju kao antioksidanti (*Rice-Evans et al. 1996; Chen & Ahn 1998; Gould et al. 2002; Neill et al. 2002; Agati et al. 2007, 2013; Hernández et al. 2009; Agati & Tattini 2010*). Pokazano je da antocijanidini i flavonoli, poput delfinidina, cijanidina (Cy) i Q imaju više od četiri puta jaču antioksidativnu aktivnost od Asc (*Rice-Evans et al. 1996, 1997*). Hidroksilna grupa fenola je dobar donor protona i elektrona, pa tako može da reaguje sa ROS i RNS gradeći stabilnije radikale (*Rice-Evans et al. 1996, Pereira et al. 2009*). Stabilizacija ovih radikala se zasniva na delokalizaciji π -elektrona, intramolekulskim

vodoničnim vezama ili kondenzaciji sa drugim radikalom (Croft 1998; Procházková et al. 2011). Osim u vakuolama epidermisa, flavonoidi su nađeni i u vakuolama mezofilnih ćelija, gde zajedno sa hidroksicinamatima predstavljaju endogene supstrate za POD i zajedno sa Asc čine efikasan sistem za uklanjanje H₂O₂ (Chan et al. 1999, Takahama 2004; Ferreres et al. 2011). Slično, POD u vakuolama koristi Cy kao donor elektrona u redukciji H₂O₂, a Asc ga zatim regeneriše (Yamasaki et al. 1997). Flavonoidi, posebno oni sa sa *orto*-dihidroksil-grupom na B prstenu detektovani su u ovojnici hloroplase i u nukleusu (Gould et al. 2002; Neill 2002; Polster et al. 2006; Agati et al. 2007, 2009; Ferreres et al. 2011; Brunetti et al. 2013).

Fenolna jedinjenja sa *orto*-dihidroksil-grupama na B prstenu mogu da heliraju jone prelaznih metala (posebno gvožđa i bakra), sprečavajući nastanak ROS (Rice-Evans et al. 1996, 1997; Chen & Ahn 1998). Međutim, fenoli mogu da se ponašaju i kao prooksidanti, povećavajući aktivnost metala helirajući ih ili redukujući ih, čime bivaju u stanju da učestvuju u Fentonovoj ili Haber Wajsovoj reakciji (Buettner 1993; Cao et al. 1997).

Ukratko, u zavisnosti od strukture i lokalizacije u listovima, fenolna jedinjenja mogu da predstavljaju zaštitni sloj (štit) od solarnog zračenja ('*sun screeners*') u epidermisu ili da deluju primarno kao antioksidanti (npr. u mezofilu) (Rice-Evans et al. 1996; Gould et al. 2002; Neill et al. 2002; Agati et al. 2009, 2012; Agati & Tattini 2010; Brunetti et al. 2013). Osim toga, fenolna jedinjenja učestvuju u prenosu signala između biljaka i korisnih mikroorganizama u rizosferi, ali akumulirani u vakuolama pružaju zaštitu i od brojnih patogena i herbivora, s obzirom na to da mogu imati antimikrobne, antifungalne ili repelentne osobine (Nagy et al. 2004; Gould & Lister 2005; Lattanzio et al. 2006). Antocijani, kao pigmenti cvetova i plodova, imaju ulogu atraktanata, kako pri oplodjenju, tako i prilikom disperzije semena. Na kraju, flavonoidi su u biljnim ćelijama uglavnom glikozilovani, i to najčešće sa dva ili tri ostatka šećernih molekula, te se mogu posmatrati i kao značajan rezervoar mono- i disaharida (Neill 2002). Osim što omogućava veću rastvorljivost, glikozilacija štiti reaktivne -OH grupe od auto-oksidacije tokom translokacije kroz ćelijske organele (Hernández et al. 2009; Brunetti et al. 2013).

2.4.2.4. Tokoferol i karotenoidi

Tokoferoli (TocOH) i karotenoidi su najzastupljeniji lipofilni AMMM (*Smirnovff* 2008; *Munné-Bosch* 2013). Kao i plastohinoli, isključivo se nalaze u hloroplastima i skladište u plastoglobulima (*Lichtenthaler* 2007). Imaju dugačak nepolaran izoprenoidni „rep“ kojim su usidreni u membrani tilakoida. U slučaju TocOH polarna, fenolna „glava“ je okrenuta ka stromi i lumenu tilakoida - što ima funkcionalni značaj kod regeneracije askorbatom (*Buettner* 1993).

Osnovna funkcija TocOH je u uklanjanju $^1\text{O}_2$ i lipidnih peroksil-radikala, čime se sprečavaju lipidno-peroksidne lančane reakcije i oštećenja tilakoidnih membrana (*Buettner* 1993; *Krieger-Liszkay et al.* 2008; *Munné-Bosch* 2013). Doniranjem elektrona, TocOH postaje rezonantno stabilizovan tokoferoksil-radikal, koji je u stanju da se re-redukuje pomoću Asc (*Buettner* 1993; *Smirnovff* 2008; *Foyer & Shigeoka* 2011). Singletni kiseonik može da se detoksifikuje tokoferolima na dva načina, ili preuzimanjem viška energije, deekscitacijom, čime $^1\text{O}_2$ postaje $^3\text{O}_2$, ili oksidovanjem, pri čemu nastaje tokoferolhinon (*Smirnovff* 2008). Tripletni hlorofil takođe može da se deekscituje TocOH (*Krieger-Liszkay* 2005). Tokoferoli mogu da direktno reaguju sa $\text{O}_2^{\cdot-}$ (sporo) i sa $\cdot\text{OH}$ (*Halliwell & Gutteridge* 2007). U zavisnosti od stepena i položaja metilacije, postoji više vrsta TocOH, α - δ , pri čemu je α -TocOH najzastupljeniji u listovima. α -Tokoferol je glavni TocOH koji se akumulira u hloroplastima listova izloženih visokom intenzitetu PAR (*Munné-Bosch et al.* 2013).

Karotenoidi imaju suštinske funkcije u fotosintezi. Oni učestvuju u apsorbovanju svetlosne energije u okviru antena pigmenata, u termalnom rasipanju fluorescencije *hl a* (NPQ), ali i u de-ekscitiranju $^1\text{O}_2$ i $^3\text{hl a}^*$ (*Niyogi* 2000; *Krieger-Liszkay* 2005; *Standfuss et al.* 2005; *Smirnovff* 2008). Gašenjem $^3\text{hl a}^*$ sprečava se formiranje $^1\text{O}_2$. Karotenoidi mogu da reaguju u reakciji kondenzacije sa LOO^{\cdot} , pri čemu nastaje rezonantno stabilizovan 'carbon centred' radikal. Alternativno, LOO^{\cdot} može da oduzme proton molekulu karotenoida ili da, kao u slučaju likopena u reakciji sa $\text{O}_2^{\cdot-}$, nagradi anjon-radikal (*Smirnovff* 2008). α -TocOH, β -karoten i Asc mogu da deluju sinergistički u eliminaciji $^1\text{O}_2$ sa PS II (*Niyogi* 2000; *Smirnovff* 2008). Nastali karotenski radikal može da se oksiduje Asc i TocOH, koji takođe može da redukuje karotenski radikal, uz ponovni utrošak Asc za regeneraciju.

2.5. Zajedničke osobine abiotskog i biotskog stresa: oksidativni stres

Mnogi abiotski i biotski faktori iz spoljašnje sredine dovode do stvaranja visokih koncentracija ROS u ćelijama, odnosno do povećanja oksidativnog pritiska ('oxidative load' ili 'oxidative pressure') (Apel & Hirt 2004; Noctor et al. 2002a; Mittler 2004; Foyer & Shigeoka 2011; Hideg et al. 2013). Ukoliko postojeći nivo antioksidanata nema kapacitet da ukloni akumulirane ROS, bilo zato što je stvaranje ROS intenzivno, bilo zato što je postojeći nivo antioksidanata nizak, redoks homeostaza u ćeliji će se narušiti, i stanje koje nastaje može da se definiše kao oksidativni stres (Halliwell & Gutteridge 2007; Foyer & Shigeoka 2011; Munné-Bosch et al. 2013). S druge strane, neke ROS u niskim koncentracijama predstavljaju signal za ekspresiju gena koji kodiraju proteinske komponente antioksidativnog sistema, bilo onih koji učestvuju u direktnoj odbrani, bilo onih neophodnih za održavanje redoks-stanja neenzimskih antioksidanata (Foyer & Noctor 2003; Mittler 2004; Pogson et al. 2008; Queval et al. 2011; Szechyńska-Hebda & Karpiński 2013). Ovakav odgovor predstavlja uvod u aklimatizaciju biljaka na date spoljne uslove koji su prvobitno doveli do nagomilavanja ROS (Hideg et al. 2013). Međutim, ukoliko biljna ćelija nije u stanju da se prilagodi datim uslovima i adekvatno odgovori na visok nivo ROS, neminovno će doći do oksidativnih oštećenja biomolekula (Apel & Hirt 2004; Halliwell & Gutteridge 2007). Step en oštećenja zavisi od brzine kojom oštećenja nastaju u odnosu na brzinu koja je potrebna za „popravku” ili zamenu oštećenih biomolekula (Foyer & Noctor 2009, 2011). U zavisnosti koji deo/organ biljke je pod stresom, zavisice i preživljavanje biljke. Ilustracije radi, biljke koriste visoke koncentracije ROS koji nastaju tokom napada patogena ili povreda tkiva (oksidativni 'burst') za pokretanje ćelijski programirane smrti (Apostol et al. 1989; Lamb & Dixon 1997; Bolwell et al. 2002).

Razni nepovoljni uslovi iz spoljne sredine dovode do nastanka oksidativnog stresa (Mittler 2004). Najčešće su to visoki intenziteti UV zračenja (Jansen et al. 1998; Brosché & Strid 2003), visok intenzitet PAR (Karpiński et al. 1997; Yosimura et al. 2000), niske i visoke temperature (Gechev et al. 2003), suša (Yosimura et al. 2000; Noctor et al. 2002a; Veljović-Jovanović et al. 2006), visoke koncentracije metala kao što su Zn^{2+} , Cu^{2+} i Cd^{2+} (Michalak 2006; Morina et al. 2010), visoke koncentracije soli (Yosimura et al. 2000), vazdušni загаđivači (ozon, sumpor-dioksid) (Sanmartin et al. 2003), herbicidi (Pq) (Donahue et al.

1997), mehanička oštećenja (*León et al.* 2001) i napad patogena (*Lamb & Dixon* 1997; *Vanacker et al.* 1998; *Bolwell et al.* 2002).

2.5.1. Visok intenzitet PAR-a kao stresor

Na svetlosti slabog intenziteta fotosinteza funkcioniše maksimalnom efikasnošću, ali slabim kapacitetom. Fotosintetski procesi se ubrzavaju kako intenzitet svetlosti raste, ali fotohemijaska efikasnost opada, sve dok se ne dostigne maksimalan nivo, tzv. zasićenje, plato. Za sintezu ATP potrebno je da transtlakoidna pH razlika bude oko 2.5 jedinice, a za to je potrebno oko 0.1% od pune sunčeve svetlosti (oko $3000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) (*Ort* 2001). Kada je intenzitet PAR visok toliko da je apsorbirana energija u višku u odnosu na potrebe metabolizma i zaštitne mehanizme, dolazi do pojačanog stvaranja ROS koje potencijalno mogu da dovedu do inhibicije fotosinteze i CO₂ asimilacije (odeljci 2.2.3 i 2.2.4, slika 2.9). Takvo stanje predstavlja stanje fotooksidativnog stresa (*Foyer & Noctor* 2000; *Asada* 2006; *Foyer & Shigeoka* 2011).

Većinu dana biljke u svom prirodnom staništu podnose visok intenzitet PAR (*Mullineaux & Karpinski* 2002; *Lichtenthaler* 2007). Koji je to tačno intenzitet svetlosti koji je stresan, ne zavisi samo od vrste biljke, starosti i njene adaptiranosti na svetlo, već i od ostalih uslova u okolini (*Asada* 2006; *Ort* 2001). Tako na primer, u kombinaciji sa spoljnim uslovima koji ograničavaju dostupnost CO₂ ili usporavaju brzinu Kalvin-Bensonovog ciklusa, čak i optimalni intenzitet PAR može da bude stresan (*Wise et al.* 1990; *Asada* 1995; *Mittler* 2004; *Baker* 2008).

List ima više nivoa mehanizama kojima može da se zaštiti od viška svetlosti i spreči nastanak oksidativnog stresa. Prvi nivo zaštite podrazumeva strategiju izbegavanja, odnosno smanjenje intenziteta upadne svetlosti promenom orijentacije površine listova i promenom položaja hloroplasta u ćeliji (*Niyogi* 2000; *Neill* 2002; *Mullineaux & Karpinski* 2002; *Wise* 2007; *Munné-Bosch et al.* 2013). Takođe, akumulirani antocijani u vakuolama epidermisa i mezofilnih ćelija apsorbuju zelenu svetlost, pa je intenzitet svetlosti koja dopire do reakcionih centara PS II i PS I umanjena i do 17% (*Gould et al.* 1995; *Neill* 2002; *Neill & Gould* 2003; *Foyer et al.* 2012). Drugi nivo zaštite od visokog PAR se odnosi na mehanizme koji mogu da isprate brze, dnevne fluktuacije intenziteta svetlosti i koji su regulisani ATP/NADPH odnosom u fotosintezi i transtlakoidnom ΔpH (*Baker* 2008; *Foyer et al.* 2012), kao i redoks-

retrogradnim signalima, poput visokog $[PQH_2]/[PQ]$ odnosa i akumuliranim ROS u hloroplastima i peroksizomima (Mullineaux & Karpinski 2002; Pogson et al. 2008; Foyer & Noctor 2009a; Foyer & Shigeoka 2011; Munné-Bosch et al. 2013; Szechyńska-Hebda & Karpiński 2013). U takve mehanizme zaštite spada translokacija LHC II sa PS II do PS I čime se PS II relaksira (aktivacija viškom PQH_2) (Mullineaux & Karpinski 2002; Lichtenthaler 2007; Munné-Bosch et al. 2013), zatim već pomenuti NPQ sistem zaštite i pojačavanje fotohemijskog gašenja, odnosno alternativnih potrošača elektrona, slika 2.9 (odjelci 2.2.3, 2.2.6 i pododjeljak 2.3.2.1). Navedeni procesi su u kompeticiji sa fotosintetskim, tako da je u osnovi adaptacije biljaka na povišen intenzitet PAR delikatan balans između maksimalne efikasnosti fotosinteze i maksimalne fotozaštite (Ort 2001; Apel & Hirt 2004; Munné-Bosch et al. 2013).

Konstantno visok intenzitet PAR ipak može da nadvlada kapacitete termalnog i fotohemijskog rasipanja i da dođe do značajne akumulacije ROS u fotosintetski aktivnim ćelijama (Niyogi 2000; Asada 2006; Foyer & Shigeoka 2011). Da ne bi došlo do oksidativnih oštećenja u ćeliji, izlaganje visokom intenzitetu PAR indukuje aktivaciju antioksidativne zaštite. Tako, u raznim vrstama biljaka dolazi do porasta aktivnosti APX, posebno citosolne izoforme (Karpinski et al. 1997; Yosimura et al. 2000; Mullineaux & Karpinski 2002; Fryer et al. 2003; Szechyńska-Hebda & Karpiński 2013), Asc (Bartoli et al. 2006, Zechmann et al. 2011; Heyneke et al. 2013), i ostalih komponenti Asc-GSH ciklusa (Gechev et al. 2003; Heyneke et al. 2013; Szechyńska-Hebda & Karpiński 2013), koncentracije flavonoida i antocijanidina (Neill & Gould 2003; Agati et al. 2007, 2009; Pollastri & Tattini 2011), ksantofila (Lichtenthaler 2007; Rockholm & Yamamoto 1996) i α -tokoferola (Lichtenthaler 2007; Munné-Bosch et al. 2013).

2.5.2. UV-B zračenje: stresor vs. regulator

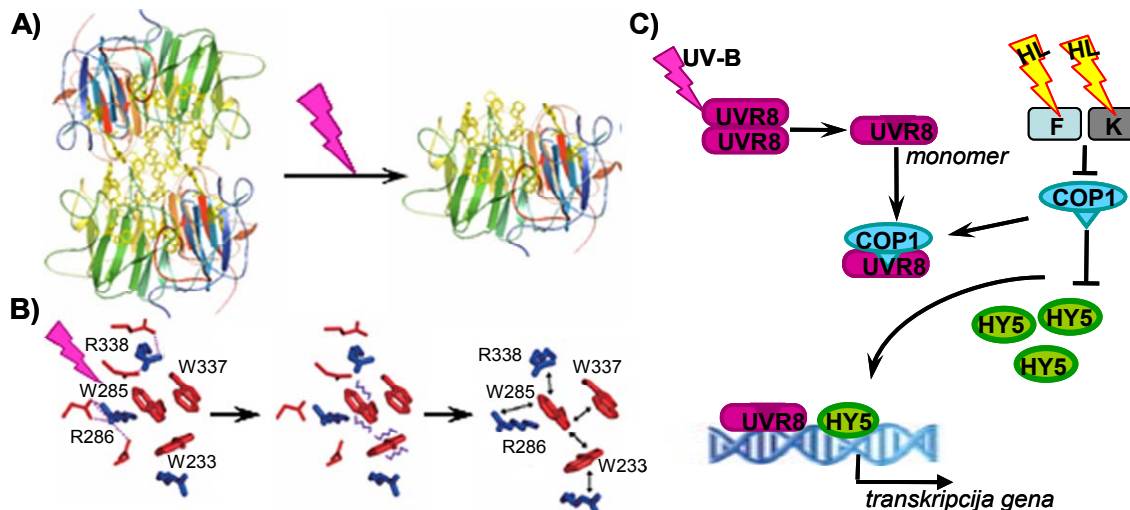
U prirodi, biljke su svakodnevno izložene solarnom zračenju talasnih dužina većih od 290 nm, kojima pripadaju UV-B (280-315 nm) i UV-A (315-400 nm) oblasti UV zračenja i koje čine 7% sunčeve svetlosti (Frohnmeier & Staiger 2003; Favory et al. 2009). Intenzitet UV zračenja zavisi od debljine ozonskog omotača, geografske širine, nadmorske visine, godišnjeg doba, oblačnosti i količine aerosola (Jenkins 2009; Aphalo et al. 2012).

Početna istraživanja uticaja UV-B zračenja na metabolizam i razvoj biljaka su ukazala na njegovo štetno dejstvo, što uključuje stvaranje ciklobutan-pirimidinskih dimera na DNK, stvaranje ROS i nastanak oksidativnog stresa i oštećenja ćelijskih struktura i molekula (*Jansen et al.* 1998; *Brosché & Strid* 2003; *Jenkins* 2009). Posebno negativan efekat UV-B zračenje je imalo na fotosintetsku mašineriju i to preko inaktivacije PS II kroz degradaciju D1 i D2 subjedinica, smanjenja aktivnosti Rubisco, snižavanja koncentracije fotosintetskih pigmenata, lipidne peroksidacije i oštećivanja tilakoidnih membrana (*Teramura & Sullivan* 1994; *Hideg & Vass* 1996; *Jansen et al.* 1998; *Lidon et al.* 2012; *Hu et al.* 2013). Međutim, eksperimenti u ovim studijama su rađeni napolju, u uslovima kada povišen nivo UV-B zračenja uvek prate i neki drugi stresori (visoka temperatura, visok PAR, suša...) (*Nogués et al.* 1998, *Hideg et al.* 2013). S druge strane, u pokušaju da se istraživanja svedu samo na praćenje uticaja UV-B zračenja, eksperimenti su postavljani u komorama za gajenje, gde su svetlosni uslovi bili veštački, bilo po pitanju ekološki nerelevantnog intenziteta UV-B zračenja, bilo po pitanju odnosa UV-B:UV-A: PAR, koji nije odgovarao odnosu u sunčevoj svetlosti (*Caldwell & Flint* 1994; *Hideg et al.* 2013). Diskusiju oko UV-B efekata dodatno je „podgrejala“ i činjenica da biljke koje su konstantno izložene UV-B zračenju u prirodi, retko pokazuju znake oštećenja (*Balaré et al.* 2011; *Comont et al.* 2012; *Jansen et al.* 2012; *Hideg et al.* 2013; *Müller et al.* 2013).

Rezultati naučnih istraživanja tokom poslednje decenije otkrili su nove funkcije UV-B zračenja na rast i razvoj biljaka. Naime, potvrđeno je da visoke doze i kratke talasne dužine UV-B zračenja imaju negativne efekte na biljke (*Jenkins* 2009; *Aphalo et al.* 2012). Međutim, novinu je predstavljala činjenica da čak i kratko izlaganje veoma niskim vrednostima UV-B zračenja predstavljaju važan regulator u rastu i razvoju biljaka (*Jenkins* 2009; *Heijde & Ulm* 2012; *Paul et al.* 2012). Otkriven je i novi receptor UV-B zračenja (UVR8, *UV Response Locus 8*) koji je odgovoran za signalnu transdukciju, slika 2.20 (*Rizzini et al.* 2011; *Christie et al.* 2012; *Wu et al.* 2012). U mraku, UVR8 protein je homodimer i izlaganje UV-B zračenju, preko ekcitacije Trp²⁸⁵ i Trp²³³, indukuje monomerizaciju, slika 2.20. Interakcija monomera UVR8 sa proteinom COP1 (*'Constitutively Photomorphogenic 1'*) i transkripcionim faktorom HY-5 (*'Elongated Hypocotyl 5'*) reguliše ekspresiju gena koji omogućavaju aklimatizaciju biljaka na više intenzitete UV-B zračenja (*Brown et al.* 2005; *Favory et al.* 2009; *Cloix et al.* 2012; *Heijde & Ulm* 2012). Od ranije je poznato da biljke imaju receptore i za UV-A i plavu

svetlost: kriptohromi i za „daleku“ crvenu svetlost: fototropine (Yi & Deng 2005; Caldwell *et al.* 2007; Jiao *et al.* 2007). Kriptohromi su odgovorni za mnoge fotomorfogene procese i sinteze pigmenata, dok su fototropini uključeni u pokrete hloroplasta i otvaranje stoma (Jiao *et al.* 2007). Preko dana, aktivirani fitohromi i kriptohromi interaguju sa COP1 u citosolu i inaktiviraju ga. Preko noći COP1 se akumulira u nukleusu i kao E3 ubihitin ligaza, „obežava“ transkripcione faktore poput HY5 i HYH za degradaciju u proteazomima (Yi & Deng 2005). Zato preko dana dolazi do re-akumulacije pomenutih transkripcionih faktora i započinjanja ekspresije specifičnih gena fotomorfogeneze. Za sada nije poznato da li COP1 ima ulogu ligaze i u percepciji UV-B zračenja, ali su nakon izlaganja beloj svetlosti i UV-B zračenju nađene značajne količine COP1 u jedru (Favory *et al.* 2009; Cloix *et al.* 2012; Heide & Ulm 2012). Veoma niske vrednosti UV-B doza (1/40 od ambijentalne) preko UVR8 izazivaju ekspresiju gena koji kodiraju ključne enzime uključene u biosintezu i metabolizam fenilpropanoide i flavonoida, kao što su halkon-sintaza, halkon-izomeraza, flavonol-sintaza, slika 2.18 (Brown *et al.* 2005, Brown & Jenkins 2008; Favory *et al.* 2009). Signalni put preko UVR8 aktivira i gene koji su uključeni u antioksidativnu zaštitu ćelije, uglavnom vezane za metabolizam GSH, poput GR, GSH-peroksidaze, GSH-S-transferaze, peroksiredoksina i glutaredoksina (Brosche *et al.* 2002; Brown *et al.* 2005).

Niske UV-B doze UVR8 zavisnim putem indukuju i ekspresiju proteina bitnih za održavanje i zaštitu fotosinteze (Favory *et al.* 2009; Davey *et al.* 2012). Zapravo, rezultati ispitivanja uticaja UV-B zračenja na parametre gasne izmene nisu konzistentni, što je verovatno posledica već pomenutih grešaka u eksperimentalnoj postavci, vremenu izlaganja UV-B zračenju i specifičnosti odgovora određene vrste i varijeteta na UV-B zračenje (Kakani *et al.* 2003; Lidon *et al.* 2012). Takođe, u sredinama u kojima je nivo solarnog UV-B zračenja prirodno visok (npr. velike nadmorske visine, polarni regioni) dolazi do smanjenja fotosinteze (Ruhland *et al.* 2005; Albert *et al.* 2008, 2011; Berli *et al.* 2013; Gitz *et al.* 2013). Rezultati koji se tiču otvorenosti stoma pod UV-B zračenjem su različiti i zavise od stanja metabolizma biljke, stepena njene aklimatizacije, odnosno istorije prethodnog izlaganja UV-B zračenju (Nogués *et al.* 1998, 1999; Jansen & van den Noort 2000; Kakani *et al.* 2003; Lidon *et al.* 2012).



Slika 2.20. Shematski prikaz aktivacije UVR-8 receptora pomoću UV-B zračenja i daljeg prenosa signala. A) UVR8 protein se u mraku nalazi kao dimer, čiji su monomeri povezani jonskim unakrsnim interakcijama, od kojih su najbitnije katjon- π interakcije dva Arg ostatka (R338 i R286) i tri Trp (W285, W233 i W237). B) UV-B zračenje izaziva ekscitaciju π elektrona indolovog prstena na W285 i W233 (talasaste ljubičaste linije) pri čemu su onemogućene katjon- π interakcije sa okolnim ostacima, što za rezultat ima intenzivne konformacione promene tog dela molekula (crne dvosmerne strelice) i monomerizaciju UVR8 dimera. C) Interakcija UVR8 monomera i COP1 proteina- veza između percepcije UV-B zračenja i bele svetlosti (HL). Objašnjenja u tekstu. F, fitohromi; K, kriptohromi. Slika je adaptacija originala iz Wu *et al.* 2012 i Heide & Ulm 2012.

Kompleksna mreža signalne transdukcije u kojoj učestvuju pomenuti COP1, HY5 i HYH, čini da su u prirodnim uslovima odgovori biljaka na sunčevo zračenje zapravo kombinacija odgovora na UV-A i UV-B zračenje i PAR. Niski intenziteti UV-A zračenja i PAR u kombinaciji sa ekološki relevantnim UV-B dozama imaju štetne efekte (Aphalo *et al.* 2012). Ne treba zaboraviti da plava i UV-A svetlost aktivira fotolijaze i stimuliše reparaciju oštećenih DNK sekvenci. U prirodnom okruženju, biljke pojačano sintetisju flavonoide ne samo kao odgovor na UV-B zračenje, već i na UV-A, plavu i belu svetlost (Jenkins *et al.* 2001; Ibdah *et al.* 2002; Brown *et al.* 2005; Agati *et al.* 2009, 2011). Na taj način, aklimatizacioni odgovori UV-B zračenja i visokog intenziteta PAR mogu da se preklapaju, ukazujući na unakrsnu toleranciju na obe ove komponente sunčevog zračenja (Bolink *et al.* 2001; Behn *et al.* 2010; Götz *et al.* 2010; Klem *et al.* 2012; Majer & Hideg 2012).

3. MATERIJAL I METODE

Istraživanja u okviru ove doktorske disertacije su obuhvatala četiri eksperimentalna dela, kako je već pomenuto u uvodu. U ovom poglavlju prikazani su uslovi gajenja i tretmana biljaka i dati su detaljni protokoli svih metoda. U kratkim crtama sledi pregled materijala i metoda svih eksperimentalnih celina:

1. Optimizacija i uspostavljanje metoda koje se koriste u redoks biohemiji;
2. Karakterizacija komponenata antioksidativnog sistema u belom i zelenom tkivu listova *P. zonale* varijetet „Ben Franklin” i praćenje odgovora komponenti Asc-GSH ciklusa na izlaganje jakom sunčevom zračenju i tretman parakvatom, Pq (eksperimentalni deo I);
3. Odgovor fotosintetskog, antioksidativnog i fenolnog metabolizma panaširanih listova *P. coleoides* na visok intezitet PAR i prirodan nivo UV-B zračenja (eksperimentalni deo II) i
4. Ispitivanje međusobne povezanosti fotosintetskog, antioksidativnog, fenolnog i metabolizma rastvornih ugljenih hidrata u panaširanim listovima *P. zonale* varijetet „Frank Headley” izlaganih visokom intezitetu PAR i UV-B zračenju (eksperimentalni deo III).

3.1. Biljni materijal

3.1.1. *Pelargonium zonale* L.

U eksperimentalnim delovima I i III upotrebljene su panaširane muškatile, *P. zonale*, varijeteti „Ben Franklin” i „Frank Headley”, redom, slika 3.1. Početne, „majke biljake” *P. zonale* „Ben Franklin” su kupljene u rasadniku *Fir Trees Pelargonium* (Stoksli, Nort Jorkšir, Velika Britanija) pola godine pre početka tretmana. Stok biljke *P. zonale* „Frank Headley” su nabavljene godinu dana pre početka eksperimenata u rasadnicima: *Silze GmbH & Co.* iz Vener-Halta, Nemačka i *Raritätengärtnerei Fam. Treml*, iz Arnbruka, Nemačka.



Slika 3.1. Panaširana muškatica, *Pelargonium zonale* varijetet „Frank Headley”. Prikazane su „majke biljke” poreklom iz različitih rasadnika.

3.1.2. *Plectranthus coleoides* Benth.

U eksperimentalnom delu II korišćene su panaširane tamjanike, *P. coleoides*, slika 3.2. Ove biljke su nabavljene u lokalnom rasadniku godinu dana pre izvođenja eksperimenata.



Slika 3.2. Panaširana tamjanika, *Plectranthus coleoides*, švedski bršljan. Levo: „majka biljka”; desno: presađene biljke pred početak eksperimenata.

3.2. Gajenje i razmnožavanje biljaka

3.2.1. Gajenje i razmnožavanje biljaka *P. zonale* var. „Ben Franklin”

Biljke *P. zonale* „Ben Franklin” su vegetativno razmnožavane i zasađene u supstrat *Klasman-Potgrond H* (*Klasmann-Deilmann GmbH*, Geste, Nemačka). Gajene su u fitotronske komori, u kontrolisanim uslovima (na dnevno-noćnoj temperaturi od 26 °C-18 °C, relativnoj vlažnosti (RH) vazduha od 70% i osvetljenosti od 300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PAR) na Katedri za agrohemiju i fiziologiju biljaka Poljoprivrednog fakulteta u Beogradu. Nakon pet meseci od presađivanja biljke su iskorišćene za karakterizaciju komponenata antioksidativnog sistema u belom i zelenom tkivu listova i praćenje odgovora komponenti Asc-GSH ciklusa na izlaganje jakom sunčevom zračenju i tretmanu parakvatom, Pq.

3.2.2. Gajenje i razmnožavanje biljaka *P. zonale* var. „Frank Headley” i *P. coleoides*

Mlade biljke, *P. zonale* „Frank Headley” i *P. coleoides* su gajene u stakleniku Helmholtz centra Minhen (*Helmholtz Zentrum München*) u Nojherbergu u Nemačkoj, slika 3.3. Pomenuti staklenik je bio prekriven UV-transparentnim staklom, koji propušta oko 50% PAR i UV-A zračenja i oko 20% UV-B zračenja od ukupnog zračenja koje dopire do površine zemlje. Pet nedelja pre početka eksperimenata, mlade biljke *P. zonale* i *P. coleoides* su vegetativno umnožene odsecanjem pelcera sa početnih, „majki biljaka” (u slučaju *P. zonale* poreklom iz oba rasadnika), a zatim je nastavljeno gajenje u stakleniku. Rasadi obe vrste zasađeni su u supstrat *Fruhstorfer Einheitserde*, Tip P, da bi nakon formiranja korena, biljke obe vrste bile presađene u supstrat *Fruhstorfer Einheitserde* Tip T.



Slika 3.3. Levo: staklenik za gajenje biljaka na Odeljenju za inženjering životne sredine, Helmholtz centra u Minhenu (*Department Environmental Engineering, Helmholtz Zentrum München*). Desno: Rasadne mlade biljke *P. coleoides* i *P. zonale* neposredno pre početka eksperimenta.

3.3. Eksperimentalni dizajn

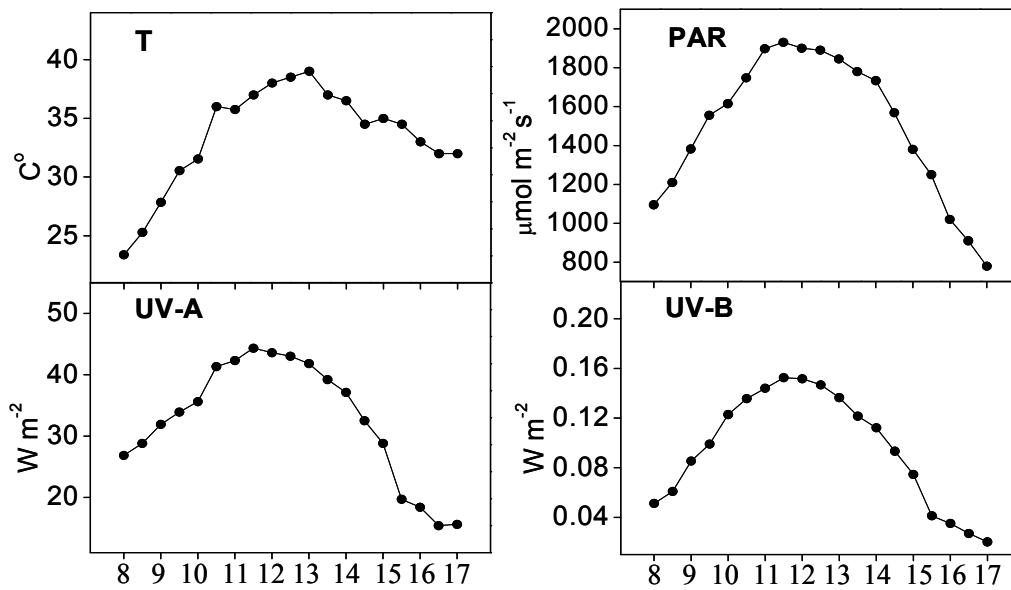
3.3.1. Postavka eksperimenta za praćenje odgovora komponenti Asc-GSH ciklusa na izlaganje jakom sunčevom zračenju i tretman parakvatom

Za utvrđivanje konstitutivnih razlika u antioksidativnim komponentama u belim i zelenim segmentima listova biljaka adaptiranih na svetlo, materijal je uzorkovan dva do tri sata od početka osveljavanja. Ovo se pokazalo značajnim, jer biohemijski parametri (npr. askorbat, askorbat-preroksidazna aktivnost) imaju dnevnu ritmiku. Uzorci su sakupljeni sa zrelih, osvetljenih listova sa deset biljaka. Zeleni delovi su odvajani od belih, i isto obojena tkiva poreklom sa jedne biljke su bila sakupljena i odmah zamrznuta u tečnom azotu.

Za praćenje razlika u odgovoru belog i zelenog tkiva listova biljaka *P. zonale* „Ben Franklin” tokom devetočasovnog izlaganja intezivnom sunčevom zračenju i Pq, za kontrolu su uzorkovani delovi listova sa biljaka koje su bile adaptirane na mrak preko noći (tri lista po biljci, sa četiri biljke). Zatim su po tri lista sa deset biljaka odsčena u osnovi lisne drške, i polovina je postavljena u 1.5 ml *Eppendorf* epruvice sa destilovanom vodom, a druga polovina u epruvice sa 100 mM Pq. Svi listovi su bili izloženi direktnoj sunčevoj svetlosti od 8:00 do 17:00 časova po centralnom evropskom vremenu (CEV) vedrog dana, slika 3.4.

Sa namerom da se isprati dinamika odgovora, listovi su uzorkovani u 9:00, 12:00 i 17:00 CEV. Tokom izlaganja, PAR, UV-A i UV-B iradijanse, temperatura i RH su praćeni svakih 30 minuta, u nivou visine listova, slika 3.4. U toku izlaganja RH je bila u opsegu od 35-45%. Tretmani su ponovljeni u junu i julu 2011. i 2012. godine pod sličnim uslovima.

U cilju umanjenja degradacije Pq tokom vremena izlaganja i da se spreči pregrevanje listova, *Eppendorf* epruvice su bile umotane u aluminijumsku foliju i uglavljene u ploču od belog stiropora, slika 3.5. Zapremina rastvora Pq i vode u epruvicama je održavana na oko 1 ml, kako bi se izbeglo sušenje lisne drške. Količina apsorbiranog Pq je računata na kraju tretmana na osnovu usvojene zapremine rastvora.



Slika 3.4. Prikaz temperature (T, °C), PAR, $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, UV-A i UV-B iradijancije [W m^{-2}] u nivou listova u toku tretmana. Prikazani su reprezentativni parametri iz četiri tretmana.

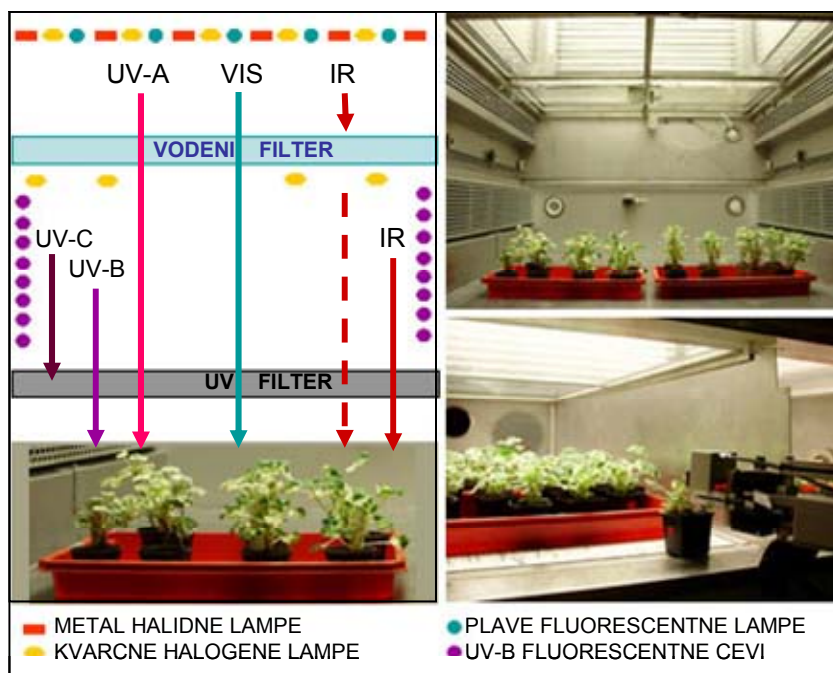


Slika 3.5. Postavka eksperimenata u kom su listovi *P. zonale* „Ben Franklin” izlagani intenzivnom sunčevom zračenju i tretmanu sa 100 mM Pq.

3.3.2. Postavka eksperimenata za praćenje odgovora metabolizma panaširanih biljaka na visok intenzitet PAR-a i ambijentalne doze UV-B zračenja

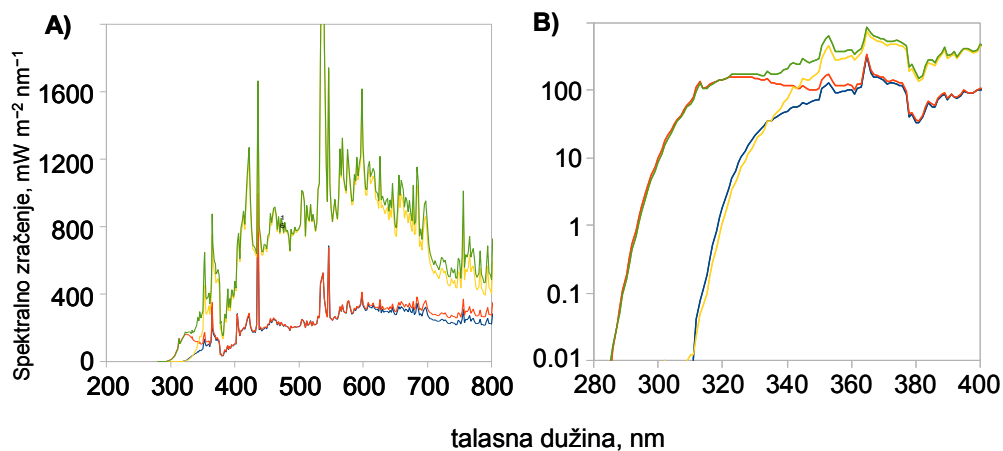
3.3.2.1. Simulatori sunčevog zračenja

Eksperimenti izlaganja UV-B zračenju sa biljkama *P. coleoides* i *P. zonale* „Frank Headley” su izvođeni u komorama jedinstvenih „simulatora sunčevog zračenja” (SSZ, ‘sun simulators’) koji pripadaju Helmholtz centru Minhen, slika 3.6.



Unutar komora SSZ kombinacijom metal-halidnih lampi (*HQI/D*, 400 W, *Osram*, Minhen, Nemačka), kvarcnih halogenih lampi (*Halostar*, 300 i 500 W, *Osram*) i plavih fluorescentnih cevi (*TLD 18*, 36 W, *Philips*, Amsterdam, Holandija), slika 3.6, postignut je spektar zračenja blizak prirodnom sunčevom zračenju, slika 3.7. Višak infracrvenog zračenja je redukovano slojem vode (vodeni filter), dok su talasne dužine ispod 280 nm efikasno blokirane pomoću odabranih borosilikatnih i karbonatnih staklenih filtera, slika 3.6. Upravo

ovi realistični uslovi bele svetlosti predstavljaju preduslov za ekološki relevantne UV-B tretmane.



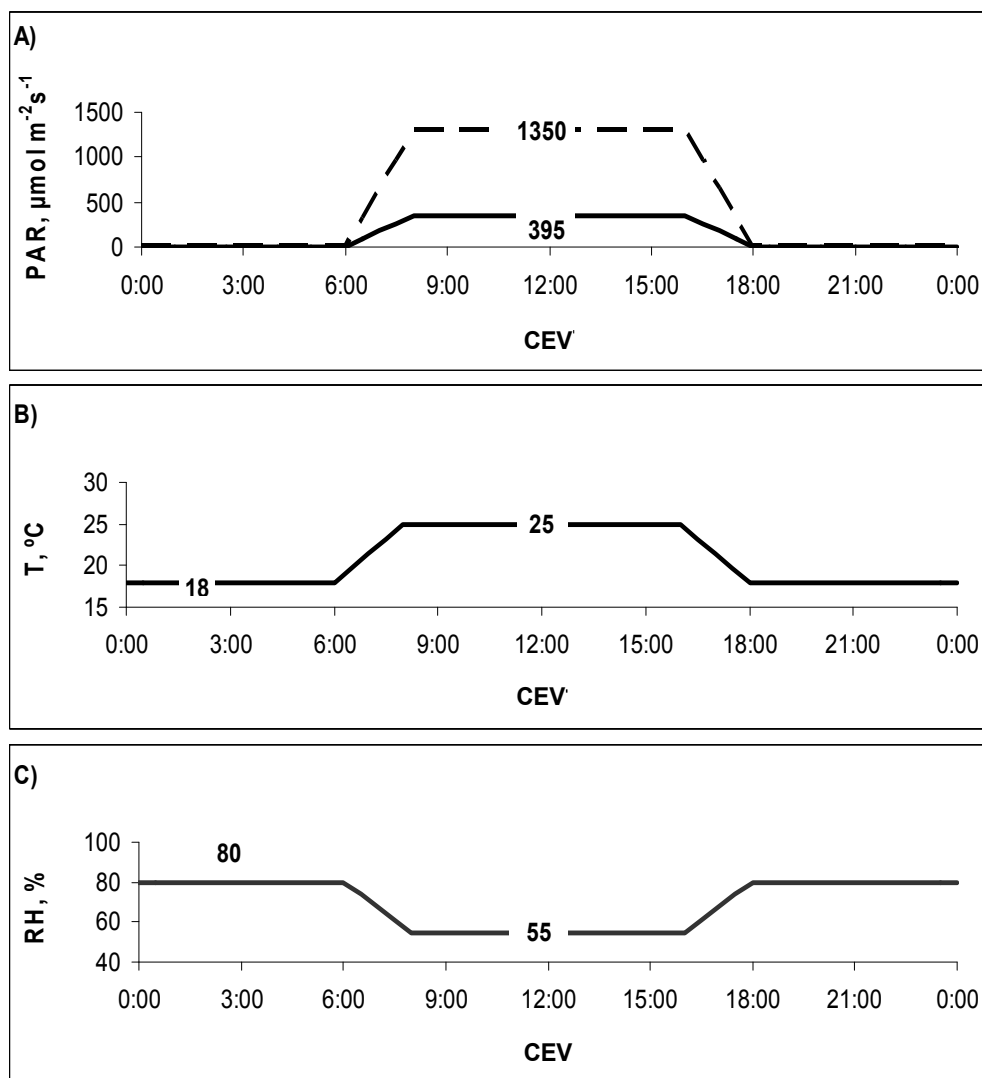
Slika 3.7. Spektar simuliranog zračenja četiri režima (tretmana) zračenja korišćenih u opisanim eksperimentima. A) Linerana skala zračenja od 300 - 800 nm; B) logaritamska skala zračenja od 280 - 400nm. Plavo, LL; LL + UV-B, crveno; HL, žuto i HL + UV-B, zeleno.

3.3.2.2. Uslovi i režimi zračenja

Sve biljke obe vrste su aklimatizovane tokom šest dana unutar komora SSZ pri 395 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PAR (što odgovara prosečnom intenzitetu PAR u stakleniku u kom su biljke bile prethodno gajene), fotoperiodom od 12 sati, dnevno-noćnom temperaturom od 25 °C-18 °C i dnevno-noćnom RH od 55%-80%. Biljke su zalivane jednom dnevno, pred kraj dnevnog perioda. Kako bi se oponašale prirodne dnevne varijacije u sunčevom zračenju, temperaturi i vlažnosti, dati uslovi su menjani postepeno tokom prva i poslednja dva sata dnevnog perioda, slika 3.8.

Nakon aklimatizacije, započeto je desetodnevno izlaganje biljaka *P. coleoides* i *P. zonale* UV-B zračenju. Fotoperiod, temperatura, RH i učestanost zalivanja su bili isti kao i tokom aklimatizacije. Da bi se ispitalo da li efekat UV-B zračenja zavisi od pozadinskog osvetljenja, biljke su bile izložene dvema različitim intezitetima PAR: (i) 395 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, odnosno 14.2 mol m⁻² PAR dnevno (slaba svetlost, LL tretman) i (ii) 1350 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PAR, što ukupno daje 48.8 mol m⁻² PAR dnevno (jaka svetlost, HL tretman), tabela 3.1. Simulator sunčevog zračenja upotrebljen u oba tretmana (LL i HL) je bio podeljen na dva odeljka.

Svetlo je paljeno u 6:00 h (CEV) u oba odeljka, dok je UV-B zračenje (0.90 W m^{-2}) primenjivano tokom deset sati, počevši od 7:00 časova (CEV) u jednom od odeljaka (u oba, LL i HL tretmana UV-B iradijansa je bila ista) što je rezultiralo sa 29.3 kJ m^{-2} dnevne UV-B radijantne izloženosti ili 7.0 kJ m^{-2} dnevne biološki efektivne UV-B iradijanse (računato po *Green et al.* (1974) na osnovu merenja *Caldwell* (1971) normirano na 300 nm).



Slika 3.8. Uslovi u komorama simulatora sunčevog zračenja (SSZ) Helmholtz centra u Minhenu, tokom desetodnevno izlaganja *P. zonale* i *P. coleoides* biljaka različitim režimima zračenja. A) Puna linija: intenzitet PAR od $395 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; isprekidana linija: intenzitet PAR od $1350 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. B) Dnevna temperatura (T, °C) i C) dnevna relativna vlažnost (RH, %) tokom eksperimenta su takođe postepeno povećavane i smanjivane. UV-B zračenje (0.90 W m^{-2}) je počinjalo sat vremena nakon paljenja svetla i prestajalo nakon deset sati u odeljcima gde su bile smeštene UV-B tretirane grupe biljaka (nije prikazano). Na apcisi je prikazano centralno evropsko vreme (CEV).

U zaključku, sa biljkama *P. zonale* i *P. coleoides* primenjena su četiri različita režima zračenja: (1) LL; (2) LL+UV-B; (3) HL i (4) HL+UV-B (Tabela 3.1). Vrednosti PAR, UV-A i UV-B zračenja su kontinualno praćeni tokom izlaganja. Spektroradiometrijska merenja su obavljena pomoću dvostrukog monohromnog sistema TDM300 (*Bentham, Reading, Engleska*). Horizontalne varijacije zračenja unutar komora SSZ su bile manje od 10%. Vrednosti PAR i UV-B zračenja u režimu: HL+UV-B odgovaraju sunčanom, prolećnom danu u srednje-severnim geografskim širinama Evrope, gde je sunce izdignuto za oko 40 stepeni i ukupni ozonski stub iznosi oko 300 Dobsonovih jedinica (DU).

Ukupno, po 32 biljke uniformnog izgleda iz oba rasadnika, sa po pet potpuno razvijenih listova najmanje, su odabrane za izlaganje različitim režimima zračenja. Muškatle poreklom iz različitih rasadnika su bile jednako raspoređene između LL i LL+UV-B, i između HL i HL+UV-B tretmana u cilju izbegavanja grupisanja biljaka poreklom iz istog rasadnika.

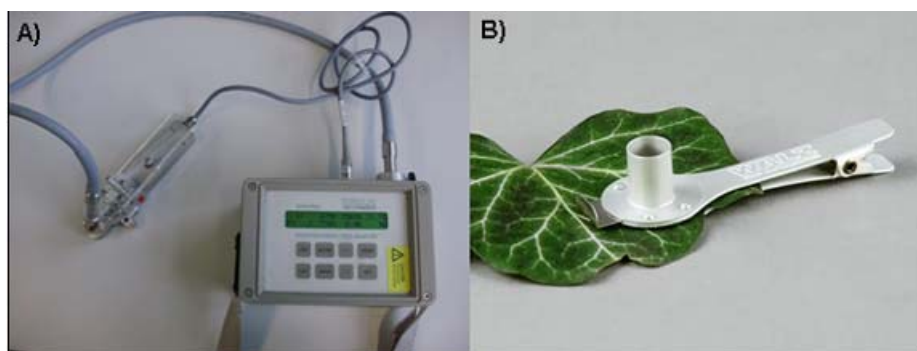
Tabela 3.1. Vrednosti zračenja i izloženosti za četiri različita režima zračenja. Biološki efektivne UV-B doze predstavljene su indeksom BE, i zasnivale su se na akcionim spektrima opisanim u *Caldwell* (1971), normiranim na 300 nm, a izračunate prema *Green et al.* (1974). Dnevno-noćni ciklus osvetljavanja bio je 12-12 h. UV-B zračenje primenjivano je deset sati dnevno.

Parametri	nizak PAR		visok PAR	
	LL	LL+UV-B	HL	HL+UV-B
PAR ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	395	395	1350	1350
UV-A iradijansa, (W m^{-2})	7.0	10.0	20.0	28.0
UV-B iradijansa, (W m^{-2})	0	0.90	0	0.90
Biološki efektivna UV-B iradijansa, (mW m^{-2}) _{BE}	0	215.0	0	215.0
Dnevna PAR radijantna izloženost ($\text{mol m}^{-2} \text{d}^{-1}$)	14.2	14.2	14.2	48.8
Dnevna UV-A radijantna izloženost ($\text{kJ m}^{-2} \text{d}^{-1}$)	252	360	711	1008
Dnevna UV-B radijantna izloženost ($\text{kJ m}^{-2} \text{d}^{-1}$)	0	29.3	0	29.3
Dnevna UV-B radijantna izloženost ($\text{kJ m}^{-2} \text{d}^{-1}$) _{BE}	0	7.0	0	7.0
Trajanje eksperimenta (dani)	10	10	10	10

3.4. Parametri fotosinteze i transpiracije biljaka

3.4.1. Merenje fluorescencije hlorofila

Parametri fluorescencije *hl a* praćeni su jednom dnevno, ujutru i uveče na zelenim segmentima listova kako bi se pratila dinamika odgovora biljke. Fluorescencija *hl a* je merena unutar komora SSZ, na način opisan u poglavlju 2.2.6. Fluorescencija *hl a* listova adaptiranih na svetlost (F' i F_m') je merena u podne pomoću fluorimetra sa modulisanom amplitudom pulsa „miniPAM” (*Heinz Walz GmbH*, Efeltrih, Nemačka) opremljenog sa svetlosno i temperaturno osetljivom lisnom štipaljkom 2030-B (*Heinz Walz GmbH*), slika 3.9A.



Slika 3.9. A) Fluorimetar „miniPAM 2500” (*Heinz Walz GmbH*, Efeltrih, Nemačka) upotrebljivan u eksperimentima. B) Lisna štipaljka za mrak DLC-8, (*Heinz Walz GmbH*); fotografija preuzeta sa http://www.walz.com/products/chl_p700/mini-pam/accessories.html.

Minimalna i maksimalna fluorescencija *hl a* listova adaptiranih na mrak (F_o i F_m) tokom noćnog perioda, merene su istim aparatom pomoću tzv. lisnih štipaljki za mrak (DLC-8, *Heinz Walz GmbH*), slika 3.9B. Fluorescencija F_m je određivana primenom zasićujućeg pulsa bele svetlosti ($4500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) u trajanju od 1 s. Fotohemijski prinos otvorenih centara PS II, odnosno maksimalni kvantni prinos PS II je izračunavan po formuli: F_v/F_m , gde je $F_v = F_m - F_o$, datoj u poglavlju 2.2.6. Svi parametri fluorescencije *hl a* mereni su uvek na tri ista lista po biljci. Prosečna vrednost ta tri merenja je predstavljala srednju vrednost za datu biljku, te je tako izbegnuto pseudo-replikovanje uzoraka. Radna efikasnost PS II, $\Phi_{\text{PS II}}$ i NPQ izračunati su kako je objašnjeno u poglavlju 2.2.6.

3.4.2. Merenje parametara izmene gasova

Fotosintetska aktivnost listova praćena je i nedestruktivnim merenjem sledećih parametara izmene gasova: ukupne brzine asimilacije CO₂ (A_{net}), provodljivosti stoma (g_s), unutarćelijske koncentracije CO₂ (c_i), kao i fluorescencije $hl a$ prvog, ćetvrtog i desetog dana izlaganja. U tu svrhu je korišćen portabl-aparat za analizu gasova (CO₂ i H₂O) i merenje fluorescencije $hl a$ GFS-3000, opremljen sa LED-Array/PAM fluorimetrom 3055-FL (Heinz Walz GmbH), slika 3.10.



Slika 3.10. Levo: centralna jedinica portabl aparata za analizu gasova i merenje fluorescencije GFS-3000 (Heinz Walz GmbH). Desno: merenje izmene gasova listova *P. zonale* u kivetu za merenje unutar komore SSZ.

Uslovi u komori za merenje listova su bili podešeni da odgovaraju uslovima u komorama SSZ (koncentracija CO₂: 385 ppm, temperatura kivete: 25 °C, RH: 55%). Brzina kretanja vazduha je bila 700 $\mu\text{mol s}^{-1}$. Kiveta za merenje je imala obićno, UV-B nepropusno staklo. Aktinsko svetlo je bilo 250 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ za LL i LL+UV-B tretirane biljke i 1300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ za HL i HL+UV-B tretirane biljke, što je bilo u skladu sa PAR vrednostima na nivou listova u komorama SSZ. Ekvilibraciono vreme u komori za merenje za *P. coleoides* biljke bilo je u proseku: 8.2 ± 2.9 min, a za *P. zonale*: 9.3 ± 0.4 min, s tim što je ćetvrtog i desetog dana prosek bio 7.6 ± 0.2 min. Dodatne informacije kao što su PAR, c_a , w_a , temperatura i VPD u kivetu za merenje su prezentovane u tabelama P2 i P6 u poglavlju Prilozi.

3.5. Transmisiona elektronska mikroskopija (TEM)

3.5.1. Analiza ultrastrukture hloroplasta

Ultrastruktura hloroplasta listova *P. zonale* i *P. coleoides* u HL i HL+UV-B tretmanima je ispitivana transmisionim elektronskim mikroskopom u Institutu za nauke o biljkama u okviru *Karl-Franzens* Univerziteta u Gracu, Austrija, slika 3.11A.

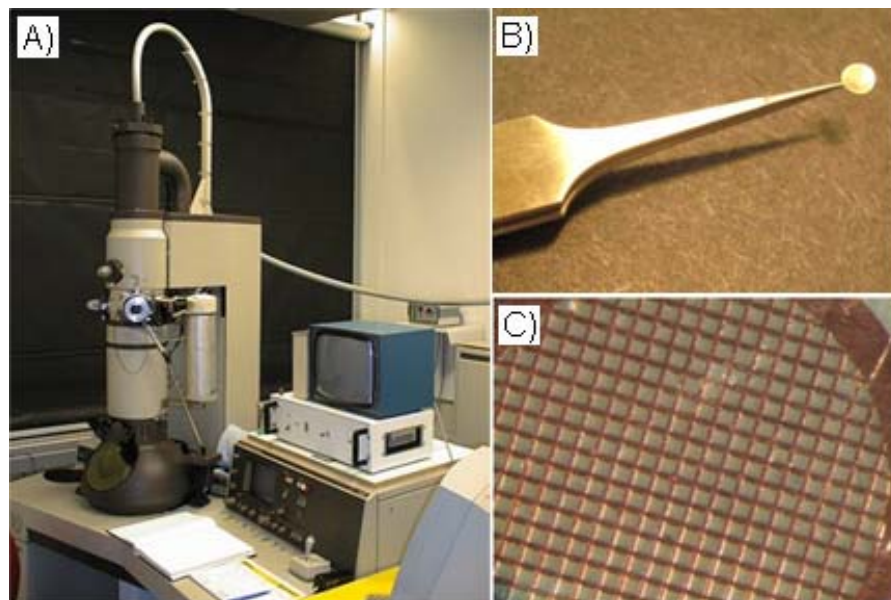
3.5.1.1. Fiksiranje uzoraka

Fiksiranje uzoraka je rađeno po protokolu opisanom u *Zechmann et al. (2008)* i *Zechmann & Zelling (2009)*. Maleni komadi (oko 2-4 mm²) belih i zelenih segmenata listova sa najmanje tri biljke po tretmanu su isečeni na silikonskoj ploči u kapi 2.5% glutaraldehida rasvorenog u 0.06 M K/Na-fosfatnom puferu (*Sørensen*-ov pufer) pH 7.2. Fiksacija uzoraka je trajala dva sata, a kako bi fiksativ efikasnije prodirao u tkivo, primenjen je blag vakum, 3×10 s. Nakon toga uzorci su ispirani 4×15 min sa 0.1 M *Sørensen*-ovim puferom, da bi zatim bili post-fiksirani 100 min u 1% osmijum-tetroksidu (2 ml 4% OsO₄ razblaženo je sa 4 ml 0.2 M *Sørensen*-ovog pufera i 2 ml destilovane vode). Nakon isteka 100 min, uzorci su ispirani 4×15 min sa 0.1 M *Sørensen*-ovim puferom, a zatim je bila započeta dehidracija uzoraka kroz seriju rastvora acetona (50%, 70%, 90% i 100%), svaki korak 2×10 minuta. Nakon toga, aceton je zamenjen propilen-oksidom, koji je pogodan rastvarač za Epon smolu (najpre uz inkubiranje u smeši aceton:propilenoksid, 1:1, 10 min, a zatim samo u 100% propilen-oksidu, 2×10 min. Infiltracija sa Agar Epon 100 epoksi-smolom (*Agar Scientific Ltd.*, Stensted, Engleska) je rađena u tri koraka: 1) dva sata sa smešom Epon:aceton, u odnosu 1:2 (v/v); 2) najmanje tri sata (ili preko noći) sa smešom Epon:aceton, u odnosu 1:1 (v/v); 3) četiri sata sa 100% Epon. Epon 100 epoksi-smola za polimerizaciju je pripremana tako što se 24 g (20 ml) Agar Epon 100 epoksi-smole i očvršćovači smole: 16 g (16 ml) anhidrida dodecenilsukcinske kiseline (DDSA) i 10 g (8 ml) anhidrida metil-5-norbornen-2,3-dikarboksilne kiseline (MNA) brzo izmešalo, izvorteksovalo, ugrejalo do 45 °C u mikrotalasnoj rerni, a zatim je dodavan akcelerator polimerizacije - 1.5 g (1.3 ml) benzil-di-metilamin (BDMA), nakon čega su brzo i energično svi sastojci izmešani i izvorteksovani dok smeša nije postala homogena, crveno-narandžaste boje.

Nakon infiltracije Epon smolom, uzorci su kalupljeni u plitke posude u kojima je na dnu bio tanak sloj prethodno ispolimerizovane smole. Polimerizacija je trajala 48 sati, na 60 °C. Uzorci su bili međusobno orjentisani tako da se ne preklapaju i izbegavano je „zarobljavanje” mehurića vazduha oko njih.

3.5.1.2. Sečenje i priprema uzoraka

Nakon grubog trimovanja fiksiranih uzoraka, tako da palisadni mezofil bude dostupan za analizu, fina serija ultratankih preseka (80 nm) napravljena je pomoću *Reichert Ultracut S* ultramikrotoma (*Leica Microsystems*, Beč, Austrija) i prebačena na rešetku – držač za pozicioniranje uzorka (‘grid’), a zatim su preseci dodatno kontrastirani, slika 3.11B i C), najpre sa olovo-citratom (uz dodatak 1 M NaOH, jer je rastvor osetljiv na CO₂, 5 minuta u mraku, nakon čega su preseci isprani vodom), a zatim sa 1% uranil-acetatom rastvorenim u vodi (15 minuta u mraku, nakon čega su preseci isprani i sušeni filter papirom) (*Zechmann & Zelling* 2009). Nakon ovoga, preseci mezofila (najmanje 20 hloroplasta po oba, HL i HL+UV-B, tretmana) su posmatrani pod mikroskopom *Philips CM10 TEM* (*Philips Electron Instruments*, Ajndhoven, Holandija, slika 3.11A, uvećanje 8900×, da bi zatim nasumični delovi preseka bili fotografisani.



Slika 3.11. A) Transmisioni elektronski mikroskop (TEM) *Philips CM10 TEM* (*Philips Electron Instruments*, Ajndhoven, Holandija). B) Pinceta sa rešetkastim postoljem za ultratanke preseke koji se koristi u TEM (tzv. ‘TEM grid’). C) Bakarna rešetka sa karbonskom mrežom, fotografisano pri uvećanju 60 puta. B) i C) preuzeto sa [http://openwetware.org/wiki/20.109\(F07\):_Transmission_electron_microscopy](http://openwetware.org/wiki/20.109(F07):_Transmission_electron_microscopy).

3.5.1.3. Kompjuterska obrada skeniranih preseka

Dobijeni negativni su skenirani pomoću Epson skenera (*Epson Perfection V750 Pro; Epson Deutschland GmbH*, Merbuš, Nemačka) do rezolucije 1200×1200 dpi. Fotografije delova plastida su analizirane uz pomoć programa *Optimas 6.5.1 (Olympus, Life and Material Science Europa GmbH*, Hamburg, Nemačka) i *Cell D* sa alatkom za analizu čestica (*BioScan Corp. Media Cybernetics Inc., Bethesda, SAD*). Površina je izražena u μm^2 , dok je zastupljenost subplastidnih struktura izražena u procentima ukupne površine plastida.

3.5.2. ***Imunocitohemijska detekcija askorbata i glutationa***

Detekcija Asc i GSH u mezofilu listova *P. zonale* var. „Ben Frenklin” adaptiranih na optimalni intenzitet PAR je urađena imunocitohemijskim metodama sa zlatom obeleženim sekundarnim antitelima, na i TEM.

3.5.2.1. Fiksiranje uzoraka

Fiksiranje uzoraka za imunocitohemijsku detekciju Asc i GSH je rađena po protokolu opisanom u *Zechmann et al. (2008)* i *Heynke et al. (2013)*. Uzorci listova su isečeni na isti način opisanom u poglavlju 3.5.1.1, dok je kao fiksativ upotrebljena smeša 2.5% paraformaldehida i 0.5% glutaraldehida u 0.06 M *Sørensen*-ovom puferu. Uzorci su infiltrirani i inkubirani u fiksativu na način opisan u poglavlju 3.5.1.1. Nakon ispiranja uzoraka (4×20 minuta u istom puferu), započeta je dehidracija postepenim povećavanjem koncentracije acetona (50%, 70% i 90%) 2×20 min za svaki korak. Zatim su uzorci postepeno infiltrirani u LR-White (*London Resin Company Ltd.*, Berkšir, Velika Britanija) smoli rastuće koncentracije (30%, 60% i 100% mešane sa 90% acetonom). Prvi korak je trajao četiri sata, drugi je trajao preko noći, a poslednji četiri sata, sutradan. Uzorci su zatim utopljeni u čistu, svežu LR-White smolu u želatinskim kapsulama i ostavljeni da polimerizuju 48 sati na 50 °C, pod strogo anaerobnim uslovima.

3.5.2.2. Sečenje i imunohemijsko obeležavanje uzoraka

Trimovanje i sečenje uzoraka do ultratankih preseka (80 nm) obavljeno je na isti način i sa istom opremom kao i u slučaju uzoraka za ultrastrukturno ispitivanje.

Za imunohemijsko obeležavanje Asc i GSH zlatnim česticama (*'immunogold labeling'*) primenjena je procedura *Zechmann et al.* (2008) i *Heynke et al.* (2013). Ultratanki preseki su prebačeni na prekrivena, rešetkasta postolja od nikla, a svi koraci obeležavanja su sprovedeni na automatskom sistemu za *'immunogold'* obeležavanje: *Leica EM IGL* (*Leica, Microsystems*). Idealna razblaženja i vremena inkubiranja sa primarnim antitelima: pacovski anti-Asc IgG (*Abcam plc, Kejmbridž, Velika Britanija*) i zečiji anti-GSH poliklonalni IgG (*Millipore Corp., Billerica, SAD*), kao i sa sekundarnim kozijim anti-pacovskim (za Asc) i anti-zečijim (za GSH) IgG-om (oba iz *British BioCell International, Kardif, Velika Britanija*) su utvrđena preliminarnim testovima i procenama intenziteta obeleživosti nakon serije proba. Za finalne koncentracije primarnih i sekundarnih antitela odabrane su one koje su pokazale minimalno pozadinsko obeležavanje van uzorka i maksimalno specifično obeležavanje u uzorku. Preseci su, dakle, najpre blokirani 20 minuta sa 2% govedeg serum albumina (BSA, *Sigma Aldrich, Sent Luis, SAD*) u puferisanom fiziološkom rastvoru (*phosphate buffered saline, PBS*: 1.5 mM KH_2PO_4 , 6.5 mM Na_2HPO_4 , 2.7 mM KCl, 0.14 M NaCl, pH 7.2). Nakon toga, uzorci su tretirani sa primarnim anti-Asc IgG, razblaženim 1:300 u PBS koji je sadržao i 1% BSA; i primarnim anti-GSH IgG razblaženim 1:50 u PBS koji je sadržao i 1% koziji serum, tokom 2 sata na sobnoj temperaturi. Nakon ispiranja u PBS-u (po kap PBS je stavljana na svaku rešetkicu, ostavljena 5 minuta i tako tri puta), uzorci su bili inkubirani sa sekundarnim antitelom razblaženim 1:50 (preseki za detekciju GSH) i 1:100 (preseki za detekciju Asc) konjugovanim sa nanočesticama koloidnog zlata (10 nm), u PBS-u tokom 90 min na sobnoj temperaturi. Po isteku tog vremena, uzorci su ispirani u PBS (3×5 min), a zatim i u destilovanoj vodi od (2×5 min) i odmah potom posmatrani pod *Philips CM10* TEM. Da bi se omogućila stabilnost uzorka za kasnija posmatranja, uzorci su dodatno kontrastirani u 2% uranil-acetatu rastvorenim u dejonizovanoj vodi tokom 15 s. Na ovaj način se izoštrava vidljivost preseka i postiže bolja rezolucija organela i ćelijskih struktura. Korišćena primarna anti-Asc antitela se vezuju i za Asc i za DHA (*Zechmann et al.* 2011), dok se primarno anti-GSH antitelo se vezuje za slobodnu karboksilnu grupu glicina i γ -glutamila, ne i za -SH

grupu, niti za amino-grupu glutamila (koja je konjugovana glutaraldehidom), pa je tako afinitet vezivanja ovog antitela jednako i za GSH i za GSSG (Queval *et al.* 2011).

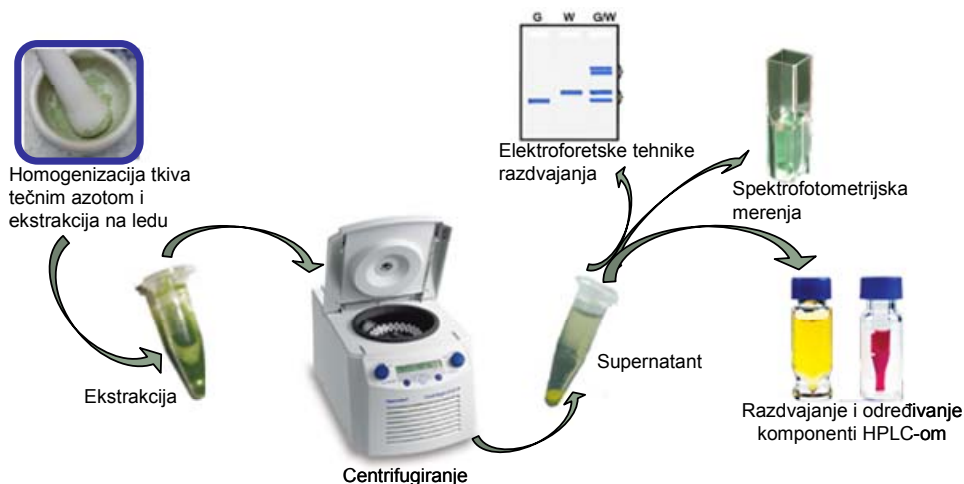
3.5.2.3. Kompjuterska obrada skeniranih preseka

Mikrografije nasumično fotografisanih ‘immunogold’ obeleženih preseka mezofilnih ćelija (palisadnog parenhima) su digitalizovane i zlatne čestice u mitohondrijama, peroksizomima, jedrima, plastidima, citosolu, apoplastu i vakuolama su automatski brojane pomoću programa *Cell D* sa alatom za analizu čestica. U najmanje 10 jedara, 15 peroksizoma i vakuola i 20 plastida i mitohondrija sa 15 različitih ćelija, iz namanje četiri različita uzorka po biljci, određivana je gustina zlatnih čestica. Rezultati su prikazani kao broj zlatnih čestica po μm^2 .

3.6. Biohemijski parametri biljaka *P. zonale* i *P. coleoides*

Za sve biohemijske analize (osim u slučaju analize fotosintetskih pigmenata) zeleni i beli delovi listova *P. zonale* i *P. coleoides* su isečeni, pažljivo odvojeni i odmah potom zamrznuti u tečnom azotu i čuvani na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, ili odmah homogenizovani u avanu sa tučkom, u prisustvu tečnog azota, potom ekstrahovani i centrifugirani u zavisnosti od analize, slika 3.12.

Pri uzorkovanju zelenog sektora lista uklonjen je centralni deo koji sadrži glavnu nervaturu. Tri do pet zrelih, potpuno osvetljenih listova sa svake biljke je uzorkovano. Za biohemijske analize u eksperimentima izlaganja UV-B zračenju, listovi tamjanika i muškati su bili uzorkovani poslednjeg dana tretmana i to od 14:00 do 15:00 h (CEV), a zatim su posebno, zeleno i belo tkivo poreklom od više listova sa iste biljke spojeni i momentalno zamrznuti u tečnom azotu kako bi se zaustavio metabolizam. Svi koraci do dobijanja finalnog ekstrakta su rađeni na ledu ili na $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.



Slika 3.12. Shematski prikaz pripreme uzoraka za analizu biohemijskih parametara u listovima biljaka *P. zonale* i *P. coleoides*. Nakon homogenizacije u avanu sa tečnim azotom, proteini ili metaboliti su ekstrahovani na ledu, a zatim centrifugirani, reekstrahovani i sakupljeni ekstrakti su dalje tretirani u zavisnosti od toga da li se analiza bazirala na tečnoj hromatografiji visokih performansi (HPLC), spektrofotometrijskoj ili elektroforetskoj tehnici.

3.6.1. Ekstrakcija i određivanje fotosintetskih pigmenata u listovima biljaka *P. zonale* i *P. coleoides*

Identična površina zelenog dela listova (3 cm^2) na kojoj je praćena izmena gasova (odeljak 2.4.2) isečena je u komori SSZ, momentalno zamrznuta u tečnom azotu i odložena na $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ do ekstrakcije. Ekstrakcija je urađena sa N, N-dimetilformamidom (DMF), dok su fotosintetski pigmenti (*hl* i karotenoidi) razdvojeni i kvantifikovani pomoću tečne hromatografije visokih performansi (HPLC) kuplovane sa fotodiodnim detektorom na aparatu *Waters Corp.*, Milford, SAD, kao što je opisano u *Wildi & Lütz* (1996). Deepoksidacioni indeks (Di) je izražen kao procenat zbira: $0.5 \times A$ i Z od zbira anteroksantina (A), zeaksantina (Z) i violaksantina (V).

3.6.2. *Ekstrakcija i određivanje fenolnih jedinjenja u listovima biljaka P. zonale i P. coleoides*

3.6.2.1. Ekstrakcija fenolnih jedinjenja

Zeleni i beli delovi listova *P. zonale* i *P. coleoides* su brzo samleveni u avanu pomoću tučka u tečnom azotu do finog praha, a zatim ekstrahovani u metanolu sa 0.1% HCl (1/10, w/v). Ekstrakcija je trajala 50 minuta na ledu u mraku, nakon čega su uzorci centrifugirani 10 minuta na 16 000 g na 4 °C. Supernatant je odvojen, a talog je dva puta re-ekstrahovan na isti način. Dobijeni ekstrakti i reekstrakti su nezavisno pripremani i analizirani.

Supernatanti (600 µl) su pomešani sa 400 µl dejonizovane vode i 600 µl hloroforma, promućkani i ostavljeni 45 minuta u mraku, na 4 °C, kako bi se izdvojila lipofilna jedinjenja koja bi mogla da otežavaju identifikaciju i kvantifikaciju fenolnih jedinjenja. Nakon toga, uzorci su centrifugirani 10 minuta na 16 000 g na 4 °C i gornji, vodeni sloj je podeljen na dva jednaka dela: prva polovina je upotrebljena za analizu fenolnih glikozida, a druga je hidrolizovana radi detekcije aglikona (60 minuta u 2M HCl na 85 °C) po modifikovanoj proceduri *Hertog et al.* (1992). Iz svih ekstrakata kiseonik je uklonjen barbotiranjem azotom nakon čega su uzorci odloženi na –80 °C do analize. Ekstrakcije su rađene u duplikatu.

Za određivanje procenta prinosa, odnosno ‘*recovery*’ tokom ekstrakcije i hidrolize, sprášeni uzorci listova su podeljeni na dva jednaka dela (po 150 mg); u jednu polovinu je dodato 20 µl alikvota 1 mg ml⁻¹ standarda fenolnih jedinjenja (Q, K, miricetina (M), pelargonidina (Pg), CA, Q-3-*O*-rutinozida, Cy-3-*O*-glukozida), a zatim su obe polovine ekstrahovane u metanolu sa 0.1% HCl, kako je opisano. Procedura ekstrakcije i hidrolize je ponovljena tri puta, sa i bez dodavanja hlorofila.

3.6.2.2. Identifikacija i kvantifikacija fenolnih jedinjenja

Dobijeni ekstrakti i hidrolizati su naneti (50 µl) na reverzno-faznu kolonu (5.0 µm, 250 × 4.6 mm *Luna C18(2)*, *Phenomenex Ltd.*, Torans, SAD) instaliranu u *Shimadzu LC-20AB Prominence* HPLC (*Shimadzu*, Kjoto, Japan). Elucioni gradijent je formiran pomoću rastvora A: acetonitril i rastvora B: sirćetna kiselina/acetonitril/fosfatna kiselina/voda:

10.0/5.0/0.1/84.9, v/v/v/v, pri brzini protoka od 1 mL min⁻¹ na 25 °C. Da bi se postiglo razdvajanje širokog spektra fenolnih jedinjenja, primenjen je sledeći gradijent: 0–5 min: 100% rastvor B (izokratska elucija); 5–25 min: 100–80% rastvor B (linearni gradijent); 25–35 min: 80–60% rastvor B (linearni gradijent) i 35–40 min: 60–100% rastvor B (linearni gradijent). Pre početka svake analize sistem je ekvilibrisan sa 100% rastvora B tokom 10 minuta. Fenoli su analizirani pomoću fotodiodnog detektora: SPD-M20A *diode array Prominence* i fluorescentnog detektora RF-10-AXL (*Prominence, Shimadzu*). Hromatogrami su snimani na različitim talasnim dužinama, u zavisnosti od specifičnog maksimuma apsorbcije, za datu grupu fenolnih jedinjenja, te su tako antocijani detektovani na 520 nm, flavon-3-oli na 360 nm, flavoni na 340 nm, hidroksicinamati na 320 nm, katehini, hidroksibenzojeve kiseline i njihovi derivati na 280 nm. Dobijeni hromatogrami su obrađivani u programu: *Shimadzu LC Solution software (Shimadzu)*. Pojedinačna fenolna jedinjenja su identifikovana na osnovu retencionih vremena i poređenjem njihovih spektara sa spektrima autentičnih standarda kao i metodom standardnog dodatka. Kvantifikacija pojedinačnih fenolnih jedinjenja bazirana je na određivanju površine pikova i standardnih pravih konstruisanih (u triplikatu) na osnovu pet različitih masenih koncentracija iz opsega 0.2 do 20 mg ml⁻¹ sveže pripremanih rastvora u metanolu sa 0.1% HCl. Preciznost i reproduktivnost metode je ispitivana injektiranjem standardnih rastvora četiri puta. *Recovery* za dato fenolno jedinjenje je izračunato tako što je od prosečne površine odgovarajućeg pika u ekstraktu/hidrolizatu oduzimana prosečna površina istog pika u uzorku bez dodatog standarda, i dobijena koncentracija je upoređivana sa koncentracijom standardnog rastvora.

Svi upotrebljavani rastvori su bili čistoće za HPLC ili su filtrirani kroz 0.45 µm najlonski membranski filter (FMNN4745: 47 mm, 0.45 µm, *Cronus*, Velika Britanija) na sistemu za filtraciju (*Premium Line, Labbox labwares*, Barselona, Španija).

Nakon identifikacije i kvantifikacije fenolnih jedinjenja u listovima biljaka *P. zonale*, *P. coleioides*, *A. altissima* i *T. platyphyllos*, izračunat je ukupni antioksidativni kapacitet (TAK) baziran na podacima predstavljenim u tabeli 3.2. Izmerene koncentracije fenolnih jedinjenja u odabranim vrstama su pomnožene sa odgovarajućim Trolox ekvivalentima antioksidativnih aktivnosti 1 mM rastvora datih fenolnih jedinjenja izraženih, prema *Rice-Evans et al.* (1996, 1997). Trolox (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilroman-2-karboksilna kiselina) je standardno upotrebljavan antioksidant, analog vitamina E koji je rastvoran u vodi.

Tabela 3.2. Relativni ukupni antioksidativni kapacitet fenolnih jedinjenja izražen kao Trolox ekvivalenti (TEAC), koncentracija Trolox-a koja ima jednaku antioksidativnu aktivnost kao 1 mM datog jedinjenja.

Fenolno jedinjenje	TEAC, mM	Fenolno jedinjenje	TEAC, mM
Asc	1.0	<i>flavoni</i>	
<i>HBA</i>		luteolin	2.1
galna kiselina	3.0	apigenin	1.5
protokatehuinska kis.	2.5*	<i>flavanoli</i>	
<i>p</i> -hidroksibenzoeva kis.	0.9*	katehin	2.4
siringinska kiselina	1.5*	epikatehin	2.5
<i>HCA i derivati</i>		<i>flavon-3-oli</i>	
hlorogena kiselina	1.3	miricetin	3.1
kafeinska kiselina	1.3	kvercetin	4.7
<i>p</i> -kumarna kiselina	2.2	kampferol	1.3
ferulinska kiselina	1.9	<i>antocijanidini</i>	
rozmarinska kiselina	2.6*	cijanidin	4.4
<i>flavanoni</i>		delfinidin	4.4
naringenin	1.5	malvidiin	2.1
hesperitin	1.1	pelargonidin	1.3

Podaci preuzeti iz Rice-Evans et al. 1996, 1997. * vrednosti su izračunate na osnovu struktura ostalih jedinjenja..

3.6.3. Ekstrakcija i određivanje redukovanog i oksidovanog askorbata u listovima biljaka *P. zonale* i *P. coleoides*

3.6.3.1. Ekstrakcija askorbata

Zaleđena tkiva zelenih i belih delova listova *P. zonale* i *P. coleoides* su brzo samlevena u avanu pomoću tučka, u tečnom azotu, a zatim ekstrahovana u 1.5% metafosfornoj kiselini (MPA) koja je sadržala 1 mM EDTA (1/10, w/v) i centrifugirani 8 min na 16 000 g na 4 °C (Tausz et al. 1998). Probnim uzorcima je pokazano da se jednom ekstrakcijom ekstrahuje više od 97% prisutnog Asc. Svi uzorci su ekstrahovani u triplikatu.

3.6.3.2. HPLC analiza askorbata

Prethodno dobijeni supernatanti (10 μ l) su odmah naneti na reverzno-faznu kolonu (CC 250/ 4.6 Nucleosil 100-5 C18, Macherey-Nagel, Duren, Nemačka). Elucija je urađena pomoću rastvora A: 80 mM K-fosfatni pufer, pH 6.5 i rastvora B: metanol. Uspostavljen je sledeći linerani gradijent: 0–15 min: 2.5 – 5.0% rastvor B pri brzini protoka od 0.8 ml min⁻¹ na 25 °C. Hromatogramski pik Asc je detektovan na 265 nm.

Za određivanje sadržaja totalnog askorbata, ekstrakti dobijeni u 3.6.3.1. su razblaženi 8 puta pomoću MPA korišćene za ekstrakciju i inkubirani sa 2.5 U AO (*Sigma-Aldrich*) u K-fosfatnom puferu, pH 4.5 tokom 5 minuta na sobnoj temperaturi, kako bi se postigla potpuna oksidacija Asc (*Polle et al.* 1990). Zatim je pH rastvora podešen na 8 pomoću 1 M KOH i odmah je započeta derivatizacija dobijenog DHA pomoću *orto*-fenilendiamina (*o*-PDA, 0.2 mM finalna koncentracija) tokom 20 minuta u mraku na sobnoj temperaturi. Reakcija je zaustavljena dodatkom 85% H₃PO₄ (finalno oko 1.65%). Derivatizovani uzorci (50 μ l) su naneti na reverzno-faznu kolonu CC 250/4.6 Nucleosil 100-5 C18, Macherey-Nagel. Pomoću rastvora A: 80 mM K-fosfatni pufer, pH 6.5 i rastvora B: metanol, uspostavljen je sledeći gradijent: 0-6 min: 30% rastvor B (izokratska elucija); 6.1-20.0 min: 55% rastvor B (izokratska elucija); 20.1-25.0 min: 55-30% rastvor B (linearni gradijent), pri brzini protoka od 0.8 ml min⁻¹ na 25 °C. Pre početka svake analize sistem je ekvilibrisan sa 30% rastvora B tokom 5 minuta. Intenzitet fluorescencije *o*-PDA-DHA derivata je merena na 430 nm nakon ekscitacije na 360 nm.

Za određivanje sadržaja redukovanog i ukupnog askorbata, korišćen je isti HPLC aparat kao i kod određivanja sadržaja fenolnih jedinjenja. Kvantifikacija je zasnovana na obradi površine pika Asc i *o*-PDA-DHA derivata i standardnih prava pomoću istog programa kao i za obradu fenolnih jedinjenja. Svi potrebni rastvori su bili HPLC čistoće ili su bili filtrirani kroz 0.45 μ m najlonski membranski filter, kao u slučaju određivanja fenolnih jedinjenja HPLC-om (pododeljak 3.6.2.1).

Količina DHA je određivana kao razlika količine ukupnog i količine Asc. Redoks koeficijent Asc (Rk) je predstavljen kao procenat sadržaja Asc u odnosu na sadržaj ukupnog askorbata.

3.6.4. *Ekstrakcija i određivanje redukovanog i oksidovanog glutationa u listovima biljaka P. zonale*

3.6.4.1. Ekstrakcija glutationa

Za određivanje sadržaja GSH i GSSG smrznuti uzorci belih i zelenih delova listova biljaka *P. zonale* su sprášeni u tečnom azotu i ekstrahovani na ledu u 0.1 M HCl sa 1 mM EDTA (1/7, w/v), kako je opisano u *Masi et al.* (2002). Nakon centrifugiranja 8 minuta na 16000 g na 4 °C supernatanti su sakupljeni i podeljeni na dva dela, jedan za određivanje GSH, a drugi za određivanje sadržaja ukupnog glutationa.

3.6.4.2. Redukcija glutationa i derivatizacija tiolnih grupa

Određivanje glutationa je bilo bazirano na derivatizaciji tiolne grupe sa fluorogenim obeleživačem poput amonijum-7-fluoro-2,1,3-benzooksadiazol-4-sulfonata (SBD-F), a zatim na detektovanju i kvantifikaciji dobijenog fluorescentnog derivata pomoću HPLC. Na ovaj način je dobijana količina redukovanog GSH u uzorku.

Da bi se odredila količina GSSG u uzorcima, bilo je potrebno da se redukuje do GSH, koji se potom derivatizovao SBD-F i dobijeni rezultat se odnosio na količinu ukupnog glutationa odnosno: GSH + 2GSSG, jer se redukovanjem 1 mola GSSG dobijaju 2 mola GSH. GSSG u ekstraktima je redukovan na sledeći način: 50 µl početnog ekstrakta je pomešano sa 10 µl 3 M rastvora NaBH₄ u 0.1 M NaOH i inkubirano 30 minuta na šejkeru, na 55 °C. Reakcija je prekinuta dodatkom 50 µl 1M HCl koja sadrži 1 mM EDTA.

Derivatizacija -SH grupa se dešava na baznim pH, te je u alikvot razblaženih ekstrakata i redukovanih uzoraka (110 µl) dodavano po 117 µl 1 M K-boratnog pufera, pH 10.5. Odvojen je alikvot od 117 µl u koji je dodato 33 µl 0.3% SBD-F i inkubirano sat vremena na šejkeru, na 55 °C zaštićeno od svetla (*Masi et al.* 2002). Derivatizacija je prekinuta dodatkom 35 µl 2 M HCl sa 2 mM EDTA, na ledu.

3.6.4.3. Identifikacija i kvantifikacija SBD-F/GSH derivata

Derivatizovani uzorci (20 µl) su naneti na reverzno-faznu kolonu (5.0 µm, 250 × 4.6 mm *Luna C18(2)*, *Phenomenex Ltd.*). Elucija je postignuta pomoću rastvora A: 75 mM NH₄⁺-

formijatnog pufera, pH 2.9 i rastvora B: metanol (modifikovano prema *Tolin et al.* 2013). Uspostavljen je sledeći linerani gradijent: 0-25 min: 10-25% rastvor B, pri brzini protoka od 1 ml min⁻¹ na 25 °C. Pre početka svake analize sistem je preekvilibrisan sa 10% rastvora B tokom 10 min. Intenzitet fluorescencije SBD-F/GSH derivata je meren na 516 nm, nakon ekscitacije na 386 nm pomoću fluorescentnog detektora. Efikasnost redukcije i „*recovery*“ ekstrakcije GSH su testirani pomoću standardnih rastvora GSSG i GSH.

I za redukovani i za ukupni glutation upotrebljen je isti tečni hromatografski sistem kao i kod određivanja fenolnih jedinjenja i Asc. Kvantifikacija je zasnivana na obradi površine pika SBD-F/GSH derivata pomoću standardne prave za GSH (injektovano je 0.5–25 µM GSH) u istom programu upotrebljenim i u prethodnim analizama. Pre injektovanja na kolonu, uzorci su prečišćeni filtriranjem kroz 0.22 µm najlonske špric filtere (Kinesis ESF-NY-13/25-022, spoljnog prečnika 13/25 mm).

3.6.5. Ekstrakcija i određivanje rastvornih ugljenih hidrata iz listova biljaka *P. zonale*

3.6.5.1. Ekstrakcija rastvornih ugljenih hidrata

Zaleđena tkiva zelenih i belih delova listova *P. zonale* i *P. coleoides* homogenizovana su pomoću tečnog azota, a zatim ekstrahovana dejonizovanom vodom tokom 30 minuta u ultrazvučnom kupatilu na 25 °C. Nakon toga, homogenati su centrifugirani 5 minuta na 16 000 g na 25 °C. Re-ekstrakcija taloga je ponovljena sa metanolom na isti način kao i prethodno sa vodom. Dobijeni supernatanti, ekstrakti i re-ekstrakti su spojeni pre analize. Ovakav način ekstrakcije je ustanovljen nakon što su urađeni probni eksperimenti ekstrakcije u vodi, na osnovu metoda *Stagnari et al.* (2007) i *Pavlović et al.* (2013), u smeši metanol/hloroform/voda, 12:5:3, v/v/v i u 80% ključalom etanolu po *Chow & Landhäusser* (2004). Svi uzorci su ekstrahovani u duplikatu.

3.6.5.2. Identifikacija i kvantifikacija rastvornih ugljenih hidrata

Hromatografsko razdvajanje rastvornih ugljenih hidrata u dobijenim ekstraktima urađeno je na anjon-izmenjivačkoj koloni: *Carbo Pac® PA-100* (4×250 mm) (*Dionex*, Sanivejl, SAD), pomoću *DIONEX ICS 3000 DP* HPLC (*Dionex*) (*Pavlović et al.* 2007).

Mobilna faza se sastojala od rastvora A: 600 mM NaOH, rastvora B: 500 mM Na-acetat i rastvora C: ultra čista voda, pri brzini protoka od 0.7 ml min^{-1} na $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Uspostavljen je sledeći gradijent: 0-5 min: 15% rastvor A, 85% rastvor C (izokratska elucija); 5.0-5.1 min: 15% rastvor A, 2% rastvor B, 83% rastvor C; 5.1-12.0 min: 15% rastvor A, 2% rastvor B, 83% rastvor C (izokratska elucija); 12.0-12.1 min: 15% rastvor A, 4% rastvor B, 81% rastvor C; 12.1-20.0 min: 15% rastvor A, 4% rastvor B, 81% rastvor C (izokratska elucija); 20.0-20.1 min: 20% rastvor A, 20% rastvor B 60% rastvor C; 20.1-30.0 min: 20% rastvor A, 20% rastvor B 60% rastvor C (izokratska elucija). Pre početka svake analize sistem je ekvilibrisan sa 15% rastvora A i 85% rastvora C tokom 15 min. Svaki uzorak ($25 \mu\text{l}$) je injektovan pomoću *ICS AS-DV 50* autosempleta (*Dionex*). Elektrohemijski detektor je za radnu imao zlatnu elektrodu, a za referentnu Ag/AgCl elektrodu.

Standardni rastvori glukoze (Glc), Fru i Suc su pripremljeni pomoći *Ultrapure TKA* vode u masenoj koncentraciji od 1000 ng ml^{-1} , dok su standardni rastvori ostalih analiziranih ugljenih hidrata bili 100 ng ml^{-1} . Smeša za kontrolu kvaliteta koja je korišćena za praćenje performansi instrumenta se sastojala od razblaženih standarda u masenoj koncentraciji od $0.9\text{-}100 \text{ ng ml}^{-1}$, u zavisnosti od koncentracije datog šećera u uzorku.

3.6.6. Ekstrakcija antioksidativnih enzima iz listova biljaka *P. zonale* i *P. coleoides*

Zeleni i beli deo listova *P. zonale* i *P. coleoides* su posebno isečeni i odmah potom zamrznuti u tečnom azotu i čuvani na $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Kod uzorkovanja zelenog dela lista uklonjen je centar koji je sadržao glavnu nervaturu i nije upotrebljen u analizi (zbog relevantnije mase listova). U svim ekstrakcijama, smrznuto tkivo zelenih i belih segmenata listova *P. zonale* i *P. coleoides* je sprášeno u avanu pomoću tučka i tečnog azota uz dodatak 5% (w/v) nerastvornog polivinil-pirolidona (PVP) i ekstrakcionog pufera za dati enzim (u odnosu 1:5, w/v). Nakon otapanja uzoraka, sadržaj je iz avana brzo prenet u *Eppendorf* epruvice uz dodavanje 5% (w/v) koktela inhibitora proteaza (P2714, *Sigma-Aldrich*), a zatim su uzorci inkubirani 30 minuta na ledu uz povremeno okretanje epruvice. Nakon toga, ekstrakti su centrifugirani 10 min na $10\,000 \text{ g}$ na $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$, nakon čega su supernatanti odvojeni za merenje aktivnosti rastvornih enzima. Iz svih ekstrakata su uzeti alikvoti za određivanje koncentracije proteina. Svi koraci su rađeni na ledu ili na $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.6.6.1. Ekstrakcija peroksidaza III klase, katalaze i superoksid-dismutaze

Ekstrakcija POD (EC 1.11.1.7), CAT (EC 1.11.1.6) i SOD (EC 1.15.1.1) iz zelenih i belih delova listova *P. zonale* i *P. coleoides* urađena u 100 mM K-fosfatom puferu pH 7.0 koji je sadržavao i 1 mM EDTA, 0.1% (w/v) Triton X-100, po metodi opisanoj u *Morina et al.* 2010.

3.6.6.2. Ekstrakcija askorbat-peroksidaze

Ekstrakcija APX (EC 1.11.1.11) je zahtevala posebnu opreznost, pošto se, kako je već opisano u poglavlju 2.4.1.4., APX aktivnost pri niskim koncentracijama Asc u medijumu brzo gubi. Pošto i muškatala i tamjanika imaju visok sadržaj fenola (Asc se dodatno troši na redukciju fenoksi-radikala), nakon optimizacije, u ekstrakcioni medijum: 100 mM K-fosfatni pufer pH 7.2 sa 1 mM EDTA, 0.1% (w/v) Triton X-100, dodavan je i 10 mM Asc. Nakon inkubiranja na ledu, uzorci su centrifugirani. Aktivnost rastvornih izoformi je određivana odmah po dobijanju supernatanta, dok su za ekstrakciju membranskih, talozi resuspendovani u istom rastvoru kao i za rastvorne, uz dodatak 20 mM (1.3%) 3-[(3-holamidopropil)dimetilamonijum]-2-hidroksi-1-propan sulfonat (CHAPSO) (modifikovano po *Veljović Jovanović et al.* 2001). Osetljivost APX izoformi na prisustvo Asc u medijumu ispitivana je ekstrakcijom APX u prisustvu 2 mM i 10 mM Asc.

3.6.6.3. Ekstrakcija monodehidroaskorbat-reduktaze, dehidroaskorbat-reduktaze i glutation-reduktaze

Ekstrakcija MDAR (EC 1.6.5.4), DHAR (EC 1.8.5.1) iz homogenizovanog tkiva belog i zelenog dela listova rađena je u 100 mM HEPES-KOH puferu, pH 7.8 sa 2 mM EDTA, 5 mM MgCl₂, 5 mM ditioneitolom (DTT) i 0.1% (w/v) Triton X-100 (*Yamasaki et al.* 1999; *Morina et al.* 2010). Ekstrakcioni medijum za GR (EC 1.8.1.7) bio je sličan gore navedenom: koncentracija EDTA je bila 2 mM, a umesto 5 mM DTT dodat je 2 mM β-merkaptioetanol. Aktivnost enzima je određivana odmah po dobijanju supernatanta.

3.6.7. Određivanje sadržaja ukupnih rastvornih proteina u listovima biljaka *P. zonale* i *P. coleoides*

Sadržaj proteina u svim uzorcima je određivana spektrofotometrijski, metodom vezivanja boje po *Bradford* (1976). Ova metoda se zasniva na reakciji boje CBB (*Coomassie brilliant blue*) s različitim bočnim ostacima aminokiselina proteina, pri čemu se apsorpcioni maksimum boje pomera sa 465 nm (kada nema proteina) na 595 nm (kompleks boja-protein). Meri se porast apsorpcije na 595 nm, nakon inkubacije sa bojom tokom 30 minuta na sobnoj temperaturi. Supstance koje mogu biti prisutne u ekstrakcionom puferu, poput ugljenih hidrata i veće koncentracije detergenata, interferiraju sa esejem. Probim testovima utvrđeno je da [Triton X-100] > 0.25% (w/v), značajno utiče na linearnu zavisnost koncentracije proteina i apsorpcije na 595 nm, dok 0.1%, koji je i najčešće korišćen u ekstrakcijama enzima ne utiče na linearnost metode.

Proteini su određivani u mikrotitar pločicama dodavanjem ekstrakta/rastvora BSA standardnih koncentracija u 200 μ l radnog Bradfordovog reagensa, a apsorpcija je očitavana nakon 30 minuta, na spektrofotometrijskom čitaču mikro titar pločica. Sadržaj proteina u uzorcima je određivan sa standardne prave koja je urađena za masene koncentracije BSA u opsegu od 0.1-1.0 mg ml⁻¹, a zapremina dodanih ekstrakta je bila 2.5 ili 5 μ l (u zavisnosti od koncentracije proteina u njima). Štok rastvor boje (100 ml) je pravljen mešanjem: 100 mg CBB-R-250, 100 ml 85% H₃PO₄, 50 ml metanola i 50 ml vode. Pre upotrebe rastvor boje je razblaživan pet puta destilovanom vodom i filtriran kroz filter papir.

3.6.8. Određivanje aktivnosti enzima u listovima biljaka *P. zonale* i *P. coleoides*

Aktivnosti enzima u ekstraktima listova biljaka *P. zonale* i *P. coleoides* su merene spektrofotometrijski na UV-VIS spektrofotometru sa temperaturnom kontrolom (*Shimadzu* UV-160, Kjoto, Japan). Sva merenja su izvršena u triplikatu na 25 °C. Svi eseji su prethodno bili optimizovani i prilagođeni eksperimentalnim vrstama. Dobijene koncentracije enzimske aktivnosti su izražavane kao specifične aktivnosti po koncentraciji ukupnih proteina (Sp, U mg⁻¹), ili po masi svežeg tkiva (A_{fw}, U g⁻¹_{FW}). Da bi ispitali efikasnost ekstrakcije POD, CAT i SOD, talozi dobijeni nakon centrifugiranja na 10 000 g su reekstrahovani istim ekstrakcionim puferom i u dobijenim reekstraktima nije nađena značajna aktivnost.

3.6.8.1. Određivanje aktivnosti POD

Peroksidaze III klase oksiduju mnoge fenolne supstrate, koristeći H_2O_2 kao oksidujuće sredstvo (pododeljak 2.4.1.3). Međutim afinitet za vezivanje ovih supstrata nije isti (neke izoforme imaju veći afinitet od drugih za dato fenolno jedinjenje) (*Hadži-Tašković Šukalović et al.* 2005). Zato je POD aktivnost u listovima obe vrste merena sa više supstrata. U svim esejima brzina enzimske reakcije je merena u 100 mM K-fosfatnom puferu pH 6.5 sa 1 mM EDTA, a reakcija je započinjana dodatkom H_2O_2 . Brzina oksidacije fenola bez H_2O_2 je u svim esejima oduzimana od H_2O_2 zavisne enzimske reakcije. Jedinica POD aktivnosti je definisana kao količina enzima dovoljna da katalizuje oksidaciju 1 μ mol fenolnog jedinjenja (gvajakol, CA, FA, CGA, Q) u minuti na 25 °C u datim uslovima. U slučaju Cat, jedinica aktivnosti POD predstavlja onu količinu enzima koja može da dovede do promene A^{440} za jednu AU po sekundi (*Richard-Forget & Gauillard* 1997).

- gvajakol kao supstrat

Aktivnost POD sa gvajakolom (2-metoksifenol) kao donorem elektrona, je analizirana po modifikovanoj metodi iz *Veljović Jovanović et al.* (2006). U kivetu sa puferom najpre je dodat gvajakol (finalna koncentracija: 5 mM), zatim 30 puta razblažen ekstrakt i na kraju 1 mM H_2O_2 . Aktivnost POD je računata preko porasta apsorbancije na 470 nm što odgovara stvaranju oksidovanog proizvoda, tetragvajakola ($\epsilon^{470}_{\text{tetragvajakol}} = 26.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

- CA kao supstrat

Aktivnost POD sa CA kao donorem elektrona za redukciju H_2O_2 je određivana kroz pad apsorbancije na 312 nm ($\epsilon^{312}_{\text{CA}} = 18.3 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; *Chen & Ahn* 1998). U kivetu sa K-fosfatnim puferom najpre je dodata CA (finalna koncentracija: 0.05 mM), zatim 30 puta razblažen ekstrakt, a reakcija je započinjana dodatkom 1 mM H_2O_2 .

- FA kao supstrat

Aktivnost POD da oksiduje FA analizirana je praćenjem pada apsorbancije na 312 nm ($\epsilon^{312}_{\text{FA}} = 17.1 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; *Chen & Ahn* 1998). Reakciona smeša je sadržala 100 mM K-fosfatni pufer, pH 6.5, 1 mM EDTA, 0.05 mM FA, 30 puta razblažen ekstrakt i 1 mM H_2O_2 .

- CGA kao supstrat

Aktivnost POD da oksiduje CGA određivana je praćenjem pada apsorbancije na 323 nm ($\epsilon^{323}_{CGA} = 17.2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; *Raghavendra et al.* 2007). Reakciona smeša je sadržala 100 mM K-fosfatni pufer, pH 6.5, 1 mM EDTA, 0.05 mM CGA, 30 puta razblažen ekstrakt i 1 mM H₂O₂.

- Cat kao supstrat

Aktivnost POD da redukuje H₂O₂ pomoću Cat kao donora elektrona je određivana preko porasta apsorbancije na 440 nm (apsorpcioni maksimum oksidovanog proizvoda određen snimanjem spektara u toku reakcije). U kivetu sa puferom dodat je 1 mM Cat, 30 puta razblažen ekstrakt i 1 mM H₂O₂.

- Q kao supstrat

Peroksidativna aktivnost POD sa Q je određivana pomoću smanjenja apsorbancije na 374 nm ($\epsilon^{374}_Q = 28.4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; *Chen & Ahn* 1998). Reakciona smeša je sadržala 0.05 mM Q, 30 puta razblažen ekstrakt i 1 mM H₂O₂.

3.6.8.2. Određivanje aktivnosti SOD

Aktivnosti superoksid-dismutaza su određivane metodom po pionirskoj studiji *McCord*-a i *Fridovich*-a (1969) zasnovanoj na redukciji oksidovanog citohroma c (cyt c), što je praćeno promenom apsorbancije na 550 nm. Reakciona smeša se sastojala od 50 mM Na-fosfatnog pufera, pH 7.8, 0.1 mM EDTA, 0.01 mM cyt c, 0.05 mM ksantina i uzorka razblaženog 20 puta. Reakcija je započinjala dodavanjem ksantin oksidaze u reakcionu smešu, dovoljno da produkuje brzinu redukcije cyt c (Fe³⁺) od 25 mA⁵⁵⁰ min⁻¹ na 25 °C. Jedna enzimaska jedinica SOD je definisana kao količina enzima koja dovodi do 50% inhibicije redukcije cyt c na 25 °C u datim uslovima (npr. da smanje brzinu za 12.5 mA⁵⁵⁰ min⁻¹). Nakon 30 minuta inkubacije uzoraka sa 5 mM KCN na ledu (čime je inhibirana aktivnost Cu/ZnSOD) merena je aktivnost MnSOD i FeSOD, a inkubiranjem sa 5 mM H₂O₂ inhibirana je aktivnost Cu/Zn SOD i FeSOD, merena je aktivnost samo MnSOD (*Morina et al.* 2010).

3.6.8.3. Određivanje aktivnosti CAT

Reakciona smeša za određivanje aktivnosti katalaze se sastojala od 50 mM K-fosfatnog pufera, pH 7.1, 1 mM EDTA i 20 mM H₂O₂, a reakcija je započinjala dodavanjem ekstrakta razblaženog 30 puta (*Veljović Jovanović et al.* 2001). Redukcija H₂O₂ je praćena kroz pad apsorbancije na 240 nm ($\epsilon_{\text{H}_2\text{O}_2}^{240} = 43.6 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Jedinica CAT aktivnosti je definisana kao količina enzima koja je dovoljna da katalizuje redukciju 1 μmol H₂O₂ u minuti na 25 °C u datim uslovima.

3.6.8.4. Određivanje aktivnosti APX

Esej za određivanje APX aktivnosti je optimizovan u odnosu na esej objavljen od strane Nakana i Asade (1981) za date biljne vrste, imajući u vidu pH optimum i K_M vrednosti za Asc i H₂O₂, prethodno određene pilot merenjima. Aktivnost APX je određivana kao smanjenje apsorbancije na 290 nm u reakcionoj smeši koja se sastojala od 50 mM K-fosfatnog pufera, pH 7.2, 2 mM EDTA, 0.2 mM Asc i ekstrakta razblaženog 30 puta ($\epsilon_{\text{Asc}}^{290} = 2.8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Reakcija je započinjana dodatkom 20 μl 10 mM H₂O₂ (finalna koncentracija: 0.2 mM). Oduzimana je neenzimska reakcija dobijena bez prisustva ekstrakta. Enzimska jedinica APX je definisana kao količina enzima koja je dovoljna da katalizuje oksidaciju 1 μmol Asc u minuti na 25 °C u datim uslovima.

3.6.8.5. Određivanje aktivnosti MDAR

Reakcija za određivanje aktivnosti MDAR je zasnovana na redukciji MDA[•], prethodno stvorenog pomoću Asc i AO (*Hossain & Asada* 1985). Reakciona smeša (1 ml) se sastojala od 50 mM HEPES-KOH pufera (pH 7.8), 2.5 mM Asc, 2 U AO, 0.25 mM NADH i 50 μl ekstrakta. Reakcija je praćena na 340 nm (apsorpcioni maksimum za NADH, $\epsilon_{\text{NADH}}^{340} = 6.2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) i najpre je tokom 3 min snimana razlika u apsorbanciji koja je odgovarala MDA[•] nezavisnoj oksidaciji NADH (u odsustvu AO). Jedna jedinica MDAR aktivnosti odgovara onoj količini enzima koja može da katalizuje oksidaciju 1 μmol NADH u minuti, na 25 °C u datim uslovima.

3.6.8.6. Određivanje aktivnosti DHAR

Aktivnost DHAR je određivana prema modifikovanoj metodi, objavljenoj od strane *Hossain & Asada* (1984b). Reakciona smeša od 1 ml sadržala je: 50 mM K-fosfatni pufer, pH 7.8, 1 mM EDTA, 0.2 mM DHA i 50 µl ekstrakta, a dodavanjem 2 mM GSH započeta je reakcija. Praćen je porast apsorbancije na 265 nm, što odgovara brzini formiranja Asc ($\epsilon^{265}_{Asc} = 14.1 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Brzina neenzimske reakcije između GSH i DHA je oduzimana, dok je GSH nezavisna redukcija DHA bila zanemarljiva. Jedinica DHAR aktivnosti je definisana kao ona količina enzima koja je dovoljna da katalizuje redukciju 1 µmol DHA u minuti na 25 °C u datim uslovima.

3.6.8.7. Određivanje aktivnosti GR

Aktivnost GR određivana je metodom koju su najpre opisali *Foyer & Halliwell* (1976). Reakciona smeša se sastojala od 50 mM K-fosfatnog pufera, pH 7.8, 2 mM EDTA, 0.1 mM NADPH i ekstrakta razblaženog 20 puta. Reakcija je započinjana sa 1 mM GSSG i praćeno je smanjenje apsorbance na 340 nm usled oksidacije NADPH ($\epsilon^{340}_{NADPH} = 6.2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Brzina GSSG nezavisne oksidacije NADPH je praćena tri minuta i oduzimana je od ukupne brzine reakcije oksidovanja NADPH. Finalni rezultat je bio korigovan i za neenzimsku oksidaciju NADPH GSSG-om. Enzimaska jedinica GR aktivnosti predstavlja onu količinu enzima koja je dovoljna da katalizuje oksidaciju 1 µmol NADPH u minuti na 25 °C, pri datim uslovima.

3.6.9. ***Određivanje stepena karbonilacije rastvornih proteina iz listova biljaka P. zonale i P. coleoides***

Određivanje stepena oksidativne karbonilacije proteina bazirano je na reakciji karbonila sa 2,4-dinitrofenilhidrazinom (DNPH) na način opisan u *Morina et al.* (2010).

Alikvot od 100 µl ekstrakta ukupnih rastvornih proteina (ekstrakt dobijen kao što je opisano u poglavlju 3.6.5.1) resuspendovan je u 500 µl 10 mM DNPH, rastvorenog u 2 M HCl, i inkubiran 1 h na sobnoj temperaturi u mraku. Za negativne kontrole u 100 µl uzorka dodato je 500 µl 2 M HCl. Nakon inkubacije, proteini su taloženi sa 20% trihlorsirćetnom kiselinom (TCA) i centrifugirani 10 minuta na 5000 g. Talози su isprani 3× smešom

etanol:etil-acetat, 1:1 (v/v), a na kraju centrifugirani 10 minuta na 1000 g. Finalno, talozi su resuspendovani u 8 M urei. Sadržaj karbonila određivan je merenjem apsorbance na 370 nm i primenom ekstinkcionog koeficijenta za alifatične hidrazone ($\epsilon^{370} = 22000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Dobijeni rezultati izraženi su kao nmol proteinskih karbonila po mg ukupnih proteina.

3.6.10. Elektroforsko razdvajanje proteina iz ekstrakata listova biljaka *P. zonale*

Vertikalna elektroforeza je rađena na *Mini-PROTEAN[®] II* vertikalnom elektroforetskom sistemu (*Bio-Rad*, Minhen, Nemačka) na poliakrilamidnom gelu (PAG) debljine 1 mm, osim ako nije drugačije naglašeno. Na gel su uvek nanošene iste količine proteina, osim ako nije drugačije naglašeno. Poliakrilamidni gel je pravljen od 30% rastvora akrilamidnog (AA) rastvora koji je sadržavao 29% AA i 1% N,N' bis AA.

3.6.10.1. Vertikalna elektroforeza na poliakrilamidnom gelu pod nenedaturišućim uslovima (PAGE)

Da bi se ispitala zastupljenost izoformi u „sirovim“ proteinskim ekstraktima proteini su najpre razdvajani vertikalnom elektroforezom na PAG pod nenedaturišućim uslovima. Na ovaj način, izoforme su se razdvajale na osnovu odnosa naelektrisanje/masa. Pre nanošenja na gel, uzorci su bili pomešani sa 50% glicerolom u odnosu 2:1 i na kraju je dodavana kap razblaženog rastvora brom fenol plavog (BFP). Vertikalnom nativnom PAG elektroforezom (PAGE) su razdvajane APX, POD i SOD izoforme iz ekstrakata listova biljaka *P. zonale*.

- razdvajanje APX izoformi

Nativna PAGE za detekciju APX izoformi je rađena sa 5% gelom za koncentrovanje (*'stacking gel'*) i gradijentnim 10-15%, gelom za razdvajanje (*'running gel'*). Gel za koncentrovanje se sastojao iz 5% akrilamida (AA), 0.1% amonijum-persulfata (APS), 0.1% N,N,N',N'-tetrametil-etan-1,2-diamina (TEMED) rastvorenih u 0.13 M TrisHCl puferu, pH 6.8. Gradijentni gel za razdvajanje je pravljen pomoću gradijentnog suda i 10- i 15%-nih gelova za razdvajanje (10% (15%) AA, 0.1% APS, 0.1% TEMED) rastvorenih u 0.375 M TrisHCl puferu, pH 8.8. Pre nanošenja na gel, uzorci su koncentrovani liofilizacijom u prisustvu 50 M Suc (radi stabilizacije APX i boljeg resuspendovanja liofilizata). U sve bunare je nanošeno oko 100 µg proteina. Elektroforeza je rađena u Tris-Gly puferu, pH 8.30 (0.025 M

Tris HCl i 0.192 M Gly) sa 2 mM Asc (kako bi se sačuvala aktivnost APX) na ledu (*De Gara et al.* 1997, 2000). Intenzitet napona je iznosio 120 V dok su uzorci bili u gelu za koncentrovanje, nakon čega je napon smanjen do 100 V. Elektroforeza je prekinuta kada je boja BFP stigla do kraja gela, što je bilo otprilike 2-3 sata od početka.

- razdvajanje SOD, POD i CAT izoformi

Nativna PAGE za razdvajanje SOD izoformi je rađena pod istim uslovima kao i za APX, s tim što pufer za elektroforezu nije sadržavao Asc (*Kukavica & Veljović Jovanović* 2004) i u slučaju CAT je trajala oko 4.5-5 sati. Za zimograme, razdvajanje POD izoformi je rađeno na 10% gelu, a razdvajanje CAT izoformi na 8% gelu. U sve bunare je nanošeno po 20-40 µg proteina.

3.6.10.2. Vertikalna elektroforeza na poliakrilamidnom gelu pod denaturišućim uslovima (SDS-PAGE)

Za razliku od elektroforeze pod nendenaturišućim uslovima, dodavanjem detergenta natrijum-dodecil-sulfata (SDS) proteinski uzorci se denaturišu. Zapravo molekuli SDS (nosioci negativnog naelektrisanja) se vezuju za polipeptidni lanac u količini koja je proporcionalna masi polipeptida. Ova negativna naelektrisanja se međusobno odbijaju te dolazi do promene konformacije proteina u izduženi, razmotani polipeptidni lanac. Ovaj efekat se pojačava ako se proteinski ekstrakti kuvaju sa DTT koji redukuje disulfidne mostove proteina i tako destabilizuje terciarnu i kvaternarnu strukturu proteina. Ovako denaturisani, izduženi polipeptidni lanci negativnog naelektrisanja se razdvajaju isključivo na osnovu mase. Naravno treba voditi računa da se ovako na gelu dobijaju samo monomeri. SDS-PAGE (takođe poznata i kao *Laemmli*-jeva metoda, *Laemmli* 1970) se često koristi kao korak razdvajanja koji prethodi drugom koraku identifikacije, odnosno nekoj tehnici koja je zasnovana na drugačijem principu razdvajanja (npr. izoelektrofokusanje u 2D elektroforezi, ili imunohemijska detekcija u imunoblot tehnici visoke osetljivosti i specifičnosti).

SDS-PAGE je rađena na gradijentnom (10-15%), na 10, 12 i 15% gelovima za razdvajanje i na 5% gelu za koncentrovanje. Gelovi su bili istog sastava kao i kod nendenaturišuće PAGE. Pre nanošenja na gel, uzorci su razblaženi u odnosu 1:2 u puferu za uzorke (tako da su finalne koncentracije za nanošenje iznosile: 62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8, 2%

(w/v) SDS, 10% (w/v) glicerol, 100 mM (1.5%) DTT i 0.002% BFP, w/v) i kuvani 30 minuta na 100 °C. Nakon toga, uzorci su nanošeni na gel i to po 10-20 µg proteina u svaki bunarčić. Elektroforeza je rađena u Tris-Gly puferu, pH 8.3 sa dodatkom 10% SDS. Za tačnu identifikaciju molekulskih masa svake izoforme upotrebljeni su proteinski markeri masa u opsegu 10-260 kDa (*Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder*, Thermo Scientific, Rokford, SAD).

3.6.10.3. Izoelektrofokusingiranje (IEF) proteina

Da bi se izoforme enzima razdvojile na osnovu pI vrednosti (izoelektrična tačka), uzorci su izoelektrofokusingirani pomoću horizontalnog *Multifor* sistema (*Amersham, Biosciences*). Izoforme proteina razdvojene su u pH gradijentu od 3.0-9.3, na 7.5% PAG (čiji je sastav bio 7.5% AA, 7 mM TEMED, 0.05% APS, 13.3% glicerol i 3% smeše amfolita). Gel je bio debljine 0.1 mm, širine 15 cm i visine 11 cm, anodni elektrolit bila je 75 mM H₂SO₄, a katodni 150 mM NaOH (*Morina et al.* 2010, 2013). Za tačnu identifikaciju pI vrednosti svake izoforme upotrebljeni su markeri proteina sa pI opsegom 3.6-9.3 (*IEF-M1A, Sigma-Aldrich*). Količina proteina koji su nanošeni na svaki aplikacioni papirić (analog bunariću) bila je 15 µg. Izoelektrofokusingiranjem su razdvajane POD i SOD izoforme iz ekstakata listova biljaka *P. zonale*. Razdvajanje je rađeno na 5 °C, pri konstantnoj snazi od 10 W tokom predfokusiranja (30 min) i 15 W tokom fokusiranja (2-3 sata) dok jačina struje nije opala na oko 8 mA i veoma malo se nadalje smanjivala.

3.6.10.4. Vizuelizacija dobijenih proteinskih traka i izoformi na gelu

Po završetku svih elektroforeza, gelovi su dobro isprani destilovanom vodom, a zatim je pristupljeno inkubiranjima sa supstratima i daljem postupku bojenja. Relativni inteziteti dobijenih proteinskih traka su određivani merenjem gustine u programu *Total Lab*.

- detekcija proteinskih traka

Proteinske trake su fiksirane u rastvoru 50% metanola i 10% sirćetne kiseline u destilovanoj vodi tokom 20 minuta, zatim su bojene sa 0.1% CBB rastvorenim u prethodno korišćenom rastvoru za fiksiranje tokom 20 minuta (*Veljović Jovanović & Kukavica 2006*). Višak boje je ispiran preko noći u rastvoru 5% metanola i 7% sirćetne kiseline u destilovanoj vodi. Ovako su bojene i trake sa pI markerima dobijene IEF.

Daleko osetljiviji (do 100×) metod detekcije proteinskih traka od bojenja CBB bojom jeste bojenje srebrom. Nakon ispiranja destilovanom vodom, gelovi sa proteinima su fiksirani 3×30 min ili preko noći u fiksativu sačinjenom od 30% etanola i 10% sirćetne kiseline u destilovanoj vodi. Nakon toga, gelovi su ispirani prvo od sirćetne kiseline 10 min u 20% etanolu, a zatim od etanola destilovanom vodom, 10 min. Gelovi su zatim senzitivisani mućkanjem u rastvoru 0.02% Na₂S₂O₃ 1 minut, i naknadno ispirani 3×20 s destilovanom vodom. Bojenje je rađeno potapanjem gelova u rastvor 0.2% AgNO₃ (pravi se svež iz 20% stoka) i 0.027% HCHO u destilovanoj vodi. Nakon ispiranja gelova 10 minuta u destilovanoj vodi, pristupljeno je razvijanju boje, ispiranjem u rastvoru 3% Na₂CO₃ (najbolji od proizvođača *Merck*), 0.001% Na₂S₂O₃ i 0.009% HCHO u destilovanoj vodi. Datim rastvorom je najpre pažljivo isprana „skrama” sa površine gelova, a zatim su gelovi mućkani u njemu do uočavanja proteinskih traka. Da bi se sprečilo prebojavanje traka, gelovi su inkubirani u „stop reagensu” (2.5% sirćetne kiseline i 5% Tris-a u destilovanoj vodi) 30 minuta, a zatim su ispirani destilovanom vodom.

- detekcija APX izoformi sa PAGE

Metod za detekciju APX upotrebljen u ovoj disertaciji objavljen je u *De Gara et al.* (1997, 2000). Po završetku PAGE, gelovi su isprani u destilovanoj vodi i inkubirani u u 100 mM K-fosfatnom puferu, pH 7.2 sa 4 mM H₂O₂ i 4 mM Asc tokom 20 min. Gelovi su zatim isprani vodom i potopljeni u rastvor za bojenje koji je dobijen mešanjem 3.5 mM K₃Fe (CN)₆ rastvora u vodi sa 3.5 mM FeCl₃ x 6H₂O rastvora u vodi i 0.533 ml konc. HCl (11.72 M). Rastvori feri-hlorida i kalijum-fericijanida su pravljani sveži i čuvani u mraku, sve dok nisu pomešani neposredno pre upotrebe.

- detekcija CAT izoformi sa PAGE

Za vizuelizaciju izoformi CAT na gelu nakon native PAGE primenjena je modifikovana metoda *Weydert & Cullen* (2010). Nakon završetka elektroforeze (u trajanju od 4.5 sati pri naponu od 100 V) gel je ispran 3×5 min destilovanom vodom na šejkeru, a zatim je uronjen u 50 mM K- fosfatni pufer pH 7.0 sa 10 mM H₂O₂ (30 μl 33% H₂O₂ u 30 ml pufera) tokom 3-4 minuta uz mešanje, do intenzivne pojave mehurića kiseonika. Nakon toga gel je ispran 2×30 s vodom, voda je odlicena, a dodate su jednake zapremine sveže pripremljenih 4% (w/v) K₃Fe(CN)₆ i 4% FeCl₃ x 6 H₂O rastvora u vodi (finalno 2% rastvora obe soli) uz intenzivno mešanje. Gel se bojio zelenkasto-plavo, a bojenje je prekinuto po pojavi bezbojnih traka, na mestima na kojima nije bilo H₂O₂ usled CAT aktivnosti.

- detekcija POD izoformi sa PAGE i IEF

Nakon ispiranja, gelovi su inkubirani u 100 mM Na-fosfatnom puferu, pH 6.5 koji je sadržao 0.01% 4-hloro- α -naftola prethodno rastvorenog u metanolu i 0.05% H₂O₂ (*Kukavica et al.* 2012). Izoforme peroksidaza se uočavaju kao tamno plave trake nakon 5-15 min. Za detekciju specifičnih izoformi sa afinitetom za gvajakol, gelovi su bili inkubirani u rastvoru 20 mM gvajakola i 0.05% H₂O₂ u 100 mM Na-fosfatnom puferu, pH 6.5.

- detekcija SOD izoformi sa PAGE i IEF

SOD aktivnost na gelu je detektovana tehnikom negativnog bojenja (*Beuchamp & Fridovich* 1971). Nakon ispiranja, gelovi su inkubirani 30 min u mraku u rastvoru za bojenje (50 mM K-fosfatni pufer, pH 7.8 sa finalnim koncentracijama: 0.1 M EDTA, 2.45 mM *nitroblue tetrazolium* (NBT), 0.03 mM riboflavina i 28 mM TEMED-a. Nakon toga, gelovi su isprani destilovanom vodom i osvetljeni (ili na suncu ili na UV lampi) do pojave providnih traka koje odgovaraju SOD aktivnosti. Različite SOD izoforme (Cu/ZnSOD, MnSOD i FeSOD) su identifikovane nakon preinkubiranja gelova u toku 15 minuta nakon završene elektroforeze u rastvorima specifičnih inhibitora: (i) 5mM H₂O₂ u 50 mM K-fosfatnom puferu, pH 7.8, koji inhibira FeSOD i Cu/ZnSOD; (ii) 5 mM KCN u 50 mM K-fosfatnom puferu, pH 7.8 koji inhibira Cu/ZnSOD (*Kukavica & Veljović Jovanović* 2004).

3.6.11. Imunoblot (*Western blot*)

Nakon završene SDS-PAGE, razdvojeni proteini su elektro-transferovani vlažnim postupkom sa gela na polivinil-difluoridnu (PVDF) membranu (*Hybond-C, Amersham*) preko noći strujom jačine 2.7 mA cm^{-2} u Tris-Gly puferu, pH 8.30 sa 20% (v/v) metanolom na $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ pomoću *Mini Trans-Blot* transfer sistema (*Bio-Rad Laboratories, Kanada*) (Tucić *et al.* 2011). Nakon toga, da bi se utvrdila efikasnost transfera, membrane su bojene *Ponceau* crvenom, a zatim isprane vodom da bi se uklonila boja. U cilju blokiranja nespecifičnog vezivanja antitela za membrane, membrane su blokirane 0.5% odmašćenim mlekom u prahu (*GE Healthcare Bio-Sciences*) rastvorenim u PBS-u tokom 1 sata na sobnoj temperaturi uz konstantno mešanje. Nakon ispiranja destilovanom vodom, gelovi su inkubirani u primarnom antitelu rastvorenim u PBS-u sa 0.5% odmašćenog mleka u prahu 1.5 sat ili preko noći na $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Nakon inkubiranja i ispiranja ($4 \times 5 \text{ min}$) u 0.1% Tween 20 u PBS-u (TBS), membrane su inkubirane 90 minuta u rastvoru (1:50000) sekundarnog antitela u TBS-u. Po završetku inkubacija, membrane su ispirane u TBS-u ($4 \times 5 \text{ min}$) i zatim $2 \times 10 \text{ min}$ u PBS-u. Trake imunoobebeženih proteina su vizuelizovane pomoću sistema pojačane hemifluorescencije (ECF), koristeći skener *STORM Imager* i *ImageQuant* program za analizu slika (*Amersham Biosciences Limited, Velika Britanija*) (Tucić *et al.* 2011). Na isprane membrane dodavan je ECF supstrat, koji zatim biva defosforilovan alkalnom fosfatazom i nastaje proizvod koji snažno fluorescira na 540-560 nm kada se membrane osvetle UV svetlom (maksimum ekscitacije je na 430 nm). Drugi način detekcije imunoobebeženih proteinskih traka bio je metodom pojačane hemiluminiscencije. Membrane su bile inkubirane 5 minuta u izmešanim, prethodno napravljenim, rastvorima A i B jednakih zapremina (A: 100 mM TRIS-HCl pH 8.5 sa 0.37 mM *p*-CA i 2.5 mM luminol, i B: 100 mM TRIS-HCl pH 8.5 sa 5.5 mM H_2O_2). Nakon toga membrane su ubačene u plastičnu providnu foliju i u kasetu, a zatim je u mračnoj komori pod crvenim svetlom na njih postavljen Kodakov film i kasetu je zatvorena. Film iz kasete je inkubiran u rastvoru za razvijanje do pojave traka, isprana, a potom ubačen u fiksir i na kraju ispran vodom još jednom.

Sve izoforme APX detektovane su zečijim poliklonskim serumom (AS08 368 *Agrisera, Vännäs, Švedska*) konstruisanim na sintetički peptid od 12 aminokiselina iz sekvenci tAPX izoforme *A. thaliana* (At1g77490) i sAPX (At4g08390) kuplovan na BSA. Pet

od 12 aminokiselinskih ostataka ovog peptida se poklapaju sa sekvencama cAPX1 (At1g07890) i mAPX (At4g35000). Citosolna APX detektovana je pomoću zečijih poliklonskih IgG (AS06 180, *Agrisera*) razvijenih na konjugovani Lys-Leu-His peptid sa N-kraja cAPX kukuruza (*Zea mays*, Q41772). Primarno anti-APX antitelo je razblaženo u odnosu 1:2000, a anti-cAPX u odnosu 1:5000 u PBS-u sa 0.5% odmašćenog mleka u prahu. Izoforme Cu/ZnSOD su obeležavane zečijim poliklonskim antitelom (AS06 170, *Agrisera*) konstruisanim za Cu/ZnSOD (O78310, izolovana iz *A. thaliana*). Primarno antitelo na MnSOD je poliklonsko zečije antitelo (AS09 524, *Agrisera*) dobijeno na peptid sintetisan na osnovu sekvence MnSOD monokotila i dikotila. FeSOD izoforme su detektovane zečijim poliklonskim serumom (AS06 125, *Agrisera*) dobijenim na osnovu FeSOD iz *Chlamydomonas reinhardtii*. Razblaženje primarnog anti-Cu/ZnSOD je bilo 1:1000, MnSOD 1:2000, a anti-FeSOD 1:5000. Primarno antitelo na CAT je poliklonsko zečije, napravljeno na katalazu iz goveđe jetre (*Abcam*, Ab 1877) i razblaženo je u odnosu 1:1000. Primarno antitelo na GalLDH (AS06 182, *Agrisera*) predstavlja poliklonske zečije IgG stvorene imunizovanjem sa sintetičkim peptidom koji predstavlja visoko-konzervirani C-terminus GalLDH iz kukuruza (razblaženje 1:5000).

3.6.12. Ekspersija gena u listovima biljaka *P. zonale*

3.6.12.1. Izolovanje ukupne RNK

Ekspresija gena praćena je u zelenom i belom tkivu listova koji su odstranjeni sa biljaka *P. zonale* i odmah zatim zamrznuti u tečnom azotu. Ukupna RNK je izolovana prema metodama opisanim u *Tiwari et al.* (2012) i *Rubio-Piña & Zapata-Pérez* (2011). Problem u ekstrakciji RNK iz listova *P. zonale* predstavljala je visoka koncentracija fenolnih jedinjenja. Približno 120 mg tkiva je homogenizovano u avanu pomoću tečnog azota u prisustvu 20% nerastvornog PVP-a (w/w). Ekstrakcija je rađena u 700 µl 0.12 M Tris-HCl pufera, pH 8.0 koji je sadržavao 22.5 mM EDTA, 1.5 M NaCl, 2% PVP (w/v) i 2.4% cetil-trimetilamonijumbromid (CTAB, w/v) u sterilnim, *Eppendorf* epruvecama od 2.0 ml, očišćenim od ribonukleaza. Detergent CTAB inhibira aktivnost ribonukleaza i da bi se rastvorio, pre nego što je poslužio za ekstrakciju, rastvor pufera je bio zagrevan na 65 °C uz dodatak 77 µl 10% β-merkaptetoetanol (v/v), vorteksovan i mešan sa CTAB 45 min, a zatim ohlađen na ledu. Nakon

toga, da bi se RNK odvojila od proteina, 500 μ l hloroforma je dodato, vorteksovano 30 s, a zatim centrifugirano na 16 000 g 10 min na 4 °C. Gornji, vodeni sloj je prebačen u novu epruveticu, dodato je 800 μ l smeše fenol:hloroform, 1:1, vorteksovano 30 s, pa zatim centrifugirano na isti način kao i u prethodnom koraku. Supernatant je prebačen u novu epruveticu i 800 μ l smeše hloroform: izoamil-alkohol, 24:1 je dodato, a zatim vorteksovano 30 s, pa zatim opet centrifugirano na isti način. Završni supernatant je prebačen u novu epruveticu uz dodatak 300 μ l 8 M LiCl i zatim je odložen na -20 °C preko noći.

Sutradan su uzorci centrifugirani na 16 000 g 20 minuta na 4 °C, a talog je prvo pažljivo opran sa 100%, a zatim sa 70% etanolom (inkubiranjem od 5 minuta, bez centrifugiranja). Nakon kratkog sušenja (20-30 minuta) na sobnoj temperaturi, talozi su resuspendovani u 250 μ l vodi očišćenoj od ribonukleaza. Dobijeni rastvor RNK je prečišćen još jednom sa 800 μ l smeše fenol:hloroform, 1:1, vorteksovano je 30 s, pa zatim centrifugirano. Iz odvojenog gornjeg sloja (250 μ l) RNK je taložena dodavanjem 25 μ l Na-acetata i 500 μ l 100% etanola i smeša je zatim inkubirana 2 sata na -20 °C. Na kraju je usledilo još jedno centrifugiranje (16 000 g 15 min na 4 °C), ispiranje taloga sa 70% etanolom, sušenje na vazduhu. Talog izolovane RNK je resuspendovan u 50 μ l vode oslobođene ribonukleaza (*Rubio-Piña & Zapata-Pérez 2011*).

Koncentracija i čistoća izolovane RNK je određivana spektrofotometrijski, *NanoDrop-om Lite (Thermo Scientific)*. Kontaminacija organskim rastvaračima, solima i(ili) ugljenim hidratima je određivana preko odnosa A^{260} i A^{230} , a kontaminacija proteinima i(ili) fenolima preko odnosa A^{260} i A^{280} . Izolovana RNK se smatra čistom ako su: $2 > A^{260}/A^{230} > 2.4$ i $1.7 > A^{260}/A^{280} > 2.0$. Integritet RNK je proveravan elektroforetskim razdvajanjem na 1% agaroznom gelu konstantnom voltažom (50 V). Detekcija je rađena bojenjem sa etidijum-bromidom (0.8 μ g ml⁻¹) na UV svetlu (*Rubio-Piña & Zapata-Pérez 2011*).

3.6.12.2. Sinteza komplementarne DNK

Prvi lanac komplementarne DNK (cDNK) sintetisan je reverznom transkripcijom 1 μ g ukupne RNK pomoću *RevertAid First strand cDNA Synthesis Kit-a (Fermentas UAB, Litvanija)*.

3.6.12.3. Kvantitativna polimerazna lančana reakcija (qPCR)

Za analiziranje sekvenci gena i dizajn prajmera upotrebljeni su ili literaturni podaci (tabela 3.3) i su programi *Primer 3* i *Blast* iz *National Center for Biotechnology Information* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Ekspresija gena je praćena pomoću Real Time-PCR sistema RT-PCR 7500; *Applied Biosystems*, Velika Britanija) uz upotrebu *SYBR Green Master Mix* kita (*Takara*, Japan). Amplifikacija gena je rađena u mikrotitar pločici sa 96 bunarčića u reakcionoj zapremini od 25 µl koja je sadržala: 12.5 µl 2×*SYBR Green Master Mix* (*Takara*, Japan), po 2.5 µl od svakog prajmera (10 mM), 1 µL templata i 9 µL vode oslobođene RNA-za. Termalni profil za Real-Time-PCR je bio: inicijalna denaturacija na 2 min 95 °C, 10 min na 95 °C, zatim 40 ciklusa×15 s na 95 °C i finalno 1 min na 60 °C. Dodat je disocijacioni korak. U mikrotitar pločici svaki uzorak je rađen u duplikatu. Za negativnu kontrolu dodata je voda oslobođena od RNA-za umesto templata. Relativna ekspresija je računata kao $2^{-\Delta\Delta C_t}$; C_t : *cycle threshold*.

Tabela 3.3. Sekvence i nazivi gena koji su upotrebljavani za ispitivanje ekspresije u zelenom i belom tkivu listova biljaka *P. zonale*. T_m , temperatura topljenja dvostrukog lanca sekvence prajmera.

Naziv gena	Sekvence prajmera za umnožavane gene	T_m , °C	Referenca
<i>Cu/Zn SOD</i>	5'-GATTACAGCCAATTTCAATAC-3' 5'-CTCTTACAACAAGGGGTTTC-3'		<i>Qu et al.</i> 2010
<i>cAPX</i>	5'-GAGCAGTTTCCTATCCTC-3' 5'-CGTCTAATAACAGACGCC-3'	54 54	<i>Primer 3</i>
<i>sAPX</i>	5'-GACAAGTATGCTAATGTG-3' 5'-CTCCTTCATTAGGCTACC-3'	49 54	<i>Primer 3</i>
<i>GalLDH</i>	5'-CGAGTCAGTGGAGGAGCTTG-3' 5'-AATTCACCATCCCAGCTCG-3'	63 57	<i>Badejo et al.</i> 2012

3.7. **Detekcija akumuliranog vodonik-peroksida u listovima biljaka *P. zonale* i *P. coleoides***

Vodonik-peroksid akumuliran u listovima biljaka *P. zonale* i *P. coleoides* je detektovan pomoću „DAB usvajajuće” metode opisanoj od strane *Thordal-Christensen-a et al.* (1997). Po tri cela, potpuno razvijena i osvetljena lista sa svake biljke su odsećena i potopljena u rastvor 3,3'-diaminobenzidina (DAB) (1 mg ml⁻¹), koji je pripremljen

rastvaranjem najpre u 2 M HCl, a zatim u 100 mM Na-acetatnom puferu, pH 3.8. Listovi su kratak period (15 s) infiltrirani pod slabim vakuumom, a zatim su inkubirani 5 h u mraku, nakon čega su isprani i kuvani u ključajućem etanolu sa par kapi glicerola do potpunog udaljavanja *hl*. Lišće biljaka *P. coleoides* je bilo potrebno duže kuvati – zbog veće debljine i drugačije strukture.

3.8. Statistička obrada podataka

U statističkoj analizi rezultata dobijenih u svim eksperimentima, termin „efekat” je korišćen da označi pojedinačne uticaje bilo UV-B zračenja, bilo različitog intenziteta PAR, bilo tretmana sa Pq, vremena trajanja (dani) ili različitog tipa tkiva, dok se termin, npr. „UV-B×PAR” ili „interakcija” UV-B zračenja i PAR-a, odnosi na uzajamno delovanje i zavisnost uticaja ova dva faktora (da li uticaj UV-B zračenja zavisi od intenziteta primenjenog PAR-a).

3.8.1. Statistička analiza odgovora komponenti Asc-GSH ciklusa listova P. zonale na izlaganje jakom sunčevom zračenju i tretman parakvatom

Značaj efekta tipa tkiva (hlorofilno ili nehlorofilno) na aktivnost enzima, totalni sadržaj Asc i GSH i na njihove koncentracije u različitim ćelijskim odeljcima je testiran Man-Vitnijevim (*Mann–Whitney*) U testom.

Značaj interakcija efekata tipa tkiva i sunčevog zračenja, kao i interakcija efekata tipa tkiva i Pq tretmana na sve antioksidativne parametre je za svaki od njih testiran pomoću analize varijanse (*ANOVA*) sa dva faktora (*‘two-way ANOVA’*) bez ponavljanja. „*Post hoc*” Takijev (*Tukey’s post hoc*) test ($P < 0.05$) je upotrebljivan da bi se odredila značajna razlika između različitih grupa (belo, zeleno tkivo u različitom vremenu izlaganja sunčevoj svetlosti i dejstvu Pq). Statistička značajnost u Man-Vitnijevom U testu i u Takijevom test je obrađivana u statističkom programu *IBM SPSS statistics* (Verzija 20.0, *SPSS Inc.*, Čikago, SAD). Prag značajnosti je bio podešen na 0.05.

3.8.2. Statistička analiza odgovora metabolizma panaširanih biljaka na visok intenzitet PAR-a i ambijentalne doze UV-B zračenja

Kako su fotosintetski parametri u biljkama *P. zonale* i *P. coleoides*, izloženim različitim PAR i UV-B režimima zračenja, određivani prvog, četvrtog i posljednjeg dana izlaganja, procedura sa ponavljanim merenjima dvo-faktorske analize varijanse sa ponavljanim merenjima (*ANOVA*; *REPEATED/ PROFILE* opcija u *SAS GLM* proceduri; *Statistical Analysis Systems Institute, 2003*) je upotrebljena da bi se testirale razlike (*Valkama et al. 2003*). Dani izlaganja su označeni kao ponavljajući efekat (unutar subjektivnih faktora), a „PAR” i „UV-B” kao faktori između subjekata (*Valkama et al. 2003*). Ovom analizom su testirane tri hipoteze: ‘paralelnosti’ (sličnost u obliku krivulja odgovora), ‘nivoi’ (značajnost UV-B i PAR uticaja) i ‘monotonost-flatness’ (značajnost promene parametra tokom vremena). Da bi se identifikovali specifični vremenski intervali u kojima je efekat tretmana bio značajan, odrađene su pojedinačne *ANOVA*-e na svakom od kontrasta između subjektivnih faktora (trajanje izlaganja različitim PAR i UV-B tretmanima).

Za određivanje efekata UV-B zračenja, intenziteta PAR i njihovih interakcija na sadržaje i odnose fotosintetskih pigmenta u zelenim segmentima listova biljaka *P. zonale* i *P. coleoides* dvo-faktorska *ANOVA* je upotrebljena. Značaj efekta tipa tkiva (hlorofilno ili nehlorofilno), UV-B zračenja i intenziteta PAR, kao i njihovih međusobnih interakcija na sadržaje fenola, Asc i na aktivnosti enzima (APX, CAT, POD) pojedinačno je testiran tro-faktorskom mešanom *ANOVA*-om bez ponavljanja (*‘three-way nested ANOVA without replication’*). Pošto su zeleni delovi listova sa jedne, iste biljke spajani zajedno i analizirani (isto je urađeno i sa belim delovima), oni nisu nezavisni faktori. Zato je bilo neophodno „ugnezditi“ efekte tipa tkiva, UV-B zračenja, intenziteta PAR i njihove međusobne interakcije u pojedinačnu biljku. Tako dobijeni srednji kvadrati (MS) su uzimani za računanje MS greške tokom određivanja *F* vrednosti, i to tako što su MS srednje vrednosti interakcija efekata podeljene sa MS greškom (*SAS GLM procedure*).

U situacijama kada je posmatran samo UV-B uticaj na fotosintezu, sadržaj pigmenta i hloroplastnu ultrastrukturu kod biljaka izlaganih HL i HL+UV-B tretmanima Man-Vitnijejev U test je primenjivan. Takijev *post hoc* test je primenjivan za testiranje postojanja značajnih razlika u sadržaju fenola i antioksidanata između različitih tretmanskih grupa. Prag značajnosti je bio podešen na 0.05.

4. REZULTATI

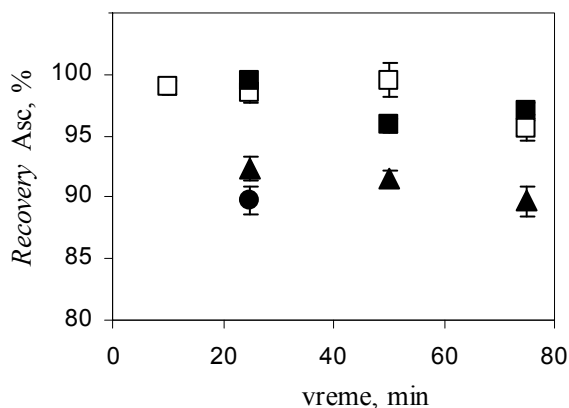
4.1. Razvoj metoda za određivanje sadržaja askorbata i fenolnih jedinjenja u biljnom materijalu

4.1.1. Metod za određivanje redoks-stanja Asc

Redoks-stanje askorbata i njegova koncentracija predstavljaju važan parametar redoks-homeostaze u ćelijama i fiziološkog stanja biljaka. Značaj Asc za biljni metabolizam, rast i razvoj je opisan u poglavlju 2.4.2.1. Jedan od preduslova za interpretaciju eksperimentalnog dela ove teze bilo je i uspostavljanje pouzdane HPLC metode koja bi omogućila istovremenu analizu Asc i DHA. Međutim, zbog razlike u koncentraciji (u optimalnim uslovima odnos: Asc/(Asc+DHA) je veći od 0.95, pododeljak 2.4.2.1) i različitih uslova u kojima su Asc i DHA stabilni razvijeni metod je podrazumevao da se Asc i DHA analiziraju zasebnim metodama, opisanim u poglavlju 3.6.3. Hromatografska metoda je razvijena pomoću standarda Asc i DHA. Kvantifikacija je zasnovana na standardnim pravama za redukovani Asc (pet koncentracija: 0.4, 0.97, 1.95, 2.91 i 4.0 nmol, jednačina prave: $y = 0.770x - 0.021$; $R^2 = 0.9996$) i za DHA (pet koncentracija u opsegu: 0.05-2.50 nmol, jednačina prave: $y = 7.930x + 0.804$; $R^2 = 0.9997$), koje su konstruisane pred puštanje svake serije uzoraka. Optimizacija pripreme uzoraka listova odabranih biljnih vrsta za analizu redoks-stanja Asc je opisana u narednim poglavljima.

4.1.1.1. Optimizacija uslova ekstrakcije Asc

Nestabilnost Asc u prisustvu jona metala je potvrđena inkubiranjem 1 mM rastvora Asc u dejonizovanoj vodi (sveže pripremljen iz osnovnog rastvora, koncentracije 100 mM) sa 10 μM rastvorima Fe^{2+} , Cu^{2+} i Zn^{2+} na ledu tokom vremena, slika 4.1. Dobijeni rezultati su pokazali da se statistički značajno smanjenje količine Asc u vodi bez prisustva metalnih jona, dešava tek posle 75 minuta, dok je u prisustvu 10 μM Fe^{2+} koncentracija Asc smanjena za oko 10% već nakon 25 minuta. Prisustvo cinka nije imalo veći uticaj na oksidovanje Asc, dok je u prisustvu 10 μM Cu^{2+} sadržaj Asc bio umanjen za oko 7% nakon 25 minuta, nakon čega se nije statistički značajno menjao, slika 4.1.

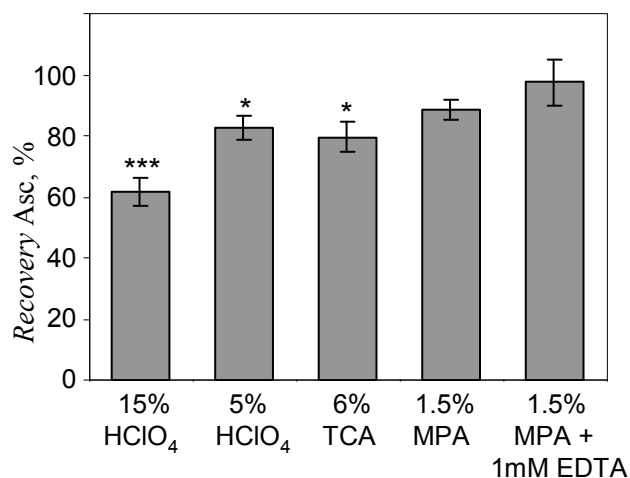


Slika 4.1. Stabilnost 1 mM rastvora Asc (\square) tokom inkubacije sa različitim jonima metala: 10 μM Zn^{2+} , \blacksquare ; 10 μM Cu^{2+} , \blacktriangle ; 10 μM Fe^{2+} , \bullet .

U cilju optimizacije medijuma za ekstrakciju Asc iz biljnog materijala, zamrznuti listovi *P. zonale* (zeleni segmenti) su bili sprášeni u fini prah u avanu sa tečnim azotom, a zatim je dobijeni prah izdijeljen na deset delova mase 0.2 g. U pet delova je dodato po 2 μmol rastvora Asc (20 μl alikvota sveže napravljenog 100 mM Asc u dejonizovanoj vodi), a zatim je u jedan deo bez, i jedan sa dodatim Asc, dodavan po 1 ml rastvora sledećih kiselina: 15% HClO_4 , 5% HClO_4 , 6% TCA, 1.5% MPA i 1.5% MPA sa 1mM EDTA, redom (najčešće upotrebljavane kiseline za ekstrakciju Asc). Nakon homogenizacije i ekstrakcije na ledu tokom 5 min, uzorci su centrifugirani 8 minuta na 4 $^{\circ}\text{C}$ na 16 000 g i supernatanti su analizirani opisanom HPLC metodom za red Asc. Ekstrakcije su ponovljene u triplikatu.

Reekstrakcijom dobijenog taloga nakon centrifugiranja nije nađena značajna količina Asc (< 2%). Po istom principu, *recovery* Asc tokom ekstrakcije je proveravan i sa listovima mladih biljaka graška (starih desest dana, gajeni hidroponično).

Najmanji gubitak Asc, odnosno najveća *recovery* vrednost za Asc, dobijena je ekstrakcijom sa 1.5% MPA sa dodatkom 1 mM EDTA, slika 4.2. Štaviše, MPA se pokazala kompatibilnom sa analitičkom hromatografskom metodom, a kako ne podstiče autooksidaciju Asc i precipitira proteine u uzorku, dodatno se pokazala dobrim izborom za ekstrakciju.



Slika 4.2. *Recovery* vrednosti dobijene pri ekstrakciji Asc iz biljnog materijalarazličitim kiselinama. Razlika u količini Asc određenoj iz spraćenog zelenog tkiva listova *P. zonale* kome je dodat 1 mM Asc i količine Asc određene u tkivu kome nije dodavan Asc prikazana je kao procenat od 1 mM Asc-standarda. Prikazane su srednje vrednosti \pm SE, $n=3$, i značajne razlike između 1 mM standarda Asc i razlike izmerenih količina u uzorcima prema Mann-Vitnijevom (*Mann-Whitney*) U testu (* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$).

Sličan rezultat je dobijen i pri ekstrakciji Asc iz mladih zelenih listova graška, gde su *recovery* vrednosti Asc dobijene pri ekstrakciji sa 5% HClO₄, 1.5% MPA i 1.5% MPA sa 1 mM EDTA iznosili: 67%, 71% i 99%, redom.

4.1.1.2. Optimizacija uslova redukcije DHA i oksidacije Asc

Redoks-stanje askorbata se može odrediti na tri načina, tabela 4.1. Najlakši način bio bi direktno određivanje prisutnog redukovanog Asc i prisutnog DHA (metod br. 1 i 2 u tabeli 4.1). Međutim, zbog male količine DHA u uzorku, DHA se može redukovati do Asc (najčešće nekim tiolnim reagensom, poput DTT, 2-merkaptoetanola ili GSH), pa se određuje sadržaj ukupnog Asc (metod br. 1, 5 i 6 u tabeli 4.1), a DHA se računa kao razlika ukupnog i redukovanog Asc. Treći način podrazumeva da se Asc iz uzorka oksidacijom (najspeficičnije i kvantitativno je pomoću AO) prevede u DHA, pa se ukupni askorbat određuje u obliku DHA (metod br. 2, 3 i 4 u tabeli 4.1), a redukovani Asc se dobija kao razlika ukupnog i oksidovanog askorbata. Poslednji način je bio pogodan u našem eksperimentalnom radu, pošto se detekcija i kvantifikacija DHA uspostavljenom HPLC metodom bazira na fluorescenciji *o*-PDA-DHA derivata. Ovaj način detekcije je i do 10^3 puta osetljiviji od detekcije koja je zasnovana na apsorbciji Asc u UV oblasti. Takođe, usled selektivnosti reakcije *o*-PDA sa diketo-grupom očekivan je manji broj pikova, pa je lakše izbeći koeluciju sa nekim drugim analitom u uzorku.

Sprašeno i homogenizovano zeleno tkivo listova muškatile je izdeljeno na tri dela jednakih masa, u jedan je dodato 10 μ l 55 mM Asc (0.55 μ mol), u drugi 10 μ l 55 mM DHA (0.55 μ mol) i u treći 10 μ l dejonizovane vode. Uzorci su zatim ekstrahovani u 1.5% MPA koja je sadržala 1 mM EDTA, kako je utvrđeno u prethodnom poglavlju. Celokupan postupak je bio ponovljen četiri puta. U dobijenim uzoracima, količine Asc i DHA su određivane na različite načine, tabela 4.1. Rezultati su pokazali da nema statistički značajne razlike između količine ukupnog askorbata dobijene redukcijom pomoću 25 mM GSH (metod 5), što nije bio slučaj za DTT i količine ukupnog askorbata dobijenog oksidacijom DHA pomoću AO. Takođe, nije bilo razlike ni između teorijski izračunate količine redukovanog Asc (kroz razliku ukupnog askorbata i DHA) i direktno određene količine Asc.

Tabela 4.1. Količina Asc/DHA (μmol) u uzorcima listova muškatile (M) tokom optimizacije uslova za određivanje redoks-stanja askorbata. Prikazane su srednje vrednosti \pm SE, $n = 4$. U jednake mase homogenizovnog praha listova dodato je $0.55 \mu\text{mol}$ Asc (M + Asc) i $0.55 \mu\text{mol}$ DHA (M + DHA).

Metod merenja*	Mereni oblik askorbata	M	M + Asc	M + DHA
1.	Asc	0.29 ± 0.02	0.89 ± 0.02	0.21 ± 0.01
2.	DHA	0.006 ± 0.001	0.009 ± 0.002	0.518 ± 0.027
3.	ukupni (DHA)	0.31 ± 0.03	0.92 ± 0.01	0.76 ± 0.02
4.	Asc	0.30 ± 0.03	0.91 ± 0.01	0.24 ± 0.01
5.	ukupni (Asc)	0.31 ± 0.02	0.96 ± 0.08	0.23 ± 0.01
6.	ukupni (Asc)	0.15 ± 0.01	0.54 ± 0.08	0.37 ± 0.03

* Metode: (1) sadržaj Asc u uzorcima određen direktno HPLC-metodom za redukovani Asc; (2) DHA u uzorcima određen direktno HPLC-metodom za DHA; (3) ukupni Asc (Asc + DHA) određen u obliku DHA, nakon oksidacije pomoću komercijalne AO; (4) izračunata količina Asc kao razlika rezultata dobijenih u (3) i (2); (5) ukupni Asc određen nakon redukcije pomoću 25 mM GSH; i (6) 25 mM DTT, tokom 5 minuta na ledu.

U ekstraktu sa dodatim DHA uočava se da inkubacija u trajanju od 5 minuta sa 25 mM GSH i sa 25 mM DTT (i u ekstraktu sa dodatim Asc) nije bila dovoljna za totalnu redukciju Asc. U istom ekstraktu je nađena i niža količina ukupnog askorbata dobijenog oksidacijom pomoću AO, kao i niža količina redukovano Asc, te je pretpostavljeno da se deo DHA u uslovima derivatizacije nepovratno degradira (hidrolizom laktoskog prstena, pododeljak 2.4.2.1). Na osnovu svega prikazanog, odlučeno je da se redukovani Asc direktno određuje uspostavljenom hromatografskom metodom, i da se ekstrakt derivatizuje sa i bez inkubiranja sa AO, pri čemu se određuje količina ukupnog Asc u obliku DHA i količina DHA. Na taj način se produžava vreme potrebno za analizu, ali su rezultati određivanja pouzdaniji. U odnosu na redukciju Asc tiolnim reagensima, prednost je data oksidaciji DHA pomoću AO zbog brzine i selektivnosti enzimske konverzije.

Na ovaj način izračunat sadržaj Asc u zelenim listovima muškatile iznosi $3.43 \pm 0.21 \mu\text{g}$ po g svežeg tkiva, a redoks-koeficijent: $\text{Asc}/(\text{Asc}+\text{DHA}) \times 100 = 98.1 \pm 0.1\%$.

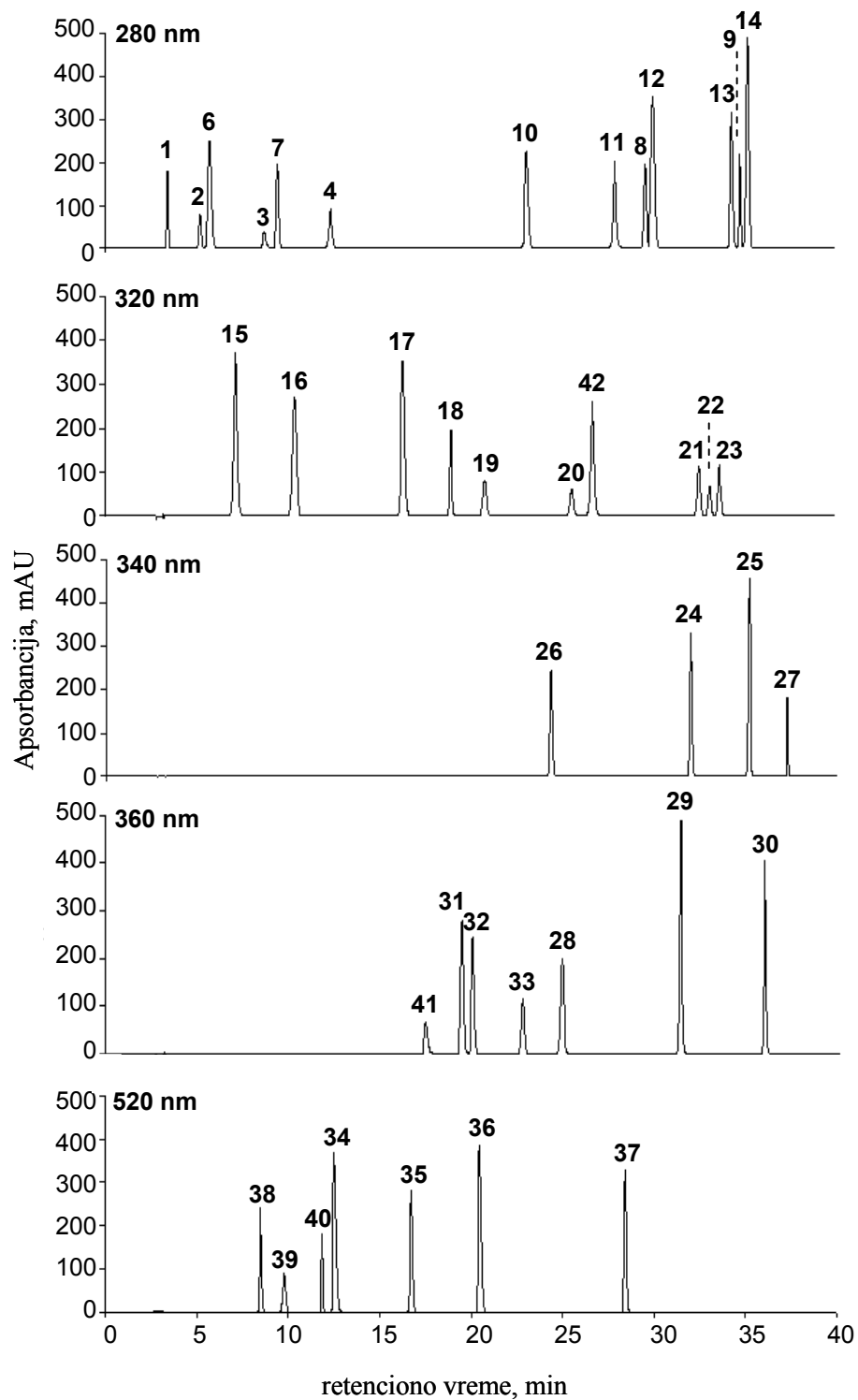
4.1.2. Metod za određivanje sadržaja fenolnih jedinjenja

4.1.2.1. Analiza fenolnih jedinjenja

Sa ciljem da se razvije HPLC metod za određivanje fenolnih jedinjenja i da bude upotrebljen u analizi datih biljnih vrsta, urađeno je nekoliko probnih razdvajanja sa standardnim fenolnim supstancama i biljnim ekstraktima. Nakon optimizovanja i podešavanja sastava mobilne faze i elucionog gradijenta, uspostavljen je HPLC metod, kojim su razdvojeni su standardi 42 fenolna jedinjenja koja pripadaju prirodno najzastupljenijim podklasama: (hidroksi)benzoeve kiseline (HBA), hidroksicinamične kiseline (HCA) i njihovi metil-estri, flavanoli, izoflavoni, flavanoni (katehini), flavoni, flavon-3-oli, antocijanidini i njihovi glikozidi, slika 4.2. Karakteristike spektara, retenciona vremena (R_t), jednačine standardnih pravih i limiti detekcije (LD) i kvantifikacije (LK) razdvajanih jedinjenja prikazani su u tabeli 4.2. Prosti fenoli, odnosno HBA su razdvajane od 3-25 min, katehini od 6-10 min, HCA od 8-25 min, glikozidi flavonoida od 8-30 min, aglikoni flavonoida (bez antocijanidina) od 25-36 min, a antocijanidini od 13-29 min.

Kalibracione prave su konstruisane za svaki standard (urađeno u tri-šest replika) kao funkcija zavisnosti količine (nmol) od površine pika na talasnoj dužini specifičnoj za datu grupu jedinjenja, tabela 4.2.

Uspostavljena metoda za određivanje fenolnih jedinjenja je testirana na uzorcima četiri biljne vrste, od kojih su dve eksperimentalni modeli u ovoj disertaciji, panaširane *P. zonale* i *P. coleoides* i dve drvenaste vrste, veoma zastupljene u gradskim sredinama: lipa (*Tilia platyphyllos* Scop.) i kiselo drvo (*Ailanthus altissima* (Mill.) Swingle). Poslednje dve vrste su odabrane kao modeli u praćenju tolerancije drveća na faktore gradskog zagađenja: lipa kao osetljivija vrsta (Kropczynska et al. 2002) i kiselo drvo kao otporna, invazivna vrsta (Kowarik & Säumel 2007).



Slika 4.3. Hromatogrami smeša fenolnih standarda dobijeni fotodiodnom UV/VIS detekcijom na 280 nm, 320 nm, 340 nm i 520 nm. Brojevi pikova se odnose na jedinjenja predstavljena u Tabeli 4.3.

Tabela 4.2. Lista standardnih fenolnih jedinjenja koja su upotrebljena za konstruisanje standardnih pravih.

Fenolno jedinjenje	br.	^a λ, nm	^b Rt, min	^c svojstva spektra, nm	^d nagib ×10 ⁻⁴	^e LD, pmol	^f LK, pmol
<i>HBA</i>							
galna kiselina (GA)	1	280	3.39	218, 271	0.413	12	39
protokatehuinska kis. (PrcA)	2	280	5.17	239, 259, 294	0.331	15	49
<i>p</i> -hidroksibenzoeva kis. (<i>p</i> -HBA)	3	280	8.70	239, 255	0.151	32	107
siringinska kiselina (SyA)	4	280	12.33	225, 274	0.513	9	32
benzoeva kiselina (BA)	5	280	24.61	242, 273	0.061	80	265
<i>flavanoli</i>							
(+) katehin (Cat)	6	280	5.71	241, 278	0.182	27	89
(-) epikatehin (ECat)	7	280	9.43	240, 278	0.175	28	92
<i>izoflavoni</i>							
daidzein	8	280	29.57	262, 302	0.368	13	44
genistein	9	280	34.78	236, 260, 330*	0.257	19	63
<i>flavanoni</i>							
naringenin-7- <i>O</i> -Rut	10	280	23.06	282, 328*	0.869	6	19
eriodiktoil	11	280	27.90	288, 330*	0.859	6	19
hesperitin-7- <i>O</i> -Rut	12	280	30.00	268, 310*	1.182	4	13
naringenin	13	280	34.31	289, 331*	0.806	6	20
hesperetin	14	280	35.18	287, 335*	1.080	4	15
<i>HCA i derivati</i>							
hlorogena kiselina (CGA)	15	320	7.16	231, 295*, 327	1.376	6	19
kafeinska kiselina (CA)	16	320	10.39	296*, 323	0.715	11	37
<i>p</i> -kumarna kiselina (<i>p</i> -CA)	17	320	16.34	240, 298*, 309	0.841	10	32
ferulinska kiselina (FA)	18	320	18.97	293*, 323	1.111	7	24
<i>m</i> -kumarna kiselina (<i>m</i> -CA)	19	320	20.51	278, 324*	0.225	36	119
<i>flavoni</i>							
luteolin	24	340	32.01	251, 264*, 347	2.304	3	10
apigenin	25	340	35.25	241, 267*, 337	1.043	7	23
apigenin-7- <i>O</i> -Glc	26	340	24.36	240, 267*, 337	0.347	21	69
diosmetin	27	340	37.32	251, 267, 345	0.732	10	33
<i>flavon-3-oli</i>							
miricetin (M)	28	360	24.85	265, 324*, 370	0.931	7	23
kvercetin (Q)	29	360	31.36	265, 322*, 373	1.159	5	18
kampferol (K)	30	360	35.88	265, 322*, 366	0.941	7	23
rutin (Q-3- <i>O</i> -Rut)	31	360	19.43	255, 267*, 297*, 354	1.207	5	18
Q-3- <i>O</i> -Glc	32	360	20.01	265, 298*, 354	1.179	5	18
robinin, K-3- <i>O</i> -Gal-Rha-7- <i>O</i> -Rha	33	360	22.72	266, 310*, 347	0.795	8	27
<i>antocijani</i>							
delphinidin (Dp)	34	520	12.71	272, 430*, 531	1.815	5	15

(*nastavak tabele sa prethodne strane*)

Fenolno jedinjenje	br.	^a λ, nm	^b Rt, min	^c svojstva spektra, nm	^d nagib ×10 ⁻⁴	^e LD, pmol	^f LK, pmol
cyanidin (Cy)	35	520	16.73	274, 430*, 525	2.121	4	13
pelargonidin (Pg)	36	520	20.87	267, 327*, 422, 514	1.147	7	24
peonidin (Pe)	37	520	28.45	274, 441*, 527	2.082	4	13
Cy-3- <i>O</i> -Glc	38	520	8.48	280, 327*, 517	3.196	3	9
Cy-3- <i>O</i> -Rut	39	520	9.98	280, 329, 438*, 519	1.206	7	23
Pg-3- <i>O</i> -Glc	40	520	11.69	275, 330*, 422*, 504	1.632	5	17
<i>ostali polifenoli</i>							
elaginska kiselina	41	360	17.45	239, 253, 368	0.220	29	227
resveratrol	42	320	26.72	241, 306*, 321	1.140	7	103

^a Talasna dužina (λ) na kojoj je snimano i analizirano dato jedinjenje; ^b retenciono vreme; ^c svojstva spektra, pikovi i *, „rame”; ^d kalibraciona prava: $y = ax$, gde je a nagib, y je površina pika, a x je količina u nmol; ^e limit detekcije (LD) za dati analit, račun je zasnovan na signal/šum odnosu 3 i izražen je u pmol; ^f limit kvantifikacije (LK) za dati analit, račun je zasnovan na signal/šum odnosu 10 i izražen je u pmol; br. brojevi kojima su obeležavani pikovi na hromatogramima prikazanim na slici 1. Rut, rutinoza; Rha, ramnoza; Glc, glukoza.

4.1.2.2. Optimizacija uslova ekstrakcije fenolnih jedinjenja

Najbolji rezultati su postignuti nakon brze ekstrakcije fenolnih jedinjenja u metanolu koji sadrži 0.1% HCl. Nakon toga, u ekstrakt je dodavan hloroform kako bi se uzorak oslobodio potencijalno interferirajućih lipofilnih jedinjenja, poput hlorofila i masnih kiselina.

Reproducibilnost ekstrakcione procedure na osnovu standardne devijacije tri replike) je bila 5-10%, što je smatrano zadovoljavajućim. Dodatkom hloroforma postignuta je bolja rezolucija i bolja bazna linija i povećana je selektivnost u odnosu na metanolne ekstrakte u koje hloroform nije dodavan. Mana dodavanja hloroforma je smanjenje prinosa kampferola za 10-30% (koje zavisni od količine prisutne u datoj biljnoj vrsti), tabela 4.3. Iz tog razloga, za analizu fenolnih jedinjenja sa retencionim vremenom većim od 35 min, izbegnuta je upotreba hloroforma. Kao što je bilo očekivano, dodatak hloroforma nije uticao na sadržaj ekstrahovanih glikozida flavonoida: *recovery* vrednost za ekstrakciju cijanidin-3-*O*-glikozida je iznosila (100.6 ± 2.3)%, a za kvercetin-3-*O*-rutinozida (104.9 ± 5.1)%.

Tabela 4.3. *Recovery* vrednosti (%) dobijene pri optimizaciji uslova za ekstrakciju i hidrolizu fenolnih jedinjenja, metodom standardnog dodatka. Fenolna jedinjenja su dodavana u sprašena tkiva listova različitih biljnih vrsta tokom ekstrakcije i hidrolize. Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti (\pm SD; n = 3). Skraćenice za fenole (standarde) date su u tabeli 4.2.

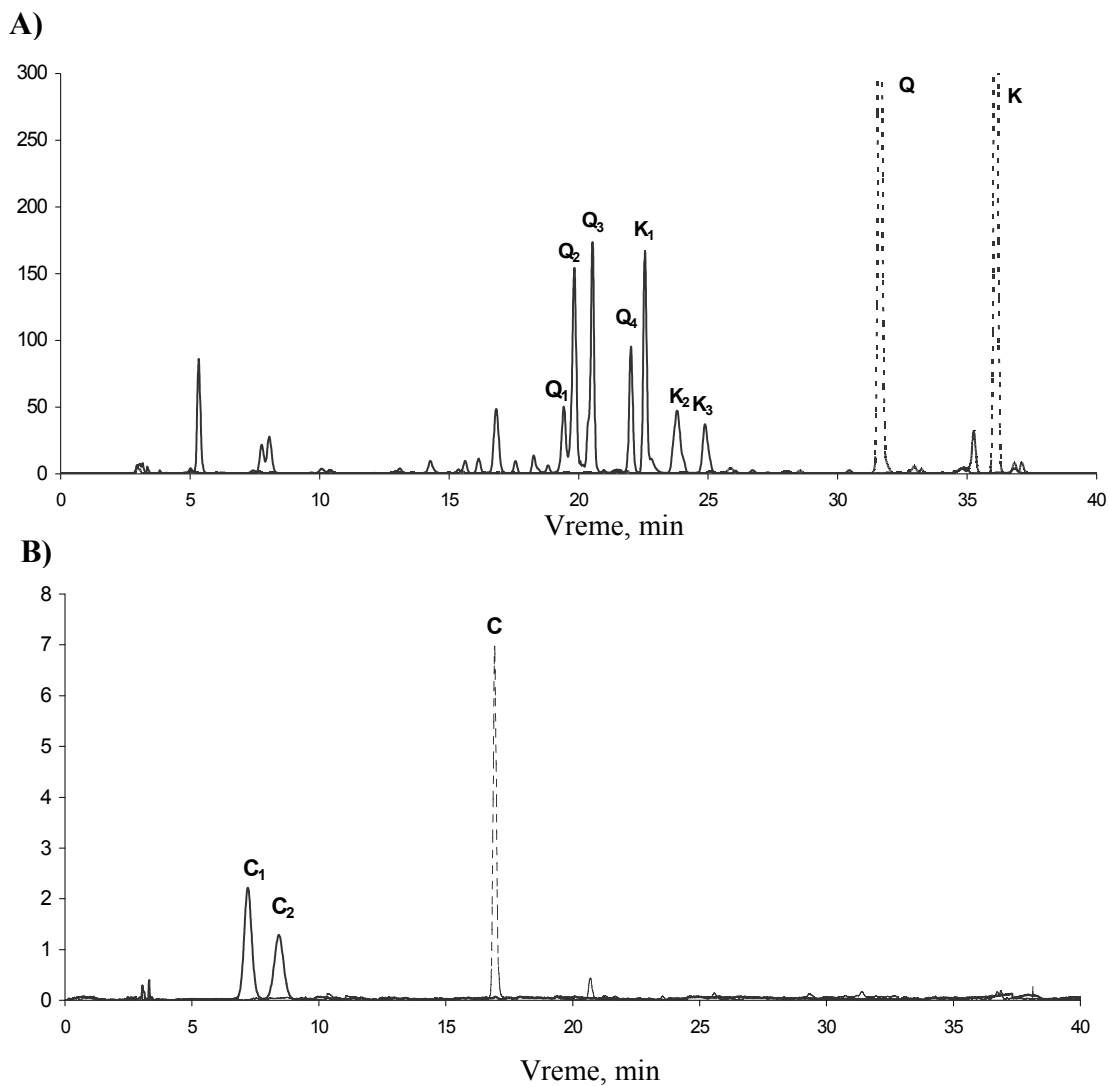
Biljna vrsta	Dodati standard	Ekstrakcija, bez CHCl ₃	Ekstrakcija sa CHCl ₃	Hidroliza od 40 min	Hidroliza od 100 min
<i>P. zonale</i>	M	98.6 \pm 0.6	92.4 \pm 1.6	87.1 \pm 2.6	81.0 \pm 2.9
	Q	99.8 \pm 1.2	93.6 \pm 2.1	91.1 \pm 1.1	84.3 \pm 0.9
	K	98.5 \pm 0.4	68.3 \pm 0.7	66.4 \pm 2.1	61.2 \pm 1.8
	Pg	102.7 \pm 1.7	99.8 \pm 1.3	95.1 \pm 3.7	93.5 \pm 4.1
	CA	102.7 \pm 0.8	97.4 \pm 1.5	95.1 \pm 2.1	88.5 \pm 0.9
<i>P. coleoides</i>	M	103.7 \pm 0.7	94.8 \pm 2.5	86.0 \pm 0.9	79.7 \pm 2.4
	Q	98.9 \pm 2.6	94.4 \pm 1.0	92.7 \pm 1.5	79.3 \pm 2.1
	K	101.9 \pm 2.0	71.3 \pm 1.5	66.8 \pm 1.4	62.4 \pm 1.5
	Pg	97.4 \pm 2.2	94.2 \pm 1.0	92.4 \pm 1.7	88.5 \pm 1.7
	CA	99.5 \pm 1.6	95.7 \pm 1.1	87.9 \pm 2.1	70.2 \pm 3.2
<i>T. platyphyllos</i>	M	98.1 \pm 2.2	95.5 \pm 0.7	91.9 \pm 2.1	81.9 \pm 3.5
	Q	101.6 \pm 1.1	92.9 \pm 2.6	90.6 \pm 0.3	84.2 \pm 0.3
	K	98.7 \pm 4.9	88.7 \pm 2.0	84.1 \pm 2.7	73.7 \pm 1.5
	Pg	104.3 \pm 2.8	97.7 \pm 2.2	92.2 \pm 1.7	87.6 \pm 1.4
	CA	101.2 \pm 3.4	98.8 \pm 1.1	95.0 \pm 1.7	85.3 \pm 2.5
<i>A. altissima</i>	M	97.7 \pm 1.3	96.6 \pm 1.2	93.6 \pm 0.9	88.1 \pm 0.8
	Q	95.1 \pm 3.9	91.7 \pm 4.4	95.5 \pm 0.5	78.3 \pm 2.6
	K	95.6 \pm 2.4	89.7 \pm 3.2	86.1 \pm 1.6	78.5 \pm 1.2
	Pg	95.7 \pm 1.4	99.8 \pm 3.6	92.1 \pm 1.5	87.9 \pm 1.3
	CA	103.5 \pm 1.6	96.0 \pm 1.8	97.5 \pm 0.7	89.1 \pm 1.9

4.1.2.3. Optimizacija uslova hidrolize glikozida fenolnih jedinjenja

Fenolna jedinjenja se u biljkama uglavnom nalaze u obliku raznovrsnih glikozida (Croft 1998, Merken & Beecher 2000). *Recovery vrednosti*, dobijene metodom standardnog dodatka za hidrolizu fenolnih jedinjenja u trajanju od 40 i 100 minuta, u metanolu koji je sadržao 2 M HCl na 85 °C, prikazane su u tabeli 4.3. Za hidrolizu od 40 minuta *recovery* vrednosti ispitivanih jedinjenja su bile iznad 90%, osim za kampferol (66–86%, što je posledica prethodnog dodavanja hloroforma) i miricetin (86–94%). Nakon 100 min hidrolize, *recovery* vrednosti za sva testirana jedinjenja bile su za oko 5-20% niže nego nakon hidrolize od 40 minuta, tabela 4.3. Na osnovu dobijenih rezultata, 40 minuta je prihvaćeno za optimalno vreme hidrolize. Ovo vreme bilo dovoljno i za hidrolizu glikozidnih veza: 0.66 nmola kvercetin-3-*O*-rutinozida (100%), 0.30 nmola cijanidin-3-*O*-glukozida (97.6%) i 0.30 nmola pelargonidin-3-*O*-glukozida (98.6%). Vreme hidrolize većih količina antocijana (više od 50 µg po g mase svežeg tkiva, kao u slučaju uzoraka bobičastih plodova) treba da bude produženo na 100 minuta.

Reprezentativni hromatogrami ekstrakata listova biljnih vrsta *P. zonale* (zeleni segmenti listova) i *A. altissima*, pre i posle hidrolize, prikazani su na slici 4.4. Na hromatogramu snimljenom na 360 nm (karakteristična talasna dužina za flavon-3-ole) uočava se da su glikozidi Q i K prisutni u listovima muškatle u potpunosti hidrolizovani, slika 4.4A. Na hromatogramu nehidrolizovanih uzoraka dva pika, Q₁ i Q₂, su identifikovani kao Q-3-*O*-rutinozid i Q-3-*O*-Glc, dok je za druga dva: Q₃ i Q₄, sa spektralnim karakteristikama: 228, 255, 266*, 354 nm i 228, 268, 290*, 354 nm redom, pretpostavljeno da su glukozidi Q, slika 4.4A. Na osnovu podataka dostupnih u opisu prijave patenta, varijeteta „Ben Franklin“ (Craig 1998), retencionih vremena i spaktara Q₃ bi mogao da odgovara: Q-3-*O*-ksilozidu, a pik Q₄: Q-3-*O*-ramnozidu. Kampferol glikozidi: K₁, K₂ i K₃ (spektralne karakteristike: 230, 266, 292*, 346 nm; 230, 267, 292*, 346 nm i 226, 268, 292*, 347 nm, redom) bi po istom principu mogli da predstavljaju: K-3-*O*-Glc, K-3-*O*-Rut i K-3-*O*-ksilozid.

Identifikacija pikova hromatograma snimljenog na 520 nm (karakteristično za antocijane) uzoraka listova kiselog drveta je urađena na isti način kao i u slučaju muškatle. Dva pika koja su obeležena kao C₁ i C₂ su identifikovana kao glikozidi cijanidina, jedinog prisutnog antocijanidina (hromatogram posle hidrolize), slika 4.4B.



Slika 4.4. Hromatogrami ekstrakata pre (puna linija) i posle (isprekidana linija) hidrolize glikozida fenolnih jedinjenja. A) Hromatogram ekstrakta listova muškatle sniman na 360 nm. B) Hromatogram ekstrakta listova kiselog drveta sniman na 520 nm. Q₁, kvercetin-3-*O*-rutinozid i Q₂, kvercetin-3-*O*-glukozid su identifikovani na osnovu standardnih jedinjenja. Pikovi Q₃, Q₄; K₂, K₃; C₁, C₂ odgovaraju glikozidima kvercetina, kampferola i cijanida, redom, identifikovani na osnovu retencionih vremena, spektralnih karakteristika i literaturnih podataka. Na ordinati je prikazana apsorbcija u mAU.






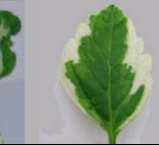
4.1.2.4. Profili fenolnih jedinjenja u listovima *P. zonale*, *P. coleoides*, *T. platyphyllos* i *A. altissima*

Rezultati identifikacije fenolnih jedinjenja iz zelenih tkiva listova vrsta *A. altissima*, *T. platyphyllos*, *P. coleoides* i različitih varijeteta *P. zonale* prikazani su u tabeli 4.4. Za razliku od varijeteta „Ben Franklin” („BF“) i „Frank Headley“ („FH“), panaširani varijetet muškatile „Freak of Nature” („FN“) ima centar lista bele boje, a ivicu zelene. Ovaj varijetet je upotrebljen u cilju ispitivanja uticaja pozicije tkiva (belog i zelenog) u listu (centar ili ivica lista) na sadržaj fenolnih jedinjenja.

Belo i zeleno tkivo listova svih ispitivanih varijeteta muškatile i tamjanike se nisu međusobno kvalitativno razlikovali po svom fenolnom profilu. Zato su u tabeli 4.4 prikazani rezultati dobijeni iz zelenog tkiva panaširanih listova, i potpuno zelenih listova lipe i kiselog drveta.

Između tri varijeteta muškatile takođe nije bilo kvalitativnih razlika u zastupljenosti fenolnih jedinjenja. Koncentracija ukupnih fenola je bila najveća u tkivu muškatile, varijeteta FN, prvenstveno zbog visoke koncentracije *p*-HBA. Jedino je u listovima lipe, detektovan miricetin, dok su antocijanidini, Cy i Dp dobijeni hidrolizom proantocijanidina, a ne glikozida. Listovi lipe su imali najveći sadržaj Q i najveći odnos Q/K. Samo su kiselo drvo i tamjanika sadržali predstavnike flavona (apigenin i luteolin). Listovi tamjanike su specifični i zbog nedostatka flavon-3-ola i zbog prisustva HCA izvedenih samo od kafeinske kiseline, tabela 4.4. Listovi muškatile su sadržali značajne količine HBA, Cat i u manjoj količini ferulinske kiseline. Sve testirane vrste su imale različit profil HCA i jedino je kiselo drvo sadržalo i flavone i flavon-3-ole.

Tabela 4.4. Glavna fenolna jedinjenja određena u zelenom tkivu listova *A. altissima*, *T. platyphyllos*, *P. coleoides* i različitim varijetetima *P. zonale* (BF, „Ben Franklin”; FH; „Frank Headley”; FN, „Freak of Nature”). Predstavljene su srednje vrednosti sadržaja fenolnih jedinjenja ± SE (n = 6) izražene u μmol, a u slučaju antocijanidina u nmol po g sveže mase listova.

Biljna vrsta	<i>A. altissima</i>	<i>T. platyphyllos</i>	<i>P. zonale</i> „FH”	<i>P. zonale</i> „BF”	<i>P. zonale</i> „FN”	<i>P. coleoides</i>
izgled lista						
Fenolno jedinjenje						
<i>HBA</i>						
GA	n.d.	n.d.	8.5 ± 1.1	10.8 ± 1.2	19.3 ± 0.3	2.7 ± 0.2
PrcA	38.9 ± 0.8	46.1 ± 0.6	3.9 ± 0.3	2.9 ± 0.2	11.2 ± 1.2	1.6 ± 0.2
<i>p</i> -HBA	4.6 ± 0.2	4.7 ± 0.2	31.7 ± 2.6	36.1 ± 2.4	96.2 ± 9.2	n.d.
SA	32.1 ± 0.9	39.4 ± 0.8	3.7 ± 0.1	2.7 ± 0.3	6.5 ± 0.6	0.8 ± 0.1
<i>HCA i derivati</i>						
CGA	2.2 ± 0.2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
CA	4.4 ± 0.3	1.1 ± 0.1	0.26 ± 0.04	0.28 ± 0.02	0.31 ± 0.02	9.1 ± 0.8
<i>p</i> -CA	1.3 ± 0.1	1.8 ± 0.1	2.43 ± 0.24	0.16 ± 0.02	0.45 ± 0.01	n.d.
FA	n.d.	n.d.	0.08 ± 0.01	0.21 ± 0.02	0.34 ± 0.01	n.d.
RA	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	5.6 ± 0.3
<i>flavanoli</i>						
Cat	2.7 ± 0.1	5.0 ± 0.2	5.5 ± 0.6	9.1 ± 0.9	16.9 ± 1.2	1.9 ± 0.3
ECat	n.d.	n.d.	0.41 ± 0.04	0.26 ± 0.01	0.33 ± 0.03	5.9 ± 0.4
<i>flavoni</i>						
luteolin	0.39 ± 0.04	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.11 ± 0.01
apigenin	0.28 ± 0.03	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1.4 ± 0.2
<i>flavon-3-oli</i>						
M	n.d.	0.18 ± 0.01	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Q	1.7 ± 0.1	21.2 ± 0.6	1.0 ± 0.1	2.3 ± 0.2	2.7 ± 0.4	n.d.
K	1.4 ± 0.1	2.0 ± 0.1	1.9 ± 0.1	1.5 ± 0.1	1.1 ± 0.1	n.d.
<i>antocijanidini</i>						
Cy	6.1 ± 0.4	42.9 ± 1.8	4.3 ± 0.5	1.5 ± 0.1	1.1 ± 0.2	14.8 ± 1.7
Pe	n.d.	n.d.	11.6 ± 0.61	1.0 ± 0.1	n.d.	n.d.
Dp	n.d.	69.8 ± 3.9	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Totalni antioksidativni kapacitet (TAK)</i>						
TEAC, mM	178.5 ± 2.1	299.3 ± 3.5	96.7 ± 5.9	112.7 ± 3.1	240.0 ± 2.7	61.5 ± 1.0

n.d., nije detektovano, ispod limita detekcije. RA, rozmarinska kiselina. TEAC: Trolox ekvivalenti antioksidativne aktivnosti, odnosno, koncentracija Trolox-a koja ima isti antioksidativnu aktivnost kao 1 mM datog jedinjenja (*Rice-Evans et al.* 1996; 1997). Ostale skraćenice su objašnjene u tabelama 3.2. i 4.2.

4.2. Antioksidativni sistem u zelenom i belom tkivu listova biljaka *P. zonale* var. „Ben Franklin”

4.2.1. Karakterizacija komponenata antioksidativnog sistema u zelenom i belom tkivu listova biljaka *P. zonale* var. „Ben Franklin”

4.2.1.1. Markeri oksidativnog stresa

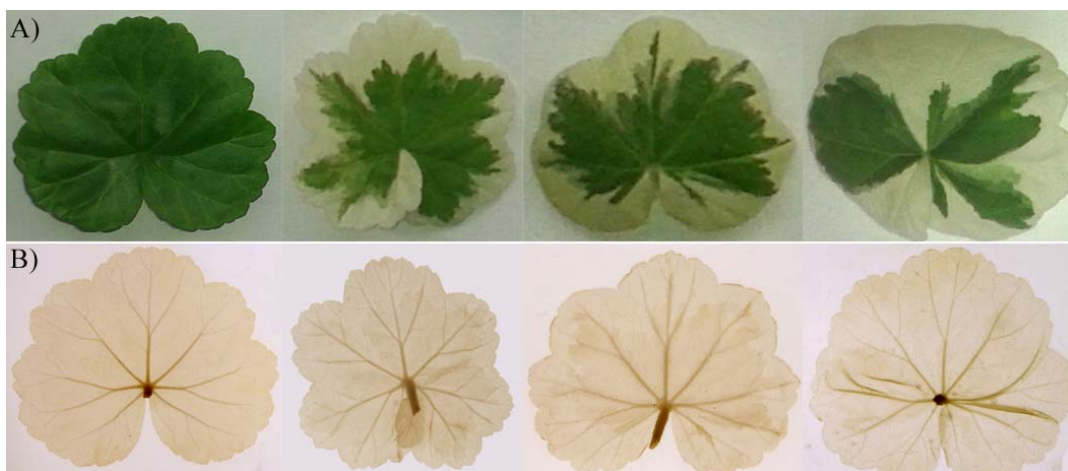
Ukoliko je brzina stvaranja ROS u ćeliji veća od brzine njihovog uklanjanja, doći će do značajne akumulacije ROS, koje u značajnoj meri oksiduju i oštećuju dostupne biomolekule. Oksidacijom bočnih ostataka Pro, Arg, Lys i Thr vodonik-peroksidom, u prisustvu prelaznih metala, nastaju karbonilni derivati proteina (Stadtman & Levine 2003; Nyström 2005). Sekundarno, do karbonilacije proteina dolazi i konjugacijom aldehidnih grupa oksidativnih proizvoda peroksidacije lipidnih molekula (4-hidroksi-2-nonenala i malondialdehida) sa bočnim ostacima Cys, His i Lys (tip Majklove adicije; Grimsrud et al. 2008). Kako do karbonilacije proteina dolazi ili u reakcijama cepanja polipeptidnog lanca pomoću ROS, ili u reakcijama sa oksidovanim proizvodima lipida i ugljenih hidrata, ili direktnom oksidacijom pomoću H₂O₂, povišeni nivo proteinskih karbonila se smatra markerom oksidativnog stresa (Stadtman & Levine 2003). Već je pomenuto da je fotosintetsko tkivo glavni izvor ROS u biljkama. U cilju da ispitivanja da li značajna količina ROS nastaje i u fotosintetski neaktivnom tkivu listova biljaka *P. zonale* gajenih pod optimalnim svetlosnim uslovima (300 μmol m⁻² s⁻¹ PAR), meren je sadržaj proteinskih karbonila u frakciji ukupnih rastvornih proteina. Takođe, urađena je detekcija potencijalno akumuliranog H₂O₂ bojenjem sa DAB-om, pri čemu oksidacijom DAB-a vodonik-peroksidom nastaje braon polimerizovan proizvod, koji precipitira.

Rezultati merenja nivoa karbonilacije proteina u zelenim i belim tkivima listova dostupnih varijeteta panaširanih muškati, ukazuju na veću količinu proteinskih karbonila u zelenom tkivu, tabela 4.5. Najveća statistička razlika u sadržaju proteinskih karbonila između zelenog i belog tkiva listova dobijena je za varijetet „FH“ (za ostala dva varijeteta $P = 0.10$, po Man-Vitnijevom U testu). U listovima varijeteta „FH“ izmeren je i najniži stepen karbonilacije između ova tri varijeteta muškate.

Tabela 4.5. Stepen karbonilacije ukupnih rastvornih proteina u zelenom i belom tkivu listova biljaka *P. zonale* različitih varijeteta (BF, „Ben Franklin”; FH; „Frank Headley”; FN, „Freak of Nature”). Predstavljene su srednje vrednosti \pm SE (n = 3-8), izražene u nmol proteinskih karbonila po mg proteina. Statistička značajnost razlike stepena karbonilacije između zelenog i belog tkiva ispitana je Man-Vitnijevim U testom (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$).

	<i>P. zonale</i> „FH”	<i>P. zonale</i> „BF”	<i>P. zonale</i> „FN”
Zeleno tkivo	22.5 \pm 1.4	42.6 \pm 5.6	46.1 \pm 5.2
Belo tkivo	13.3 \pm 1.1 ***	15.2 \pm 3.2	17.7 \pm 2.8

Što se akumulacije vodonik- peroksida tiče, ispitivani su listovi varijeteta „BF“ gajenih pod optimalnim svetlosnim uslovima i veće količine H₂O₂ su detektovane samo u lisnoj dršci (posebno na mestu preseka) i u predelu glavne nervature, slika 4.5. Značajna akumulacija H₂O₂ nije uočena ni u zelenom ni u belom tkivu listova biljaka *P. zonale* „BF“.



Slika 4.5. Detekcija H₂O₂ u listovima *P. zonale* „BF“ bojenjem sa DAB-om (1 mg/ml). Fotografije reprezentativnih uzoraka listova A) pre bojenja, i B) posle bojenja i uklanjanja hlorofila. Ne uočava se značajna akumulacija H₂O₂ nezavisno od boje lisnih segmenata, osim u lisnoj dršci i glavnoj nervaturi. Kao kontrola, obojen je i potpuno zeleni list nepanaširane *P. zonale*. Treba zanemariti preklapanje donjih delova listova nakon bojenja DAB-om, jer dehidrirani nisu mogli da zadrže početnu 3D formu.

4.2.1.2. Redoks-stanje Asc i GSH

Sadržaji Asc i DHA u belom i zelenom tkivu listova *P. zonale* varijeteta „BF“ gajenih pod optimalnim svetlosnim uslovima prikazane su u tabeli 4.6. U zelenom tkivu nađen je skoro dva puta veći sadržaj Asc u odnosu na belo tkivo. S druge strane, u belom tkivu je određen veći sadržaj glutaciona (i GSH i GSSG) u poređenju sa zelenim tkivom, tabela 4.6. Redoks-stanja ova dva antioksidanta se nisu razlikovala između belog i zelenog tkiva listova muškatele.

Tabela 4.6. Sadržaji askorbata i glutaciona i njihovi redoks-koeficijenti (Rk) u zelenim i belim tkivima listova *P. zonale* biljaka gajenih pod optimalnim svetlosnim uslovima. Prikazane su srednje vrednosti \pm SE (n = 4-5). $RkA = 100\% \times [Asc] / ([Asc] + [DHA])$; $RkG = 100\% \times [GSH] / ([GSH] + 2[GSSG])$. Prikazane su statistički značajne razlike između zelenog i belog tkiva prema Man-Vitnijevom U testu (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$).

tip tkiva	Asc, $\mu\text{mol g}^{-1}_{\text{FW}}$	DHA, $\mu\text{mol g}^{-1}_{\text{FW}}$	RkA, %	GSH, $\text{nmol g}^{-1}_{\text{FW}}$	GSSG, $\text{nmol g}^{-1}_{\text{FW}}$	RkG, %
Zeleno	3.7 ± 0.4	0.8 ± 0.3	85.0 ± 3.7	193.0 ± 12.4	9.7 ± 1.1	90.7 ± 1.3
Belo	$1.8 \pm 0.3^*$	0.5 ± 0.1	78.3 ± 2.6	$319.2 \pm 16.4^{**}$	$21.8 \pm 2.7^{**}$	88.0 ± 1.4

4.2.1.3. Subćelijska lokalizacija Asc i GSH

Na osnovu dobijenih razlika u sadržaju Asc i GSH u fotosintetski aktivnom i fotosintetski neaktivnom tkivu listova biljaka *P. zonale*, u nastavku istraživanja ispitivano je da li se i distribucija Asc i GSH na unutarćelijskom nivou razlikuje između ova dva tkiva.

Pre svega, TEM-om je analizirana unutarćelijska organizacija mezofila oba segmenta listova, slike 4.6 i 4.7. Pokazano je da zelene ćelije sadrže normalno razvijene hloroplaste sa dobro organizovanim tilakoidima grana i stroma, a uočeno je i prisustvo granula skroba, slika 4.6A i 4.7A. Nadalje, u zelenim ćelijama uočene su normalne mitohondrije sa vidljivim kristama, zatim peroksizomi, jedro sa jedarcetom, vakuole sa očuvanim tonoplastom i ćelijski zid, slike 4.6A i 4.7A.

S druge strane, u belim ćelijama su uočeni plastidi, manji od zelenih hloroplasta, koji nemaju tilakoide niti skrobne granule, a umesto njih, uočene su grupisane vakuolarne i nepravilne lamelarne strukture, slike 4.6B. i 4.7B. „Albino“ plastidi su ovičeni membranskom ovojnicom, mada njihov oblik i veličina varira. Posebno je interesantno odsustvo peroksizoma

u belim ćelijama, slike 4.6B i 4.7B. Mitohondrije i jedro u belim ćelijama su normalnog izgleda, kao i u zelenim.

Izolovane epidermalne trake i belih i zelenih segmenata listova su posmatrane pod optičkim mikroskopom. Nakon bojenja epidermisa viabilnom bojom: neutralnom crvenom, uočeno je da ćelije stoma belih segmenata imaju normalne hloroplaste, što je dodatni pokazatelj da je *P. zonale* model zeleno-belo-zeleno (L1-L2-L3 slojevi meristema) periklinalne himere, odnosno da se mutacija odgovorna za nepostojanje hloroplasta nalazi u ćelijama L2 sloja (odjeljak 2.1.1, *Gallard* 2008). Fotografije epidermisa oba lisna segmenta prikazane su na slici P1, u poglavlju Prilozi.

Značajna razlika između mezofolnih ćelija zelenog i belog tkiva odnosi se na razliku u udelu zapremina određenih ćelijskih kompartmenata, tabela 4.7. U zelenom tkivu najveću zapreminu u ćeliji zauzimala je vakuola i odmah za njom plastidi i apoplast, a u belom tkivu takođe vakuola i apoplast, a zatim jedro, citosol, pa tek onda plastidi. Procentualna zastupljenost jedra, mitohondrija i apoplasta je bila slična, dok su u zelenom tkivu plastidi i citoplazma bili zastupljeniji na račun vakuole u belom tkivu, tabela 4.7.

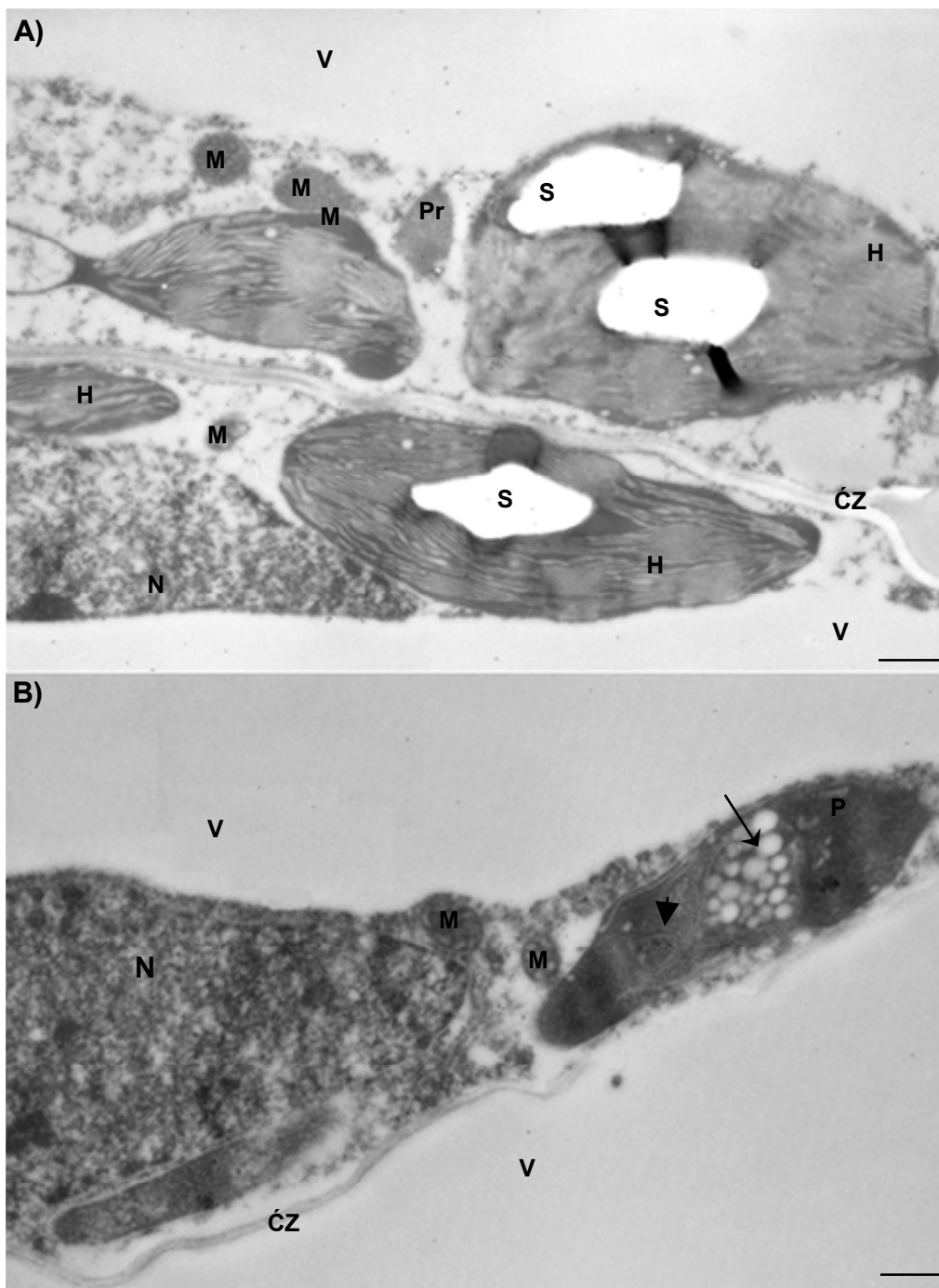
Tabela 4.7. Zastupljenost zapremina ćelijskih odeljaka u belom i zelenom tkivu listova biljaka *P. zonale* gajenih pod optimalnim svetlosnim uslovima. Prikazane su srednje vrednosti \pm SE ($n > 10$ za jedra i peroksizome, $n > 20$ za ostale ćelijske odeljke). Prikazane su statistički značajne razlike između zelenog i belog tkiva prema Man-Vitnijevom U testu (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$).

	Jedro	Plastidi	Mitohondrije	Peroksizomi	Vakuole	Apoplast	Citosol
Zeleno	7.4 ± 0.8	23.6 ± 2.9	1.1 ± 0.1	1.5 ± 0.5	35.8 ± 2.5	23.1 ± 2.2	14.4 ± 1.4
Belo	8.7 ± 1.2	$4.6 \pm 0.5^{***}$	1.0 ± 0.2	0.0 ± 0.0^a	$58.0 \pm 3.7^{***}$	22.6 ± 3.2	$8.6 \pm 1.6^{***}$

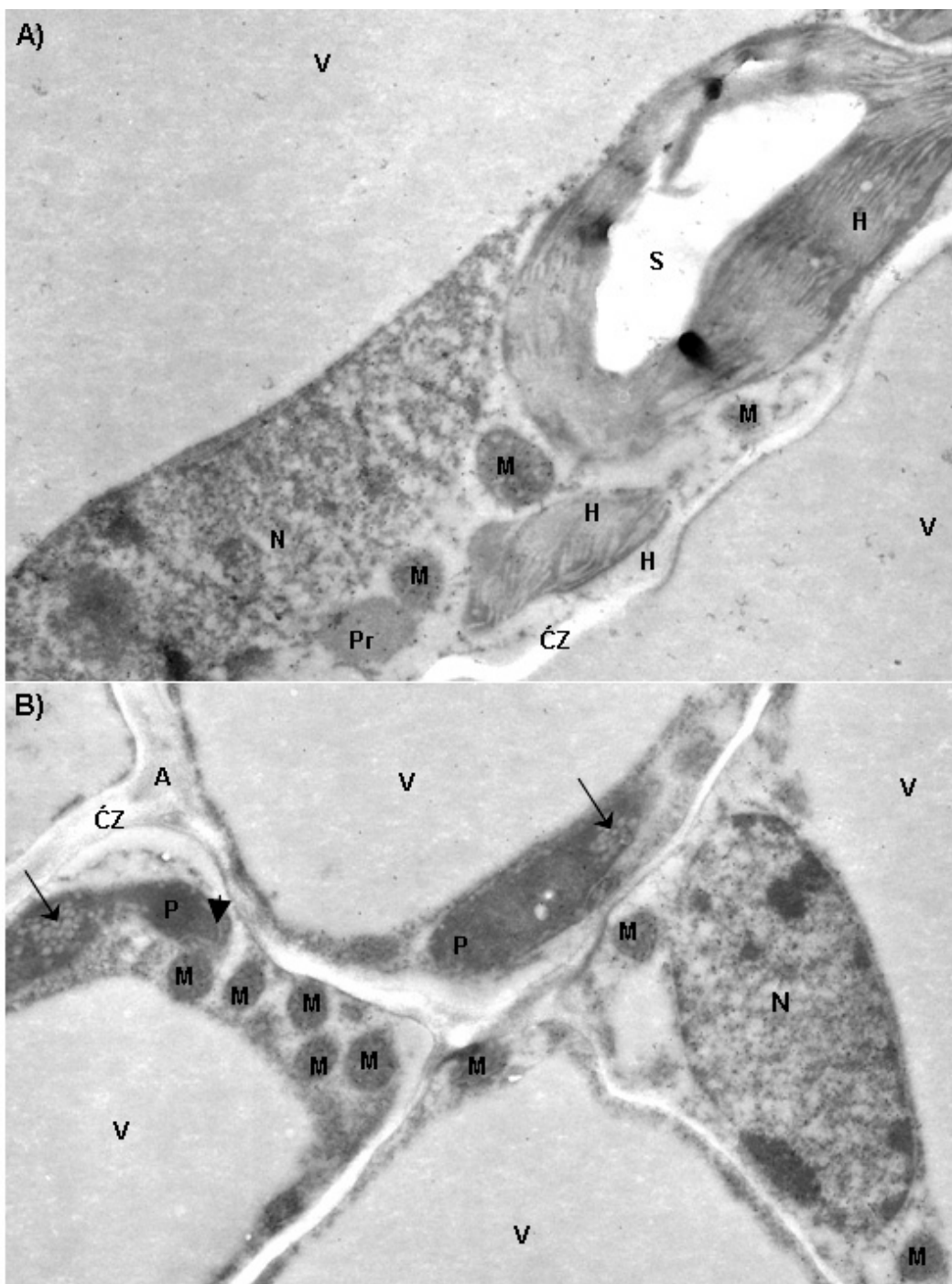
^a Peroksizomi nisu uočeni u presecima mezofila belog tkiva listova.

Konačno, imunocitohemijskom analizom utvrđeno je da je u ćelijama zelenog tkiva listova biljaka *P. zonale* Asc najviše zastupljen u jedru, zatim u hloroplastima i peroksizomima, a zatim slede mitohondrije, citosol, vakuola i apoplast, tabela 4.9. U belim ćelijama, askorbata ima najviše u jedru, zatim u citosolu, mitohondrijama, plastidima, vakuoli, a najmanje u apoplastu. Ovi rezultati ukazuju da je citosol važno mesto lokalizacije Asc u ćelijama belog tkiva listova, tabela 4.9. Takođe, imunohistohemijskim analizama, potvrđeni su rezultati dobijeni biohemijskim metodama, da je koncentracija Asc veća u zelenim ćelijama, s

tim što je dobijen manji odnos sadržaja ukupnog Asc u zelenom i belom tkivu (1.45 prema 1.95, koliko je dobijeno HPLC metodom).



Slika 4.6. Transmisione elektronske mikrofografije reprezentativnih delova ćelija na kojima je prikazana sub-ćelijska distribucija askorbata obeleženog zlatom u zelenim (A) i belim (B) tkivima listova biljaka *P. zonale*. Oznake: A, apoplast; ČZ, ćelijski zid; H, hloroplast; M, mitohondrija; N, nukleus; P, plastid u belim ćelijama; Pr, peroksizomi; S, skrob; V, vakuola. Trouglasta strelica upućuje na lamelarne, a klasična strelica na vezikularne strukture u plastidima u belom tkivu listova. Skala predstavlja 1 μm .



Slika 4.7. Transmisione elektronske miktografije reprezentativnih delova ćelija na kojima je prikazana sub-ćelijska distribucija glutationa obeleženog zlatom u zelenim (A) i belim (B) tkivima listova biljaka *P. zonale*. Oznake: A, apoplast; ČZ, ćelijski zid; H, hloroplast; M, mitohondrija; N, nukleus; P, plastid u belim ćelijama; Pr, peroksizomi; S, skrob; V, vakuola. Trouglasta strelica upućuje na lamelarne, a klasična strelica na vezikularne strukture u plastidima u belom tkivu listova. Skala predstavlja 1 μm .

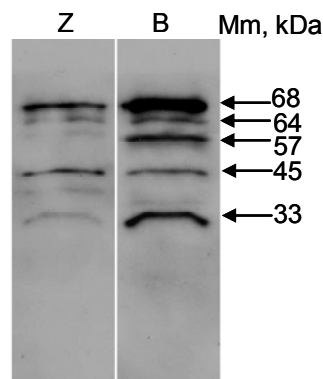
Tabela 4.8. Distribucija askorbata i glutaciona unutar različitih ćelijskih odeljaka u zelenim i belim tkivima listova biljaka *P. zonale*. Statistički značajne razlike između ćelija belog i zelenog tkiva dobijene Man-Vitnjevim U testom i broj analiziranih ćelijskih odeljaka su prikazani (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$). Prikazane vrednosti su srednje vrednosti \pm SE. Gzč: gustina zlatnih čestica po μm^2 . n.d. nije detektovano.

Ćelijski odeljci	ASKORBAT							
	Zeleno tkivo				Belo tkivo			
	Gzč, μm^2	Gzč, %	$\mu\text{mol g}^{-1}_{\text{FW}}^{\text{a}}$	mM ^c	Gzč, μm^2	Gzč, %	$\mu\text{mol g}^{-1}_{\text{FW}}^{\text{a}}$	mM ^c
Jedra (n=6)	2.21 \pm 0.26	31.13 \pm 3.67	1.40 \pm 0.16	24.5 \pm 2.8	1.67 \pm 0.27	34.08 \pm 5.51	0.78 \pm 0.13	11.6 \pm 1.9 ***
Plastidi (n>20)	1.37 \pm 0.08	19.3 \pm 1.13	0.87 \pm 0.05	4.8 \pm 0.3	0.61 \pm 0.20	12.45 \pm 4.08	0.29 \pm 0.09	8.2 \pm 2.5 ***
Mitochondrije (n>35)	1.21 \pm 0.26	17.04 \pm 3.65	0.77 \pm 0.16	90.6 \pm 18.8	0.97 \pm 0.20	19.80 \pm 4.05	0.46 \pm 0.09	59.5 \pm 11.6 ***
Peroksizomi (n>15)	1.48 \pm 0.24	20.85 \pm 3.38	0.94 \pm 0.15	81.1 \pm 12.9	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Citosol (n>25)	0.51 \pm 0.05	7.18 \pm 0.70	0.32 \pm 0.03	2.9 \pm 0.1	1.36 \pm 0.13 ***	27.76 \pm 2.65 ***	0.64 \pm 0.06 ***	9.6 \pm 0.9 ***
Vakuole (n>15)	0.22 \pm 0.02	3.1 \pm 0.28	0.14 \pm 0.01	0.5 \pm 0.0	0.17 \pm 0.01 *	3.47 \pm 0.20 *	0.08 \pm 0.00 *	0.2 \pm 0.0 **
Apoplast (n>10)	0.10 \pm 0.01	1.41 \pm 0.14	0.06 \pm 0.01	0.3 \pm 0.1	0.12 \pm 0.02	2.45 \pm 0.41	0.06 \pm 0.01	0.3 \pm 0.1
Σ	7.1 \pm 0.26	100	4.5 ^b	–	4.9 \pm 0.27	100	2.3 ^b	–
Ćelijski odeljci	GLUTATION							
	Zeleno tkivo				Belo tkivo			
	Gzč, μm^2	Gzč, %	nmol $\text{g}^{-1}_{\text{FW}}^{\text{a}}$	mM ^c	Gzč, μm^2	Gzč, %	nmol $\text{g}^{-1}_{\text{FW}}^{\text{a}}$	mM ^c
Jedra (n=6)	5.25 \pm 0.65	17.49 \pm 2.17	35.45 \pm 4.39	0.62 \pm 0.08	11.50 \pm 1.27 **	27.64 \pm 3.05**	94.24 \pm 7.53 **	1.40 \pm 0.11 **
Plastidi (n>22)	0.45 \pm 0.03	1.51 \pm 0.10	3.04 \pm 0.20	0.02 \pm 0.00	0.46 \pm 0.26 ***	1.11 \pm 0.62***	3.77 \pm 1.54 ***	0.11 \pm 0.04 ***
Mitochondrije (n>44)	18.38 \pm 0.71	61.23 \pm 2.37	124.1 \pm 4.79	14.24 \pm 0.56	20.99 \pm 1.17	50.44 \pm 2.81	172.0 \pm 6.94	22.25 \pm 0.90 ***
Peroksizomi (n>16)	2.55 \pm 0.31	8.49 \pm 1.03	17.22 \pm 2.09	1.49 \pm 0.18	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Citosol (n>25)	3.02 \pm 0.31	10.06 \pm 1.01	20.39 \pm 2.09	0.18 \pm 0.02	8.24 \pm 0.89 ***	19.8 \pm 2.14 ***	67.53 \pm 5.28 ***	1.02 \pm 0.08 ***
Vakuole (n>20)	0.28 \pm 0.01	0.93 \pm 0.03	1.89 \pm 0.07	0.007 \pm 0.000	0.34 \pm 0.03 *	0.82 \pm 0.07 *	2.79 \pm 0.18 *	0.006 \pm 0.000
Apoplast (n>10)	0.09 \pm 0.03	0.30 \pm 0.10	0.61 \pm 0.20	0.003 \pm 0.001	0.08 \pm 0.02 ***	0.19 \pm 0.05 ***	0.66 \pm 0.12 ***	0.004 \pm 0.001
Σ	30.02 \pm 0.71	100	202.7 ^b	–	41.61 \pm 1.27	100	246.8 ^b	–

^a sadržaj ukupnog askorbata (Asc+DHA) izražen u $\mu\text{mol g}^{-1}_{\text{FW}}$ i glutaciona (GSH+GSSG) izražen u nmol $\text{g}^{-1}_{\text{FW}}$ izračunat na osnovu procentualne gzč i ^b koncentracije ukupnog askorbata i glutaciona u belim i zelenim segmentima listova predstavljenih u tabeli 4.6; ^c na osnovu rezultata ^a zapreminskog udela organela u ćeliji (tabela 4.7) i zapremine 773 μl za 1g sveže mase mezofilnog tkiva (*Queval et al.* 2011) izračunati su sadržaji askorbata i glutaciona.

S druge strane, u oba lisna tkiva, GSH je bio najviše zastupljen u mitohondrijama, jedru i citosolu, tabela 4.8. Slično kao što je pokazano i HPLC analizom, tabela 4.6, ukupnog GSH ima više u belim nego u zelenim ćelijama listova muškatle, i to duplo više u jedru i citosolu, dok je u mitohondrijama koncentracija GSH slična kao i u zelenim ćelijama, tabela 4.8. Kada se uzmu u obzir zapremine ćelijskih odeljaka i preračuna koncentracija ukupnog Asc i GSH po organelama, uočava se da je koncentracija Asc najveća u mitohondrijama, peroksizomima i jedrima i tek onda slede hloroplasti u oba tkiva listova. Značajno je viša koncentracija Asc u citosolu i plastidima u belom tkivu, a u zelenom u jedru, mitohondrijama i peroksizomima, tabela 4.8. Što se tiče koncentracije ukupnog GSH ona je najviša u mitohondrijama, peroksizomima i jedru, a najniža u vakuolama i apoplastu. Značajno je viša koncentracija GSH u mitohondrijama, plastidima, jedru i citosolu belih ćelija mezofilnog tkiva, u odnosu na zelene, tabela 4.8.

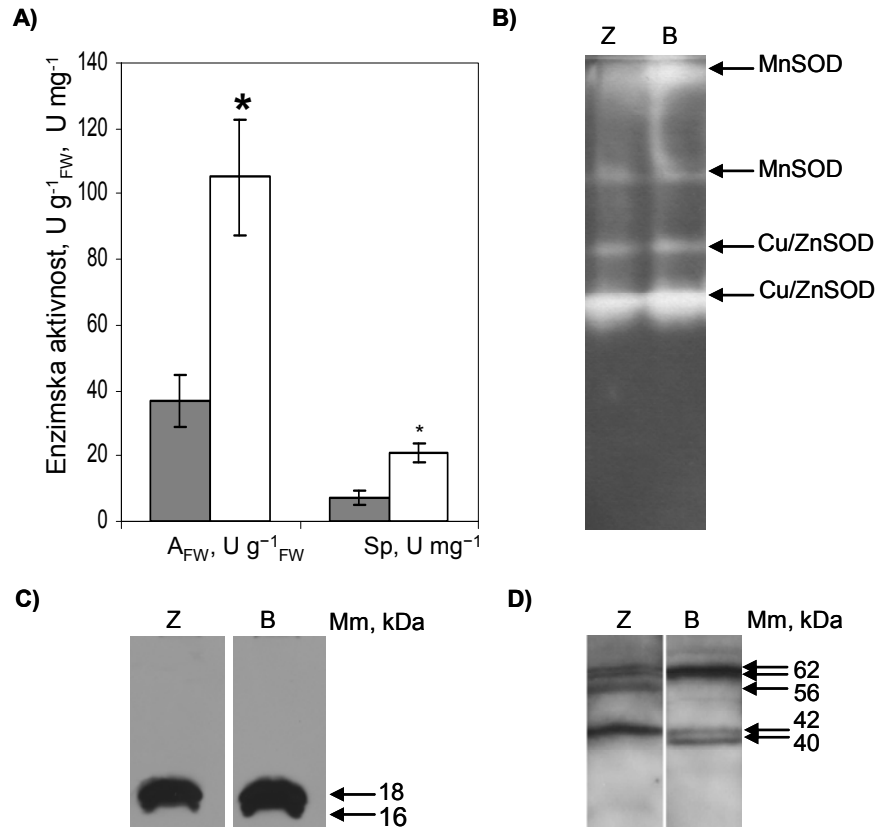
Nakon analiziranja distribucije Asc u organelama ćelija zelenih i belih delova listova muškatle, ispitivano je prisustvo galaktolakton-dehidrogenaze (GalLDH), enzima koji katalizuje poslednji korak biosinteze Asc u unutrašnjoj membrani mitohondrija, u ova dva tkiva. Rezultati dobijeni 'Western' blot analizom pokazuju da je GalLDH (Mm u opsegu od 57-68 kDa) zastupljenija u belom tkivu u odnosu na zeleno tkivo listova muškatle, slika 4.8. Ovakav rezultat je u suprotnosti sa ispitivanom ekspresijom GalLDH transkripata u ovom radu, gde je u belom tkivu listova pokazana 9.7 puta niža ekspresija transkripta koji kodiraju enzim GalLDH u odnosu na zeleno tkivo.



Slika 4.8. 'Western' blot analiza GalLDH u solubilnim frakcijama zelenog tkiva (Z) i belog tkiva (B) listova biljaka *P. zonale* gajenih pod optimalnim svetlosnim uslovima. (10% PAG). Količine ekstrakata nanete u svaki bunar i za nativnu i za SDS PAGE su normirane na količinu proteina.

4.2.1.4. SOD: aktivnost, izoforme i distribucija

Određivanjem specifične aktivnosti SOD u ekstraktima ukupnih rastvornih proteina ustanovljena je veća aktivnost SOD u belom, nego u zelenom tkivu listova biljaka *P. zonale*, slika 4.9A.



Slika 4.9. Detekcija različitih izoformi SOD u solubilnim ekstraktima zelenog (Z, sive kolone) i belog (B, bele kolone) tkiva listova biljaka *P. zonale* gajenih pod optimalnim svetlosnim uslovima. A) Specifične aktivnosti ukupnih SOD su izražene u U g⁻¹_{FW} (aktivnost po g svežeg tkiva, A_{FW}) i u U mg⁻¹ (aktivnost po mg proteina, Sp). Prikazane su srednje vrednosti ± SE, n = 4. B) Izoforme SOD razdvajane na nativnoj PAGE (gradijentni PAG: 10-15%). Diferencijacija između izoformi je zasnovana na inhibiciji u 5 mM H₂O₂ i 5 mM KCN tokom 15 min. Naneto je 20 μg proteina u svaki bunar. Strelice ukazuju na prisustvo dve Cu/ZnSOD izoforme i dve MnSOD izoforme u oba lisna tkiva. C) 'Western' blot Cu/ZnSOD zelenog i belog tkiva; uočavaju se dve proteinske trake sa Mm 16 i 18 kDa (15% PAG). D) 'Western' blot MnSOD izoformi (10% PAG). Za 'Western' blot analizu, po 10 μg proteina je naneto u svaki bunar.

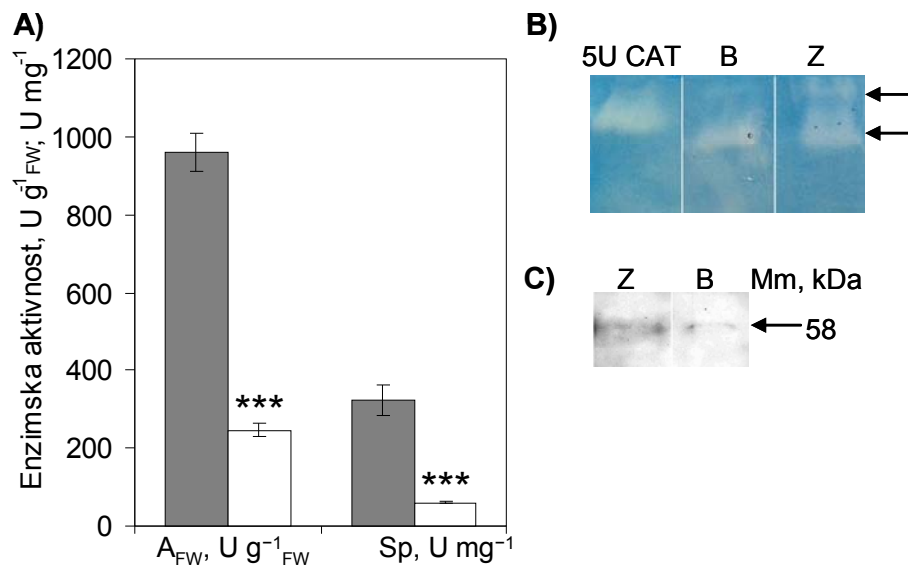
Nakon elektroforetskog razdvajanja, detektovano je pet različitih SOD izoformi u oba tkiva, slika 4.9B. Identifikacija tipa metaloenzima SOD na gelu bazirana je na inkubiranju

gelova u specifičnim inhibitorima: 5 mM H₂O₂ (inhibira Cu/ZnSOD i FeSOD) i 5 mM KCN (inhibira FeSOD) tokom 15 min. Utvrđeno je da su u oba tipa tkiva prisutne dve izoforme veće Mm MnSOD i dve izoforme Cu/ZnSOD sa manjom Mm, slika 4.9B. Aktivnost dve Cu/ZnSOD izoforme i jedne MnSOD izoforme su bile intenzivnije u belom u odnosu na zeleno tkivo.

Ovi rezultati su bili potvrđeni i imunoblotom ('*Western blot*'), gde su detektovane dve imunoreaktivne proteinske trake Cu/ZnSOD sa Mm od 16 i od 18 kDa, slika 4.9C. U membranskim frakcijama nije nađena SOD aktivnost. Imunoblot analizom izoformi MnSOD iz solubilnih proteinskih frakcija belog i zelenog tkiva listova nakon SDS-PAGE (10% PAG) detektovano je pet različitih, proteinskih traka, od kojih su dve (61 i 62 kDa) bile zastupljenije u belom, a subjedinica od 42 kDa bila zastupljenija u zelenom tkivu listova muškatile (proteinska traka kojoj odgovara 40 kDa je izostala), slika 4.9D. U prilog ovim rezultatima svedoči i rezultat ekspresije gena, gde je pokazan 5.4 puta veći nivo transkripta Cu/ZnSOD u belim u odnosu na zelene segmente listova biljaka *P. zonale*. FeSOD nije detektovana u uzorcima listova muškatile, ni nativnom PAGE ni '*Western*' blotom (rezultati nisu prikazani).

4.2.1.5. CAT: aktivnost, izoforme i distribucija

Određena vrednost specifične aktivnosti CAT je bila skoro četiri puta veća u zelenom tkivu listova, u poređenju sa belim tkivom, slika 4.10A. Takođe, nativnom PAGE (8% gel) pokazano je prisustvo dve izoforme CAT u zelenom, i jedne, ali slabije izoforme u belom tkivu listova, slika 4.10B. Povećano prisustvo CAT u zelenom tkivu listova muškatile je potvrđeno i '*Western*' blotom, gde je uočena intenzivnija imunoreaktivna proteinska traka koja odgovara 58 kDa, što rezultuje ukupnom masom od 232 kDa, jer je CAT homotetramer, slika 4.10C. Ovaj rezultat je u skladu sa činjenicom da u belim segmentima nije uočeno prisustvo peroksizoma, slike 4.6B i 4.7B.



Slika 4.10. A) Aktivnost CAT u solubilnim ekstraktima zelenog (Z, sive kolone) i belog (B, bele kolone) tkiva listova biljaka *P. zonale* gajenih pod optimalnim svetlosnim uslovima. Aktivnost CAT je izražena u jedinicama po g svežeg tkiva i po mg proteina. Prikazane su srednje vrednosti \pm SE, n=18 sa statistički značajnim razlikama između ćelija belog i zelenog tkiva dobijene Man-Vitnijevim U testom (** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$). B) Izoforme CAT razdvajane na nativnoj PAGE (8% PAG), strelice ukazuju na prisustvo dve CAT izoforme u zelenom i jedne CAT izoforme u belom tkivu listova muškatile. Za pozitivnu kontrolu naneto je 5U komercijalne CAT izolovane iz goveđe jetre. C) 'Western' blot analiza CAT u listovima muškatile. Zapremine ekstrakata nanete u svaki bunar i za nativnu i za SDS PAGE su normirane na količinu proteina.

4.2.1.6. POD: aktivnost, izoforme i distribucija

Sa ciljem dalje karakterizacije antioksidativnog metabolizma belog i zelenog tkivu listova biljaka *P. zonale* gajenih pod optimalnim svetlosnim uslovima, praćena je i aktivnost solubilnih peroksidaza III klase. Kako je već bilo pomenuto u poglavlju 2.4.1.3, ovi enzimi kao elektron-donore za redukciju H₂O₂ koriste različita fenolna jedinjenja, sa manjom ili većom specifičnošću.

Određivanjem aktivnosti POD na klasičan način, gde je gvajakol bio donor elektrona, kada se rezultati izraze po g svežeg tkiva, dobijena je veća aktivnost u belom tkivu u odnosu na zeleno, a kada se aktivnost izrazi po količini proteina u ekstraktu veća vrednost se dobija u zelenom tkivu, tabela 4.9. Kako je i bilo očekivano, POD su bile u stanju da katalizuju redukciju H₂O₂ sa svim ispitivanim fenolnim kosupstratima, poput CA, FA, CGA, Q i Cat.

Razlike u aktivnostima sa ovim kosupstratima između zelenog i belog tkiva listova *P. zonale* su bile kao i u slučaju gvajakola. POD iz ekstrakta oba tipa tkiva imale su istu specifičnost prema testiranim fenolnim jedinjenjima, a najveća enzimaska aktivnost je dobijena za Q, tabela 4.9.

Tabela 4.9. Aktivnosti POD sa različitim fenolnim elektron-donorima u zelenom i belom tkivu listova *P. zonale* biljaka gajenih pod optimalnim osvetljenjem. Specifične enzimске aktivnosti su date u $U\ g^{-1}_{FW}$ (aktivnost po g svežeg tkiva, A_{FW}) i u $U\ mg^{-1}$ (aktivnost po mg proteina, Sp) i predstavljene su srednje vrednosti \pm SE (n = 20 za gvajakol, a za sve ostale fenole, n = 4). Prikazane su statistički značajne razlike u aktivnosti između zelenog i belog tkiva prema Man-Vitnijevom U testu (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$).

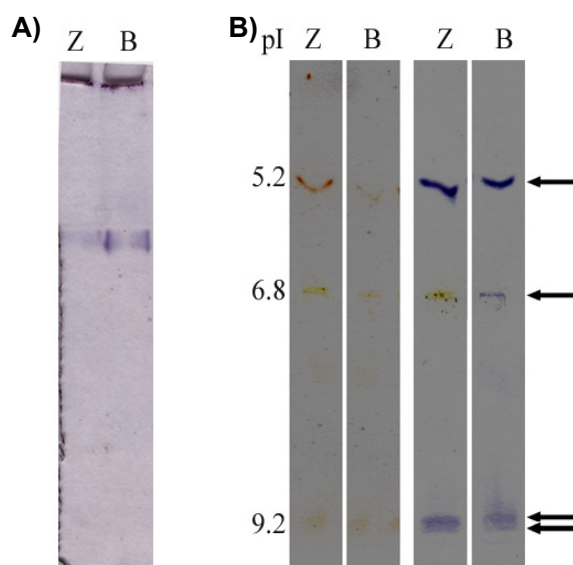
	Gvajakol	CA	FA	CGA	Q	Cat ^a
A_{FW} ($U\ g^{-1}_{FW}$)						
Zeleno tkivo	0.74 \pm 0.13	0.63 \pm 0.12	1.04 \pm 0.14	0.51 \pm 0.05	2.10 \pm 0.27	0.038 \pm 0.005
Belo tkivo	1.03 \pm 0.02**	0.47 \pm 0.07	1.33 \pm 0.18	0.39 \pm 0.04	2.61 \pm 0.23	0.061 \pm 0.003
Sp ($U\ mg^{-1}$)						
Zeleno tkivo	0.41 \pm 0.05	0.32 \pm 0.04	0.60 \pm 0.10	0.27 \pm 0.01	1.02 \pm 0.19	0.026 \pm 0.004
Belo tkivo	0.17 \pm 0.02	0.08 \pm 0.01	0.21 \pm 0.02	0.06 \pm 0.01	0.42 \pm 0.05	0.010 \pm 0.001

^a Jedinice za aktivnost POD sa Cat kao supstratom razlikuju se od jedinica enzimskih aktivnosti POD sa drugim supstratima (videti pododeljak 3.6.8.1).

Kao što je u pododeljku 3.6.8.1. pomenuto, u slučaju gvajakola, CA, FA, CGA i Q jedinica POD aktivnosti definisana kao količina enzima dovoljna da katalizuje oksidaciju 1 μ mol datog fenolnog jedinjenja u minuti na 25 °C u datim uslovima, jer je bilo moguće meriti smanjenje apsorbancije na talasnim dužinama na kojima su karakteristični pikovi za pomenute fenole. Reakciju sa Cat nije bilo moguće pratiti na ovaj način, jer je njegov apsorpcioni pik na 277 nm, a to je talasna dužina na kojoj sam uzorak ima jako visoku apsorbanciju. Zato je aktivnost POD sa Cat određivana praćenjem porasta apsorbancije na 440 nm, što odgovara stvaranju oksidacionih proizvoda. Ova talasna dužina se često uzima kao indikatorska u praćenju stepena oksidacije Cat u vinima i čajevima tokom stajanja, i kako nastaje smeša polimerizovanih proizvoda (npr. ksantalijum-pigmenata; *Labrouche et al.* 2005; *Mitra* 2014), ekstencioni koeficijent nije upotrebljiv. Zato je jedinica aktivnosti POD sa Cat izražavana kao količina enzima koja može da dovede do promene A^{440} za jednu AU po sekundi (*Richard-Forget & Gaillard* 1997). U svrhu poređenja specifičnosti POD, aktivnosti POD sa svim testiranim supstratima su bile izražene kao i za Cat, i ispostavilo se da je najbolji supstrat za

POD iz oba tipa tkiva listova muškatile opet Q, dok je sa Cat peroksidazna aktivnost bila najniža.

Nakon dobijenih rezultata o različitim brzinama reakcija POD iz listova muškatile sa različitim fenolnim jedinjenjima kao elektron donorima, pokušano je da se razdvoje i identifikuju različite izoforme POD u zelenom i belom tkivu listova i da se ispita da li među njima postoji različita specifičnost prema supstratima. Nativnom elektroforezom (10% PAG) i bojenjem sa 4-hloro- α -naftolom vizuelizovane su samo dve izoforme, na samom početku gela za razdvajanje, obe intenzivnije u belom tkivu listova, slika 4.11A. Kako ovom tehnikom nije postignuta željeno razdvajanje izoformi POD, odrađeno je i nativno izoelektrofokusinganje u pH gradijentu 3-10 i jasno su detektovane četiri izoforme, prisutne u oba tipa tkiva listova, slika 4.11B. Bojenje pomoću 4-hloro- α -naftola nije ukazalo na razlike u aktivnosti pojedinačnih izoformi između belog i zelenog tkiva, ali je bojenje gvajakolom, pokazalo da izoforma sa pI 5.2 u zelenom tkivu ima veću aktivnost od izoforme sa istom pI vrednosti u belom tkivu, slika 4.11B, što odgovara spektrofotometrijski dobijenom rezultatu za aktivnost ukupnih POD izraženih po količini proteina, tabela 4.9.



Slika 4.11. Detekcija različitih izoformi POD u solubilnim ekstraktima zelenog (Z) i belog (B) tkiva listova biljaka *P. zonale* gajenih pod optimalnim svetlosnim uslovima. A) Izoforme POD razdvajane na nativnoj PAGE (10% PAG, bojenje 4-hloro- α -naftolom). B) Zimogram izoformi POD razdvajanih izoelektrofokusinganjem (pH gradijent 3-10). Sa leve strane je gel bojen pomoću gvajakola, a sa desne pomoću 4-hloro- α -naftola. Strelice upućuju na razdvojene izoforme (pI = 5.2, 6.8, 9.2 i 9.4). Za obe elektroforetske tehnike, ista količina proteina (40 μ g) je nanošena za svaku traku na gelu.

4.2.1.7. Aktivnosti enzima Asc-GSH ciklusa

Spektrofotometrijskim određivanjima je pokazano da su specifične aktivnosti APX, DHAR i GR iz frakcije rastvornih proteinskih ekstrakata bile skoro dva puta veće u belom nego u zelenom tkivu listova, dok su aktivnosti MDAR bile slične u oba tkiva, tabela 4.10. Daljim ispitivanjem, pokazano je da su aktivnosti po g svežeg tkiva membranskih izoformi APX (prvenstveno tAPX) bile veće u zelenom, u odnosu na belo tkivo listova biljaka *P. zonale* gajenih pod optimalnim svetlosnim uslovima, tabela 4.10. Zapravo, membranski vezane APX su činile oko 35% ukupnih APX u zelenom i oko 5% ukupnih APX u belom tkivu listova muškatile.

Tabela 4.10. Aktivnosti enzima Asc-GSH ciklusa u zelenom i belom tkivu listova biljaka *P. zonale* gajenih pod optimalnim osvetljenjem. Specifične enzimske aktivnosti su date u $U g^{-1}_{FW}$ i u $U mg^{-1}$ i predstavljaju srednje vrednosti \pm SE ($n = 30$ za sol, $n = 6$ za memAPX, MDAR, DHAR i GR). Prikazane su statistički značajne razlike između zelenog i belog tkiva prema Man-Vitnijevom U testu (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$). solAPX, solubilne izoforme APX; memAPX, membranske izoforme APX.

	solAPX	memAPX	MDAR	DHAR	GR
A_{FW} ($U g^{-1}_{FW}$)					
Zeleno tkivo	5.3 ± 0.3	2.77 ± 0.18	1.9 ± 0.4	3.8 ± 0.1	0.51 ± 0.05
Belo tkivo	11.8 ± 0.5 ***	0.67 ± 0.08 **	2.3 ± 0.1	5.8 ± 0.1 *	0.89 ± 0.15 *
Sp ($U mg^{-1}$)					
Zeleno tkivo	1.4 ± 0.1	b.r. ^a	0.28 ± 0.04	0.59 ± 0.02	0.08 ± 0.01
Belo tkivo	2.3 ± 0.1 ***	b.r. ^a	0.36 ± 0.03	0.92 ± 0.03 *	0.14 ± 0.02 *

b.r.^a, bez rezultata, jer nije bilo moguće izmeriti koncentraciju proteina u prisustvu 20 mM CHAPSO-a dostupnim sredstvima i hemikalijama, usled interferirajućih efekata detergenta.

4.2.1.8. APX: izoforme i distribucija

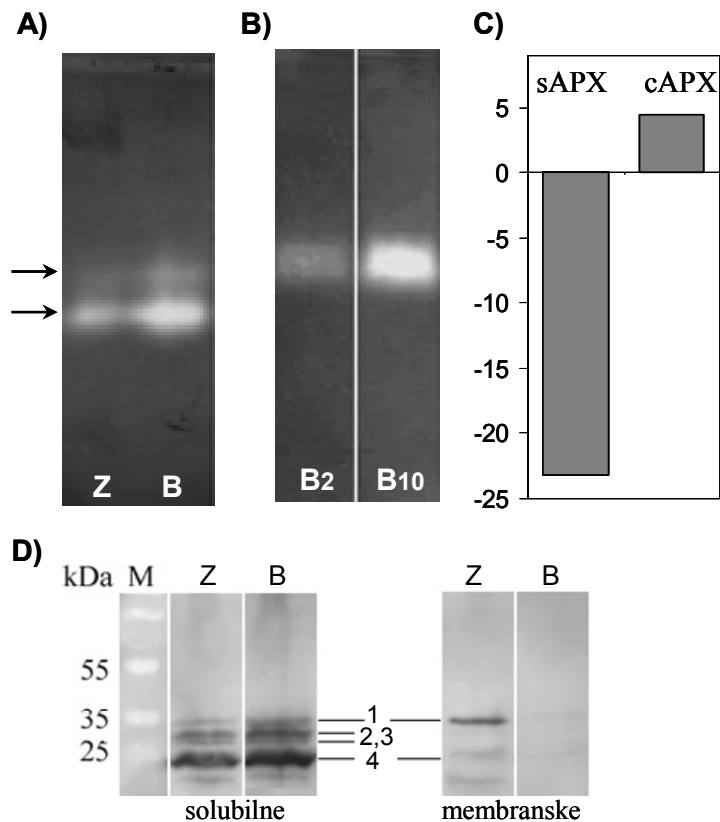
Nakon što je pokazana veća aktivnost solubilnih APX u belom, nego u zelenom tkivu listova *P. zonale*, i obrnuto, u zelenom tkivu aktivnost membranskih APX veća nego u belom, ispitivana je zastupljenost različitih izoformi ovog enzima u ova dva tipa tkiva.

Da bi se izdvojile različite izoforme APX iz frakcija koje sadrže solubilne i frakcija koje sadrže tilakoidnu izoformu APX, najpre je korišćena nativna PAGE. Prethodno je SDS-PAGE-om proverena efikasnost kojom su izolovane solubilne i tilakoidne frakcije oba tipa

tkiva listova, slika P2 u poglavlju Prilozi. U solubilnim frakcijama zelenog tkiva se uočavaju se dve glavne proteinske trake kojima odgovaraju mase od 52 i 15 kDa i koje predstavljaju veliku i malu podjedinicu Rubisco enzima (*Huang et al.* 2015). Ove trake su odsutne u belom tkivu, što implicira da je Rubisco zastupljen samo u zelenom tkivu listova panaširane muškatle. U membranskim (tilakoidnim) frakcijama zelenog tkiva uočavaju se trake koje bi po molekulskim masama odgovarale proteinskim subjedinicama PS II (oko 30-32 kDa), LHC II i LHC I (oko 20-27 kDa) i koje odgovaraju podjedinicama Rubisco, slika P2.

Nakon razdvajanja proteina nativnom PAGE, identifikovane su tri APX izoforme u solubilnoj frakciji i dve u membranskoj frakciji belog tkiva listova, slika 4.12A. U solubilnoj frakciji zelenog tkiva, uočavaju se dve slabe trake poreklom od APX, a samo jedna u membranskoj. Sve detektovane APX izoforme su bile intenzivnije u belom, u odnosu na zeleno tkivo listova muškatle, slika 4.12A. Nakon ovih rezultata, sa ciljem da se odgovori na pitanje da li se detektovane izoforme iz solubilne frakcije razlikuju po osetljivosti na prisustvo Asc, nativnom PAGE su razdvojene izoforme uzoraka koje su ekstrahovane iz belog tkiva listova u prisustvu 2 mM Asc i 10 mM Asc, slika 4.12B. Dobijeni rezultati nisu pokazali prisustvo izoformi različito osetljivih na koncentraciju Asc u medijumu. Zapravo, sve izoforme iz ekstrakta sa 2 mM Asc su bile podjednako smanjene aktivnosti u odnosu na one iz ekstrakta sa 10 mM Asc, slika 4.12B. Rezultati dobijeni analizom ekspresije gena cAPX i sAPX, slika 4.12C podržavaju prethodno dobijene rezultate, slika 4.12A. Pokazana je 23 puta veća ekspresija transkripta za sAPX u zelenom tkivu, i 4.4 puta veći nivo ekspresije cAPX u belom tkivu listova muškatle.

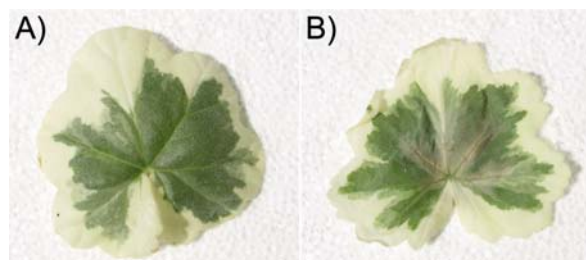
Konačno, identifikacija APX izoformi u belom i zelenom tkivu listova potvrđena je i imunoblot metodom (*Western blot*), pomoću poliklonskog antitela specifičnog za tAPX, sAPX, cAPX i pAPX izoforme, slika 4.12D. U belom tkivu, u solubilnim frakcijama uočene su četiri APX subjedinice, od kojih je najuočljivija ona kojoj odgovara Mm od 25 kDa, koja odgovara cAPX. U zelenom tkivu sve solubilne izoforme su bile manje zastupljene nego u belom, slika 4.12D. Što se membranske frakcije tiče, u belom tkivu nije uočena ni jedna izoforma, dok se u zelenom tkivu jasno uočava jedna proteinska traka na 36 kDa koja odgovara tAPX. Izoforme su identifikovane na osnovu smernica proizvođača antitela i rezultata prikazanih u *Miller* i saradnici (2007) i *Kangasjärvi* i saradnici (2008).



Slika 4.12. Detekcija različitih APX izoformi u zelenom (Z) i belom (B) tkivu listova biljaka *P. zonale* gajenih pod optimalnim svetlosnim uslovima. A) Solubilne APX izoforme belog i zelenog tkiva razdvojene nativnom PAGE, na gradijentnom gelu:10-15%. Strelice ukazuju na prisustvo dve APX izoforme. B) Elektroforegram (nativna PAGE, 10%) izoformi APX iz solubilne frakcije belog tkiva na kome je demonstrirana osetljivost APX izoformi u medijumu sa 2mM Asc (B₂) i 10 mM Asc (B₁₀) u sirovi ekstrakt. C) Ekspresija transkripata koji kodiraju sAPX i cAPX u belom u odnosu na zeleno tkivo listova. D) Detekcija različitih izoformi APX poliklonskim antitelom za sve APX izoforme: 1, tAPX; 2, sAPX; 3, mAPX ili pAPX; 4 cAPX. Za nativnu PAGE po 80 µg, a za Western blot po 10 µg ukupnih proteina je naneto u svaki bunar.

4.2.2. *Odgovor komponenti Asc-GSH ciklusa zelenog i belog tkiva listova biljaka P. zonale na povišen intenzitet sunčevog zračenja i tretman parakvatom*

U prethodnom odeljku (4.2.1) pokazane su razlike u konstitutivnim antioksidativnim profilima belog i zelenog tkiva listova muškatile. Sledeći korak u ovom eksperimentalnom delu teze bio je ispitivanje odgovora antioksidativnih komponenti oba tkiva, na stresore koji specifično dovode do nastanka ROS u fotosintezi i fotorespiraciji. Dakle, listovi biljaka *P. zonale* varijeteta „BF”, prethodno gajenih na $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, su izlagani intenzivnom sunčevom zračenju tokom vedrog letnjeg dana, kada je intenzitet PAR u podne iznosio oko $2000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, što prevazilazi intenzitet svetlosti na kom se postiže maksimalna (zasićujuća) vrednost asimilacije CO_2 u *P. zonale* (dokaz za ovo će biti prezentovan u odeljku 4.4.4). Ovako visok intenzitet PAR izaziva povišen ekscitacioni pritisak na PS II i fotosintetski ETL, pa dolazi do pojačanog protoka elektrona u Melerovu reakciju, odnosno do pojačanog stvaranja ROS na PS I (pre svega $\text{O}_2^{\cdot-}$ koji se pomoću SOD pretvara u H_2O_2 , slika 2.9 i 2.16; odeljak 2.5.1). Do stimulacije Melerove reakcije dolazi i dejstvom Pq u prisustvu svetlosti (pododeljak 2.3.2.1). Takođe, u ovom delu je razmatrana je i potencijalna komunikacija belog i zelenog tkiva i njihovig antioksidativnih sistema.



Slika 4.13. Fotografije reprezentativnih listova biljaka *P. zonale* nakon devetočasovnog inkubiranja u: (A) vodi; (B) 100 mM parakvatu (Pq), pri intenzivnom sunčevom zračenju. Oštećujući efekti Pq na zelenim segmentima (fotoizbeljivanje hlorofila) su uočljivi u središnjem delu listova, u predelu oko centralne nervature.

Količina Pq, koju je svaki list usvojio tokom inkubacije u 100 mM rastvoru Pq, u trajanju od devet sati, pri intenzivnom sunčevom zračenju, izračunata je preko smanjenja zapremine rastvora i izražena na masu svežeg tkiva. Prosečne količine Pq u listovima u nmol po g svežeg tkiva su iznosile: 16.2 ± 1.6 ; 120.4 ± 7.0 ; 262.9 ± 20.9 nakon prvog, četvrtog i devetog sata tretmana, redom. Listovi koji nisu bili inkubirani u Pq izgledali su zdravo i posle 9 sati izlaganja sunčevom zračenju, slika 4.13A. Kod listova koji su usvajali Pq uočene su

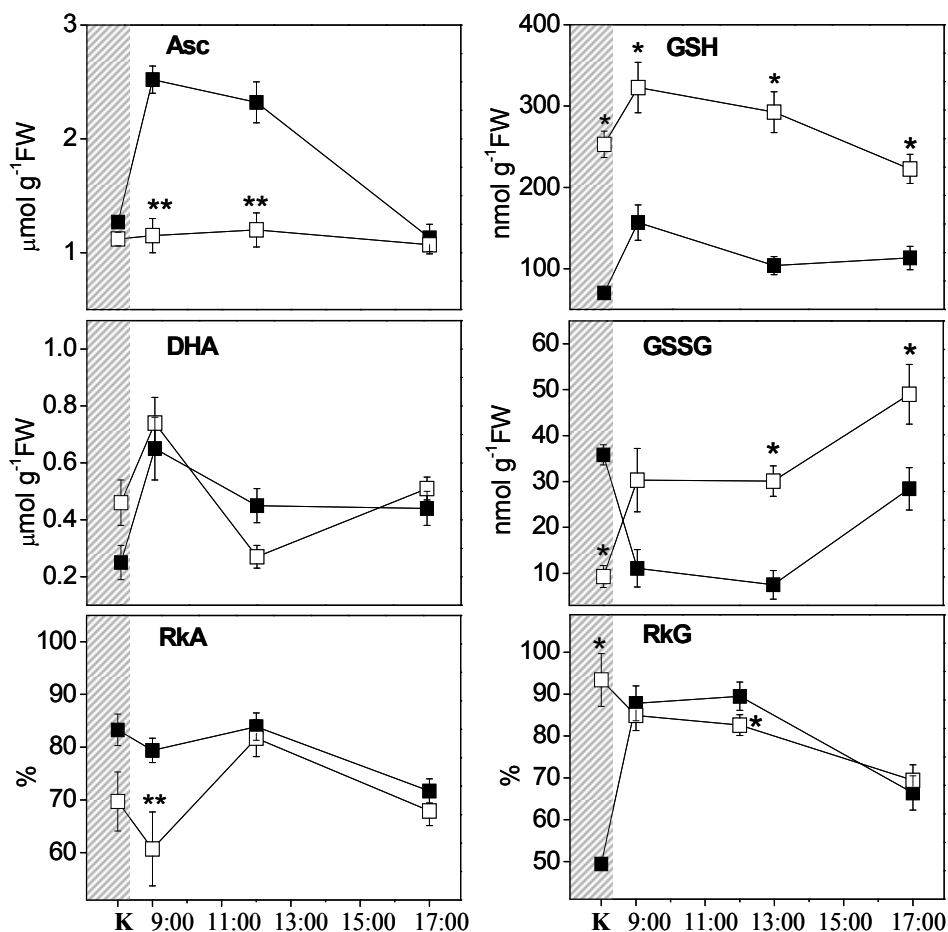
bledi, izbeljeni regioni oko glavne nervature, u centralnom delu zelenih segmenata, što je posledica fotoizbeljivanja hloroplasta, slika 4.13B.

4.2.2.1. Dinamika promena redoks-stanja Asc i GSH

- Devetočasovno izlaganje dnevnoj sunčevoj svetlosti

Kontrolnim listovima u ovom eksperimentu proglašeni su listovi odsečeni sa biljaka adaptiranih na mrak preko noći, dakle pre izlaganja biljaka svetlosti. Sadržaj Asc u belom i u zelenom tkivu kontrolnih listova je bio sličan, ali je redoks stanje Asc bilo veće u zelenom tkivu, slika 4.14. Jedan sat po izlaganju sunčevoj svetlosti, sadržaj Asc u zelenom tkivu se udvostručio, ne menjajući redoks-stanje u odnosu na isto tkivo kontrolnih listova, slika 4.14 i tabela 4.11. Tokom daljeg izlaganja sunčevoj svetlosti, nivo Asc u zelenom tkivu je opadao i nakon 9 sati se izjednačio sa kontrolnim. S druge strane, u belom tkivu, nivo Asc je bio nepromenjen tokom celokupnog vremena izlaganja sunčevoj svetlosti (u odnosu na kontrolu), čak je nakon četvrtog sata izlaganja redoks-stanje Asc blago poraslo, na račun smanjenog sadržaja DHA, slika 4.14 i tabela 4.11. Do podneva, redukovani Asc je bio značajno viši u zelenom u odnosu na belo tkivo, slika 4.14.

U kontrolnim uzorcima, belo tkivo je sadržalo 3.5 puta više GSH i imalo dva puta veći redoks-koeficijent GSH u odnosu na zeleno tkivo, slika 4.13. Međutim, već nakon prvog sata izlaganja suncu, sadržaj GSH u zelenom tkivu se udvostručio i bio je praćena trostrukim padom sadržaja GSSG, što je finalno rezultiralo oporavkom redoks-stanja GSH u zelenom tkivu (u odnosu na kontrolu). Sličan trend promene sadržaja GSH je primećen i u belom tkivu po osvetljavanju, dok je sadržaj GSSG rastao tokom vremena, rezultirajući postepenim padom redoks stanja GSH u odnosu na kontrolne uzorke, slika 4.14 i tabela 4.11. Tokom celodnevnog izlaganja suncu, belo tkivo listova muškatle je imalo viši sadržaj i GSH i GSSG, ali slično redoks-stanje GSH u odnosu na zeleno tkivo, slika 4.14.



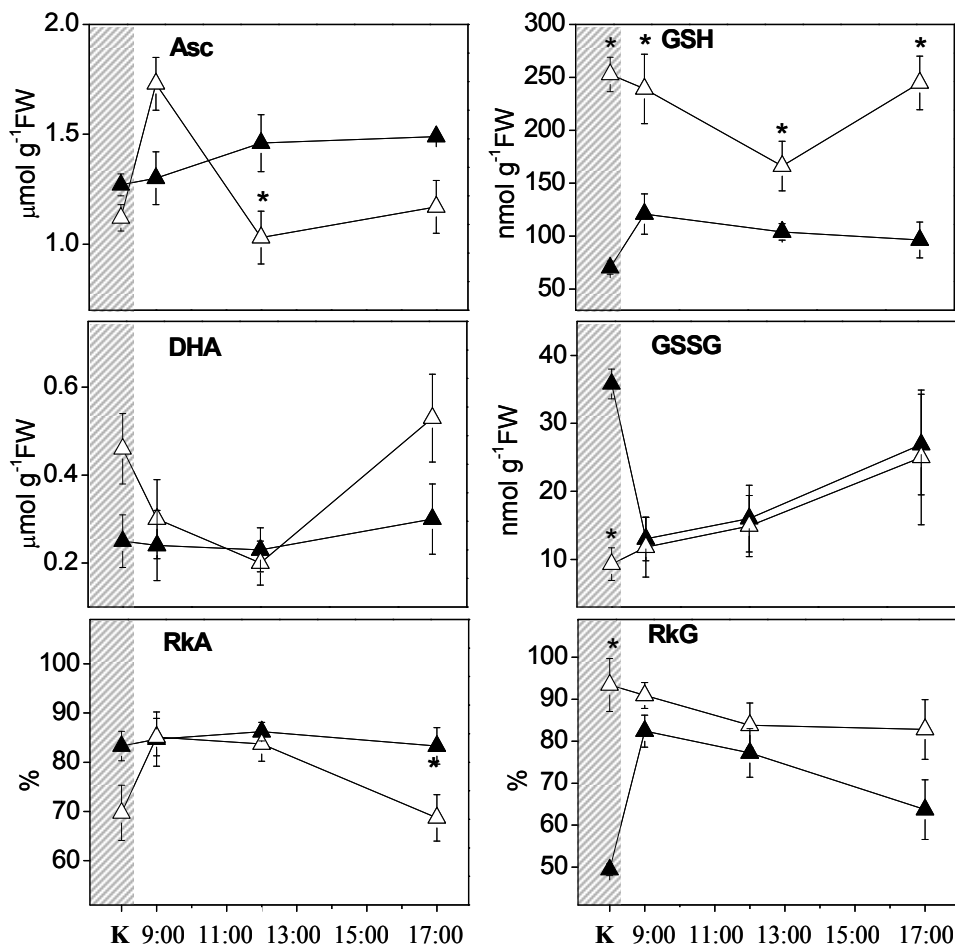
Slika. 4.14. Sadržaj askorbata i glutatationa u zelenom (crni kvadrati) i belom (beli kvadrati) tkivu listova *P. zonale* tokom devetočasovnog izlaganja dnevnom sunčevom zračenju. Sadržaj Asc i GSH je izražen u $\mu\text{mol g}^{-1}$ svežeg tkiva (FW), dok je sadržaj GSH i GSSG izražen u $\text{nmol g}^{-1}\text{FW}$. Prikazane su srednje vrednosti \pm SE ($n = 5$). Statistički značajne razlike prema Man-Vitnijevom U testu između zelenog i belog tkiva nakon prvog, četvrtog i devetog sata su prikazane (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$). Skraćenice i obrazac za izračunavanje redoks-koeficijenta Asc i GSH su prikazani u tabeli 4.7. K, kontrolni uzorci, listovi odsečeni sa biljaka adaptiranih na mrak preko noći.

Tabela 4.11. Prikaz *P*-vrednosti koje se odnose na statistički značajne razlike sadržaja Asc i GSH i njihova redoks-stanja između kontrole, prvog, četvrtog i devetog sata izlaganja *P. zonale* sunčevoj svetslosti prema Man-Vitnijevom U testu, posebno za zeleno i za belo tkivo ($P < 0.05$ je zadebljano). Skraćenice i račun za redoks-koeficijente Asc i GSH su objašnjeni u tabeli 4.7. K, kontrolni uzorci, listovi odsečeni sa biljaka adaptiranih na mrak preko noći.

Zeleno tkivo					Belo tkivo				
Asc	K	1	4	9	Asc	K	1	4	9
K		0.008	0.008	0.548	K		1.000	0.548	0.421
1	-		0.310	0.008	1	-		1.000	1.000
4	-	-		0.008	4	-	-		0.548
9	-	-	-		9	-	-	-	
DHA	K	1	4	9	DHA	K	1	4	9
K		0.008	0.095	0.095	K		0.056	0.222	1.000
1	-		0.310	0.310	1	-		0.008	0.032
4	-	-		1.000	4	-	-		0.008
9	-	-	-		9	-	-	-	
RkA	K	1	4	9	RkA	K	1	4	9
K		0.548	0.841	0.016	K		0.310	0.310	0.548
1	-		0.548	0.095	1	-		0.008	0.548
4	-	-		0.032	4	-	-		0.032
9	-	-	-		9	-	-	-	
GSH	K	1	4	9	GSH	K	1	4	9
K		0.029	0.029	0.057	K		0.200	0.029	0.343
1	-		0.029	0.200	1	-		0.029	0.057
4	-	-		0.029	4	-	-		0.029
9	-	-	-		9	-	-	-	
GSSG	K	1	4	9	GSSG	K	1	4	9
K		0.029	0.029	0.486	K		0.029	0.029	0.029
1	-		0.486	0.057	1	-		1.000	0.114
4	-	-		0.029	4	-	-		0.029
9	-	-	-		9	-	-	-	
RkG	K	1	4	9	RkG	K	1	4	9
K		0.029	0.029	0.029	K		0.029	0.029	0.029
1	-		0.200	0.057	1	-		0.029	0.029
4	-	-		0.029	4	-	-		0.343
9	-	-	-		9	-	-	-	

- Devetočasovno izlaganje dnevnoj sunčevoj svetlosti i 100 mM Pq

Sadržaj Asc u zelenom tkivu je sporo i postepeno rastao tokom devet sati inkubiranja sa Pq (statistički značajna razlika je dobijena tek nakon devetog sata), dok se sadržaj DHA i redoks-stanje Asc nisu značajno menjali u odnosu na kontrolne uzorke, slika 4.15 i tabela 4.12. S druge strane, u belom tkivu nakon prvog sata inkubiranja došlo je do značajnog porasta sadržaja Asc, dovodeći do porasta redoks-stanja Asc u poređenju sa odgovarajućom kontrolom, tabela 4.12. Nadalje, redoks-koeficijent Asc u belom tkivu listova je opadao do nivoa iz kontrolnih uzoraka. Po završetku inkubacije zeleno tkivo je imalo značajno više redoks-stanje Asc u odnosu na belo tkivo listova muškatile, slika 4.15.



Slika. 4.15. Sadržaj askorbata i glutatationa u zelenom (crni trouglovi) i belom (beli trouglovi) tkivu listova *P. zonale* tokom devetočasovnog inkubiranja sa 100 mM Pq na dnevnom svetlu. Sadržaj Asc i GSH je izražen u μmol po g svežeg tkiva (g^{-1}FW), a sadržaj GSH i GSSG u $\text{nmol g}^{-1}\text{FW}$. Prikazane su srednje vrednosti \pm SE ($n = 4$). Statistički značajne razlike između zelenog i belog tkiva nakon prvog, četvrtog i devetog sata prema Man-Vitnijevom U testu su prikazane (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$).

Tabela 4.12. Prikaz *P*-vrednosti, koje se odnose na statistički značajne razlike sadržaja Asc i GSH i njihovih redoks-stanja između kontrole, prvog, četvrtog i devetog sata inkubiranja listova *P. zonale* u 100 mM Pq, prema Man-Vitnijevom U testu, posebno za zeleno i za belo tkivo ($P < 0.05$ je zadebljano). Skraćenice i račun za redoks-koeficijente Asc i GSH su objašnjeni u tabeli 4.6. K, kontrolni uzorci, listovi odsečeni sa biljaka adaptiranih na mrak preko noći.

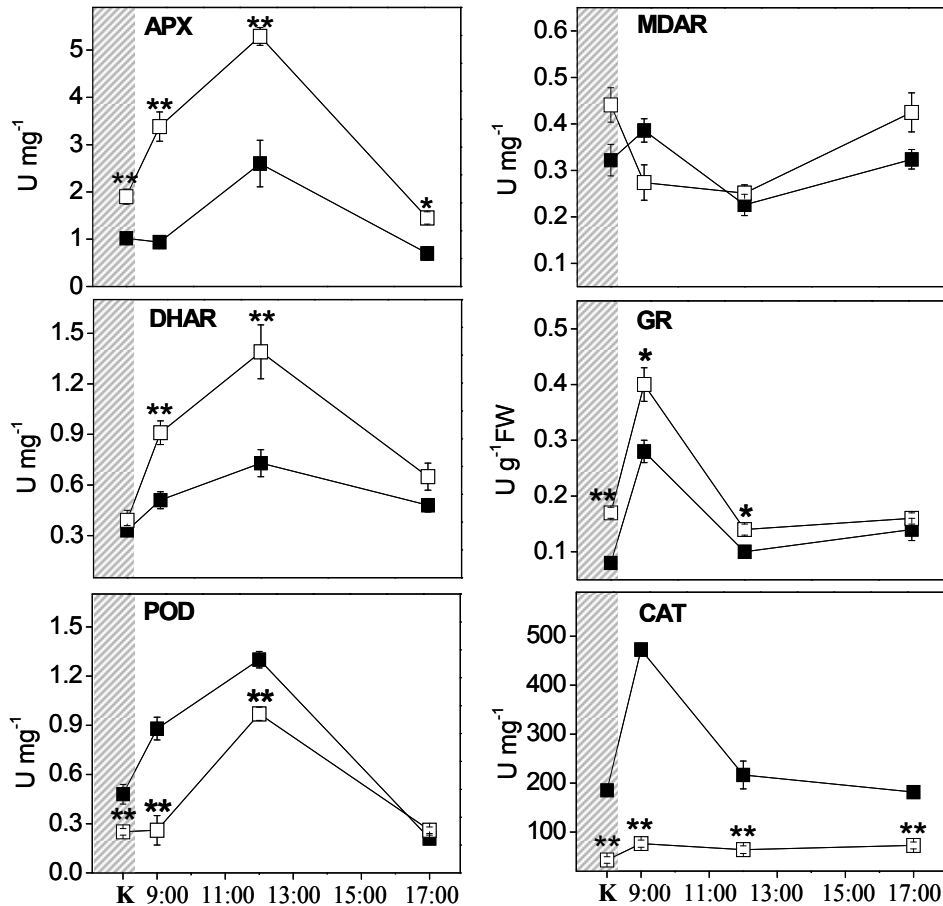
Zeleno tkivo					Belo tkivo				
Asc	K	1	4	9	Asc	K	1	4	9
K	-	1.000	0.151	0.008	K	-	0.008	0.548	1.000
1	-	-	0.548	0.690	1	-	-	0.008	0.032
4	-	-	-	1.000	4	-	-	-	0.548
9	-	-	-	-	9	-	-	-	-
DHA	K	1	4	9	DHA	K	1	4	9
K	-	1.000	0.841	0.690	K	-	0.222	0.056	0.690
1	-	-	1.000	0.690	1	-	-	0.421	0.151
4	-	-	-	0.548	4	-	-	-	0.016
9	-	-	-	-	9	-	-	-	-
RkA	K	1	4	9	RkA	K	1	4	9
K	-	1.000	0.310	1.000	K	-	0.095	0.032	1.000
1	-	-	0.841	1.000	1	-	-	1.000	0.056
4	-	-	-	0.548	4	-	-	-	0.095
9	-	-	-	-	9	-	-	-	-
GSH	K	1	4	9	GSH	K	1	4	9
K	-	0.029	0.029	0.486	K	-	1.000	0.029	1.000
1	-	-	0.343	0.343	1	-	-	0.029	1.000
4	-	-	-	0.057	4	-	-	-	0.029
9	-	-	-	-	9	-	-	-	-
GSSG	K	1	4	9	GSSG	K	1	4	9
K	-	0.029	0.029	0.686	K	-	1.000	0.486	0.343
1	-	-	1.000	0.200	1	-	-	0.486	0.486
4	-	-	-	0.114	4	-	-	-	0.686
9	-	-	-	-	9	-	-	-	-
RkG	K	1	4	9	RkG	K	1	4	9
K	-	0.029	0.029	0.686	K	-	0.686	0.057	0.486
1	-	-	1.000	0.200	1	-	-	0.343	0.486
4	-	-	-	0.114	4	-	-	-	0.486
9	-	-	-	-	9	-	-	-	-

U zelenom tkivu listova muškatile inkubiranih sa Pq, sadržaj GSH je porastao, a sadržaj GSSG opao, odmah nakon prvog sata, što je rezultiralo značajnim porastom redoks-stanja GSH u odnosu na kontrolne uzorke, slika 4.15 i tabela 4.12. Visoko redoks-stanje GSH u zelenom tkivu se održalo i nakon četiri sata inkubiranja, nakon čega je počelo da opada. U belom tkivu listova sadržaj GSH je značajno opao u podne, u poređenju sa kontrolnim uzorcima, slika 4.15 i tabela 4.12. Tokom celog perioda inkubiranja belo tkivo je zadržalo veći sadržaj GSH u odnosu na zeleno.

4.2.2.2. Dinamika promena aktivnosti enzima Asc-GSH ciklusa

- Devetočasovno izlaganje dnevnoj sunčevoj svetlosti

Specifične aktivnosti svih enzima Asc-GSH ciklusa, sem DHAR, su bile veće u belom u poređenju sa zelenim tkivom listova biljaka *P. zonale* adaptiranih na mrak, slika 4.16. Obrnuto, aktivnosti CAT i POD su bile veće u zelenom u poređenju sa belim tkivom listova biljaka *P. zonale* adaptiranih na mrak.



Slika. 4.16. Specifične aktivnosti (Sp, U mg⁻¹) antioksidativnih enzima u zelenom (crni kvadrati) i belom (beli kvadrati) tkivu listova *P. zonale* tokom devetočasovnog izlaganja dnevnom sunčevom zračenju. Prikazane su srednje vrednosti ± SE (n = 5). Statistički značajne razlike između zelenog i belog tkiva nakon prvog, četvrtog i devetog sata prema Man-Vitnijevom U testu su prikazane (**P* < 0.05, ***P* < 0.01, ****P* < 0.001).

Tabela 4.13. Prikaz *P*-vrednosti koje se odnose na statistički značajne razlike u specifičnim aktivnostima antioksidativnih enzima između kontrole, prvog, četvrtog i devetog sata izlaganja sunčevoj svetslosti prema Man-Vitnijevom U testu, posebno za zeleno i za belo tkivo ($P < 0.05$ je zadržano). K, kontrolni uzorci, listovi odsečeni sa biljaka adaptiranih na mrak preko noći.

Zeleno tkivo					Belo tkivo				
APX	K	1	4	9	APX	K	1	4	9
K		0.548	0.160	0.095	K		0.008	0.008	0.548
1	-		0.016	0.222	1	-		0.008	0.008
4	-	-		0.008	4	-	-		0.008
9	-	-	-		9	-	-	-	
MDAR	K	1	4	9	MDAR	K	1	4	9
K		0.095	0.032	0.841	K		0.016	0.008	0.690
1	-		0.008	0.421	1	-		0.548	0.032
4	-	-		0.098	4	-	-		0.008
9	-	-	-		9	-	-	-	
DHAR	K	1	4	9	DHAR	K	1	4	9
K		0.032	0.008	0.032	K		0.008	0.008	0.016
1	-		0.056	0.690	1	-		0.016	0.056
4	-	-		0.056	4	-	-		0.016
9	-	-	-		9	-	-	-	
GR	K	1	4	9	GR	K	1	4	9
K		0.008	0.095	0.016	K		0.008	0.056	0.690
1	-		0.008	0.008	1	-		0.008	0.008
4	-	-		0.095	4	-	-		0.421
9	-	-	-		9	-	-	-	
POD	K	1	4	9	POD	K	1	4	9
K		0.008	0.421	1.000	K		0.032	0.056	0.056
1	-		0.008	0.008	1	-		0.222	1.000
4	-	-		0.421	4	-	-		0.421
9	-	-	-		9	-	-	-	
CAT	K	1	4	9	CAT	K	1	4	9
K		0.008	0.008	0.008	K		0.548	0.008	1.000
1	-		0.008	0.008	1	-		0.008	1.000
4	-	-		0.008	4	-	-		0.008
9	-	-	-		9	-	-	-	

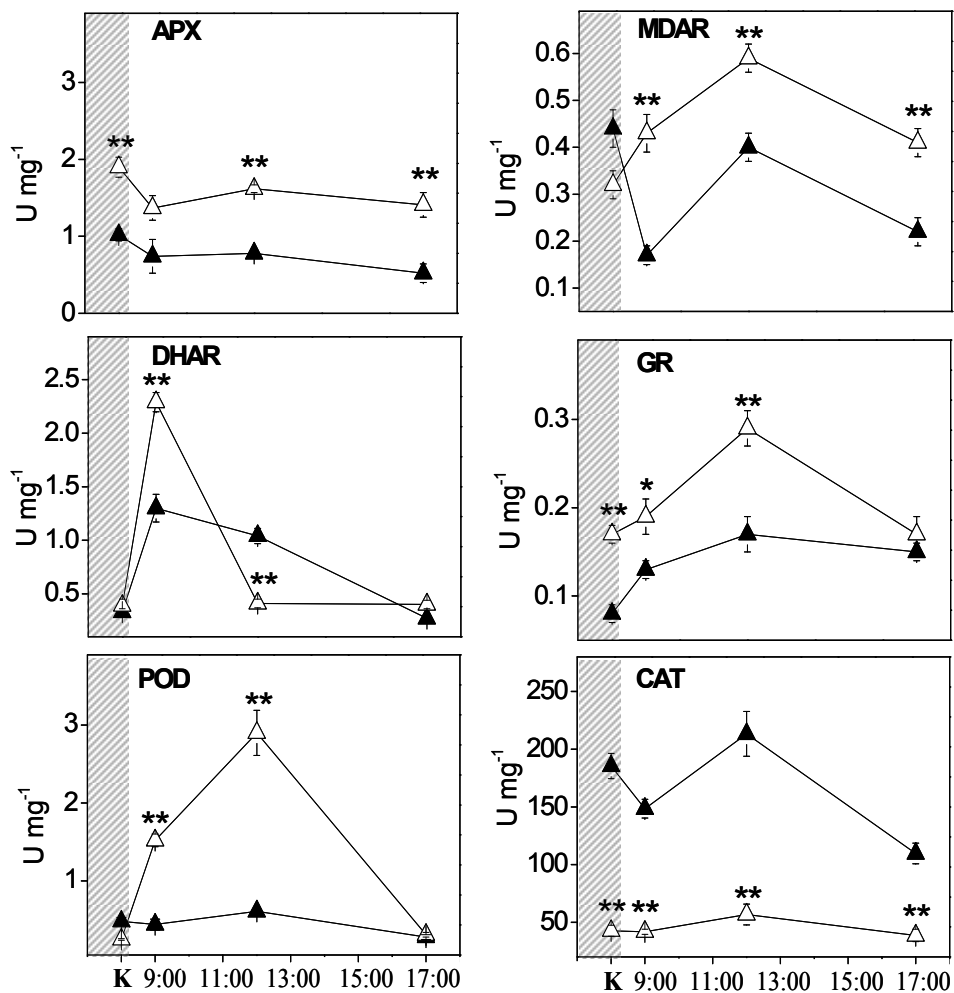
Naglo premeštanje listova iz mraka na svetlo je uzrokovalo brzi rast APX, DHAR i GR u belom i DHAR, GR, POD i CAT u zelenom tkivu listova, slika 4.16 i tabela 4.13. Aktivnost solubilnih APX u belom tkivu je počela da raste odmah nakon prvog sata, da bi dostigla maksimum nakon četvrtog sata izlaganja suncu, u podne kada je PAR bio najveći, dok je u zelenom „kasnila“, odnosno povećana aktivnost je detektovana tek posle četiri sata izlaganja. Dinamika promene aktivnosti DHAR u belom tkivu je imala isti trend, kao i APX,

dok je u zelenom maksimalna aktivnosti ovog enzima zabeležena u podne, kao i u slučaju APX, slika 4.16 i tabela 4.13. Specifične aktivnosti CAT i GR u zelenom tkivu su se utrostručile već nakon prvog sata izlaganja sunčevoj svetlosti, u poređenju sa kontrolnim uzorcima. Peroksidaze III klase su u oba tkiva imale sličnu dinamiku promena, sa postizanjem maksimuma u četvrtom satu izlaganja, slika 4.16. Jedino je MDAR u belom tkivu opadala nakon prvog sata izlaganja svetlosti. Ukratko, glavne promene aktivnosti antioksidativnih enzima u belom tkivu, u poređenju sa kontrolnim uzorcima, odnosile su se na pojačavanje aktivnosti APX, DHAR i GR u prvom, i postizanje maksimalnih aktivnosti APX, DHAR i POD u četvrtom satu, a u zelenom tkivu na brzi odgovor GR, CAT, POD i DHAR i dostizanje maksimalne aktivnosti APX, DHAR i POD nakon četiri sata izlaganja intenzivnom sunčevom zračenju, slika 4.15 i tabela 4.13.

- Devetočasovno izlaganje dnevnoj sunčevoj svetlosti i 100 mM Pq

Tretman 100 mM Pq nije imao tako izražene efekte na aktivnost antioksidativnih enzima kao samo izlaganje sunčevom zračenju. Aktivnost APX u oba tkiva se nije menjala tokom tretmana, u odnosu na kontrolu, ali je uvek bila veća u belom nego u zelenom tkivu, slika 4.17. i tabela 4.14.

Interesantan je bio porast DHAR aktivnosti u oba, a posebno u belom tkivu (5×) već nakon prvog sata inkubiranja. Takođe, aktivnosti MDAR, GR i POD su postepeno rasle tokom prvih četiri sata tretmana u belom tkivu listova, slika 4.17. Za razliku od izlaganja sunčevom zračenju, POD aktivnost je u ovom tretmanu bila generalno veća u belom u odnosu na zeleno tkivo. Na kraju tretmana, aktivnosti svih enzima su bile ili na istom ili nižem nivou kao u kontrolnim uzorcima, slika 4.17.



Slika. 4.17. Specifične aktivnosti (Sp, U mg⁻¹) antioksidativnih enzima u zelenom (crni trouglovi) i belom (beli trouglovi) tkivu listova *P. zonale* tokom devetočasovnog inkubiranja listova u 100 mM Pq. Prikazane su srednje vrednosti ± SE (n = 5). Statistički značajne razlike između zelenog i belog tkiva nakon prvog, četvrtog i devetog sata prema Man-Vitnijevom U testu su prikazane (**P* < 0.05, ***P* < 0.01, ****P* < 0.001).

Tabela 4.14. Prikaz *P*-vrednosti koje se odnose na statistički značajne razlike u specifičnim aktivnostima antioksidativnih enzima između kontrole, prvog, četvrtog i devetog sata inkubiranja listova u 100 mM Pq prema Man-Vitnijevom U testu, posebno za zeleno i za belo tkivo (*P*<0.05 je zadebljano). K, kontrolni uzorci, listovi odsečeni sa biljaka adaptiranih na mrak preko noći.

Zeleno tkivo					Belo tkivo				
APX	K	1	4	9	APX	K	1	4	9
K		0.310	0.016	0.008	K		0.032	0.151	0.056
1	-		0.690	0.548	1	-		0.151	0.841
4	-	-		0.095	4	-	-		0.421
9	-	-	-		9	-	-	-	
MDAR	K	1	4	9	MDAR	K	1	4	9
K		0.008	0.151	0.008	K		0.841	0.032	0.690
1	-		0.008	0.222	1	-		0.032	1.000
4	-	-		0.008	4	-	-		0.016
9	-	-	-		9	-	-	-	
DHAR	K	1	4	9	DHAR	K	1	4	9
K		0.008	0.008	0.222	K		0.008	1.000	0.841
1	-		0.222	0.008	1	-		0.008	0.008
4	-	-		0.008	4	-	-		0.841
9	-	-	-		9	-	-	-	
GR	K	1	4	9	GR	K	1	4	9
K		0.016	0.008	0.008	K		0.690	0.008	0.548
1	-		0.095	0.548	1	-		0.032	0.222
4	-	-		0.222	4	-	-		0.008
9	-	-	-		9	-	-	-	
POD	K	1	4	9	POD	K	1	4	9
K		0.032	0.310	0.008	K		0.008	0.008	0.421
1	-		0.056	0.032	1	-		0.008	0.008
4	-	-		0.008	4	-	-		0.008
9	-	-	-		9	-	-	-	
CAT	K	1	4	9	CAT	K	1	4	9
K		0.690	0.032	0.032	K		0.548	0.095	0.548
1	-		0.151	0.056	1	-		0.548	0.690
4	-	-		0.008	4	-	-		0.222
9	-	-	-		9	-	-	-	

4.3. Izlaganje biljaka *P. coleoides* visokom intenzitetu PAR-a i ambijentalnim dozama UV-B zračenja

Treći deo eksperimentalnog rada obuhvatao je proučavanje odgovora fotosinteze, antioksidativnog i fenolnog metabolizma panaširanih listova tamjanike pod simuliranim uslovima solarnog zračenja tokom prolećnih sunčanih dana (u smislu intenziteta PAR-a i UV-B zračenja). Fokus je bio usmeren i na ispitivanje razlika u odgovorima belih i zelenih ćelija listova biljaka *P. coleoides* na primenjeno UV-B zračenje (0.90 W m^{-2}) pri različitim intenzitetima pozadinskog osvetljenja: $395 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ PAR (LL) i $1350 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ PAR (HL) tokom deset dana.

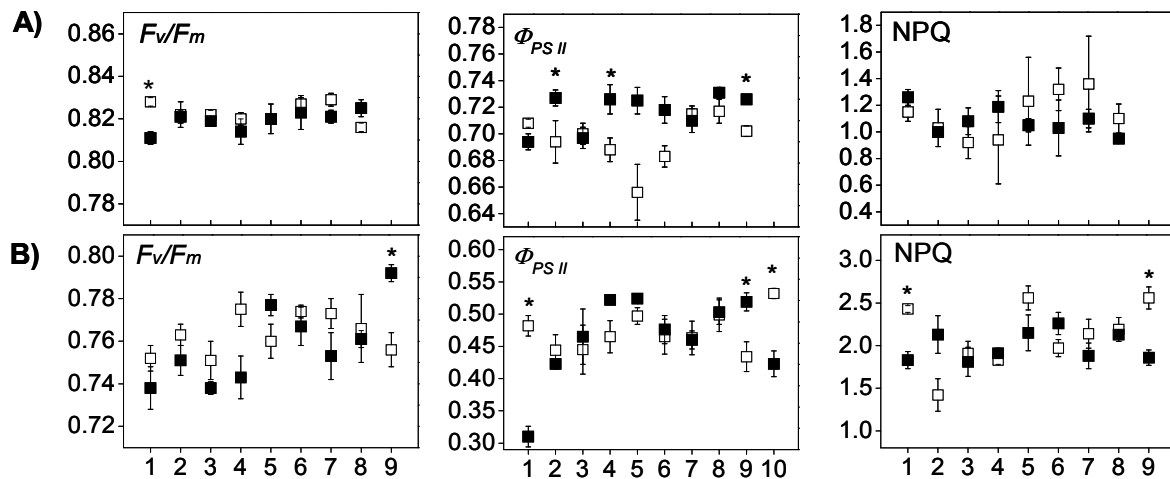
4.3.1. *Odgovor fotosinteze listova P. coleoides na visok intenzitet PAR-a i ambijentalne doze UV-B zračenja*

4.3.1.1. Dinamika promene parametara fluorescencije *hl a*

Da bi se testirale funkcionalne sposobnosti fotosintetskog aparata biljaka *P. coleoides* tokom svakog dana izloženosti različitim režimima zračenja: LL, LL+UV-B, HL i HL+UV-B merene su fluorescencije *hl a* listova biljaka adaptiranih na mrak (preko noći) i na (aktinsko) svetlo. Maksimalni kvantni prinos PS II, odnosno F_v/F_m , je indikator redukcionog stanja primarnog elektronskog akceptora PS II, Q_A . Dobijeni rezultati ukazuju da na LL, UV-B zračenje nije izazvalo promene u kapacitetu elektronskog transfera, slika 4.18A. S druge strane, na HL, veće promene u vrednostima F_v/F_m odnosile su se na različite dane izlaganja nego na uticaj primenjenog UV-B zračenja. Značajna razlika u F_v/F_m je detektovana poslednjeg dana, kada je u biljkama sa HL tretmana, bez UV-B zračenja izmeren značajno niži kvantni prinos PS II u odnosu na HL+UV-B tretman, slika 4.18B. Vrednosti F_v/F_m biljaka izloženih većem pozadinskom osvetljenju bile su generalno niže od onih izlaganih manjem intenzitetu PAR-a, što upućuje na nižu efikasnost PS II, odnosno fotoinhibiciju u biljaka sa HL u odnosu na one sa LL, slika 4.18. Promene u radnoj efikasnosti PS II, $\Phi_{PS II}$, koja ukazuje na efikasnost linearnog elektronskog protoka kroz PS II, su bile veće između različitih dana tokom esperimenta, nego između UV-B tretiranih i UV-B netretiranih biljaka. U kombinaciji

sa LL, UV-B zračenje je izazvalo veći prinos linearnog elektronskog transporta drugog, četvrtog i devetog dana, slika 4.18A. Niža vrednosti $\Phi_{PS II}$ u listovima *P. coleoides* je izmerena pri jačem pozadinskom osvetljenju, kako je i bilo očekivano, slika 4.17.

Ne-fotohemijsko gašenje fluorescencije *hl a* (NPQ) je očekivano, bilo veće pri višem intenzitetu PAR-a u odnosu na niži, slika 4.18. Rezultati pokazuju i da UV-B nije uticalo na vrednosti NPQ pri LL, dok je pri HL, već nakon četiri sata, ali i nakon devet dana izlaganja UV-B zračenju, izmeren značajno niži NPQ, što se može dovesti u vezu sa smanjenjem prinosa linearnog transporta, slika 4.18.

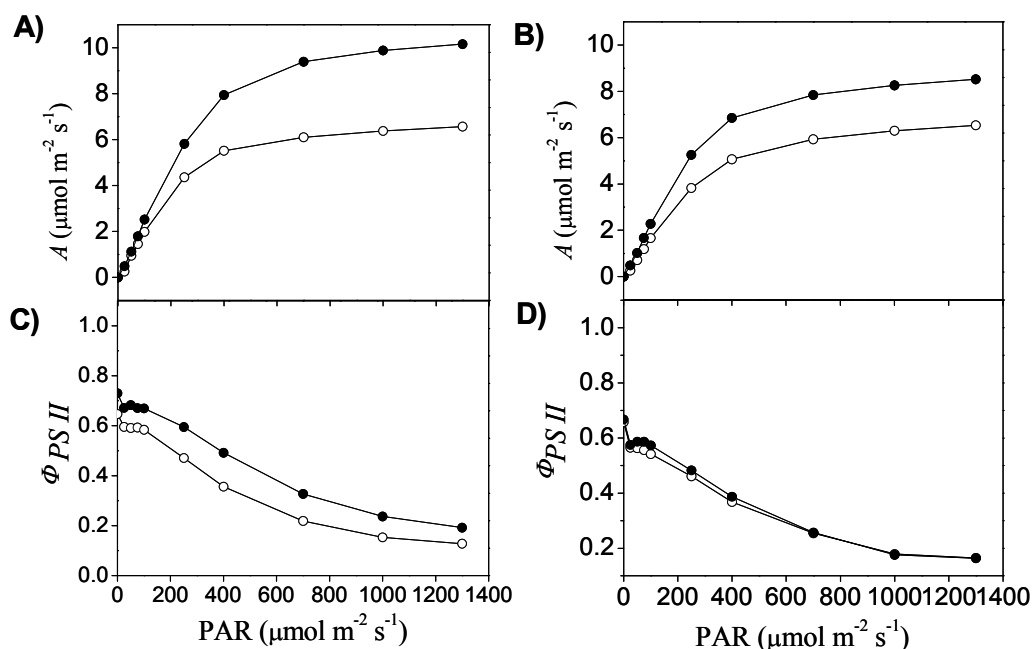


Slika 4.18. Dinamika promene fotosintetskih parametara u zelenim segmentima listova biljaka *P. coleoides* tokom deset dana izlaganja različitim režimima zračenja: A) $395 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PAR (LL, beli kvadrati) i LL+UV-B (UV-B: 0.90 W m^{-2} ; crni kvadrati) i B) $1350 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PAR (HL, beli kvadrati) i HL+UV-B (crni kvadrati). Predstavljene su srednje vrednosti \pm SE ($n \geq 4$). Značajne razlike između UV-B tretiranih i UV-B netretiranih biljaka na LL i na HL, prema Man-Vitnijevom U testu za svaki dan posebno su prikazane (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$). F_v/F_m , maksimalni kvantni prinos (fotohemije) PS II; $\Phi_{PS II}$, radna efikasnost PS II; NPQ, nefotohemijsko gašenje fluorescencije *hl a*.

4.3.1.2. Dinamika promene parametara izmene gasova

U cilju praćenja uticaja UV-B zračenja na efikasnosti asimilacije CO_2 i linearnog transporta elektrona, konstruisane su krive zavisnosti brzine asimilacije CO_2 (A) i fotohemijske efikasnosti PS II od postepeno pojačavanog intenziteta PAR-a, tzv. svetlosne krive, prvog i devetog dana tretmana na HL, slika 4.19. Sa porastom PAR, Rubisco se aktivira, čime raste A . Ovaj porast je u početku linearan, slika 4.19A i 4.19B. Nagib ovog

linearnog dela predstavlja maksimalni kvantni prinos fotosinteze, jer je fotosinteza ovde ograničena ETR-om. Sa daljim porastom PAR, fotosinteza počinje da zavisi od A i u jednom trenutku kriva dostiže zasićujući nivo (A_{max}), kada PAR više ne utiče na A , već ona zavisi od kapaciteta karboksilacije Rubisco i metabolizma TP, tj. brzine oksidacije NADPH i potrošnje ATP (Foyer et al. 2012).

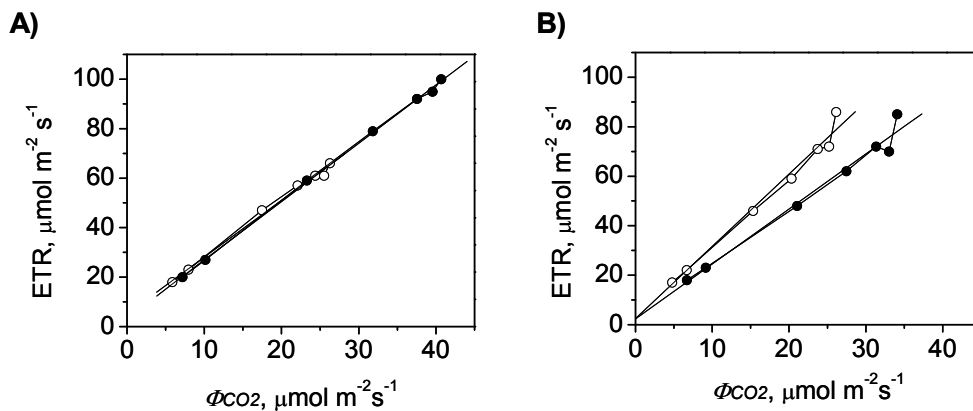


Slika 4.19. Asimilacija CO_2 (A) i radna efikasnost PS II (Φ_{PSII}) u funkciji od intenziteta PAR (25 do $1300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) u zelenim segmentima listova biljaka *P. coleoides* izlaganih sledećim režimima zračenja: $1350 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PAR (HL, beli krugovi, \circ) i HL+UV-B (UV-B: 0.90 W m^{-2} ; crni krugovi, \bullet) prvog (A, C) i devetog (B i D) dana izlaganja.

U slučaju biljaka *P. coleoides* praćene su vrednosti A i Φ_{PSII} pri postepenom povećanju intenziteta PAR-a od 25 do $1300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, po 5-10 minuta za svaku vrednost, kako bi Kalvinov ciklus postigao ustaljenu brzinu za datu vrednost intenziteta PAR-a. Pokazano je da UV-B zračenje u kombinaciji sa HL izaziva porast asimilacije CO_2 i to već nakon četiri sata i nakon devet dana tretmana, slika 4.19A i 4.19B. S druge strane, nakon devet dana izlaganja UV-B zračenju A_{max} je opala za oko 20%, u odnosu na biljke sa HL režima. Statistički značajne promene u zavisnosti Φ_{PSII} od intenziteta PAR-a pod dejstvom UV-B zračenja nisu uočene ni prvog, ni devetog dana izčaganja, slika 4.19C i 4.19D.

Ovakvi rezultati su podstakli dalja ispitivanja da li je bilo promena u efikasnosti linearnog elektronskog transporta u listovima *P. coleoides* pri visokom intenzitetu PAR-a, u

odnosu na izloženost UV-B zračenju. S tim ciljem konstruisan je grafik zavisnosti brzine elektroskog transporta PS II (ETR) od kvantnog prinosa asimilacije CO₂ (Φ_{CO_2}) za prvi i deveti dan eksperimenta, slika 4.20. U listovima biljaka *P. coleoides* izlaganim HL i HL+UV-B režimima zračenja je ustanovljena linearna zavisnost ETR od Φ_{CO_2} u opsegu od 75 to 1300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PAR. Prvog dana izlaganja nije uočena statistički relevantna različitost ETR = $f(\Phi_{CO_2})$ između UV-B tretiranih i UV-B netretiranih biljaka, slika 4.20A, dok je devetog dana konstanta proporcionalnosti bila viša kod biljaka sa HL (2.95) nego kod onih sa HL+UV-B režima (2.22), slika 4.20B. Ovakvi rezultati ukazuju da su nakon devet dana izlaganja UV-B zračenju, biljke bile efikasnije u asimilaciji CO₂, u odnosu na biljke koje prethodno nisu bile izložene UV-B zračenju.



Slika 4.20. Zavisnost brzine elektroskog transporta kroz PS II (ETR) od kvantnog prinosa asimilacije CO₂ (Φ_{CO_2}) u zelenim segmentima listova biljaka *P. coleoides* prvog (A) i devetog dana (B) eksperimenta. Biljke su izlagane sledećim režimima zračenja: HL (beli krugovi, ○) i HL+UV-B (crni krugovi, ●). Jednačine pravih: A) prvi dan eksperimenta: HL režim: $y = 2.29x + 5.15$ ($R^2 = 0.993$); HL+UV-B režim: $y = 2.35x + 3.33$ ($R^2 = 0.999$); B) deveti dan eksperimenta: za HL režim: $y = 2.95x + 1.82$ ($R^2 = 0.977$) i za HL+UV-B režim: $y = 2.22x + 2.35$ ($R^2 = 0.977$). Aktinsko svetlo je postepeno pojačavano od 75 do 1300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PAR.

Rezultati dobijeni za osnovne parametre asimilacije i transpiracije u zelenim segmentima listova biljaka *P. coleoides* prvog, četvrtog i desetog dana izlaganja različitim režimima zračenja prikazani su u tabeli 4.15, dok su vrednosti ostalih parametara dati u tabeli P1 u poglavlju Prilozi. UV-B zračenje je dovelo do značajnog porasta brzine asimilacije CO₂ u biljkama *P. coleoides* na LL, nakon samo četiri sata izlaganja, tabela 4.15. Takođe, povećana brzina asimilacije CO₂ je bila praćena trostrukim porastom provodljivosti stoma, g_s i

unutrašnjom koncentracijom CO₂ u listovima, c_i u poređenju sa biljkama sa LL bez UV-B zračenja.

Tabela 4.15. Efekat UV-B zračenja na fotosintetske parametre u zelenim segmentima listova biljaka *P. coleoides* izlaganih različitim režimima zračenja (1) 395 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PAR (LL); (2) LL+UV-B (UV-B: 0.90 W m^{-2}); (3) 1350 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PAR (HL) i (4) HL+UV-B tokom deset dana. Predstavljene su srednje vrednosti \pm SE ($n \geq 4$). Značajne razlike između UV-B tretiranih i UV-B netretiranih biljaka na LL i na HL, prema Man-Vitnijevom U testu su prikazane (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$). A : brzina asimilacije CO₂; g_s : provodljivost stoma; c_i : koncentracija CO₂ unutar lista; ETR: brzina elektronskog transporta kroz PS II.

Dani izlaganja	Fotosintetski parametri	Režimi zračenja			
		LL	LL+UV-B	HL	HL+UV-B
1. dan	A ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	4.5 \pm 0.4	8.6 \pm 0.3*	8.6 \pm 0.2	10.5 \pm 1.0
	g_s (mmol $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	43.4 \pm 6.0	136.1 \pm 15.3*	133.7 \pm 10.0	184.8 \pm 10.1*
	radna efikasnost PS II	0.58 \pm 0.01	0.62 \pm 0.01*	0.16 \pm 0.01	0.17 \pm 0.01
	c_i , ppm	200.7 \pm 26.3	271.3 \pm 9.8*	268.4 \pm 8.0	282.3 \pm 11.5
	ETR ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	60.9 \pm 1.0	65.3 \pm 1.3	88.0 \pm 4.6	94.5 \pm 4.4
4. dan	A ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	5.5 \pm 0.6	8.0 \pm 0.3**	12.0 \pm 0.6	10.4 \pm 1.3
	g_s (mmol $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	46.5 \pm 7.5	187.0 \pm 31.0*	191.5 \pm 10.3	184.5 \pm 25.0
	radna efikasnost PS II	0.59 \pm 0.01	0.62 \pm 0.01	0.17 \pm 0.01	0.17 \pm 0.01
	c_i , ppm	218.3 \pm 29.3	295.8 \pm 20.2	273.1 \pm 1.4	282.9 \pm 2.7
	ETR ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	62.0 \pm 1.5	65.0 \pm 0.5	91.2 \pm 6.4	93.9 \pm 1.4
10. dan	A ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	5.4 \pm 0.6	8.5 \pm 0.5*	11.8 \pm 0.7	13.6 \pm 1.5
	g_s (mmol $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	48.3 \pm 6.0	250.2 \pm 21.0*	169.2 \pm 7.1	243.5 \pm 26.8
	radna efikasnost PS II	0.58 \pm 0.02	0.62 \pm 0.01	0.21 \pm 0.01	0.21 \pm 0.02
	c_i , ppm	199.5 \pm 8.9	321.0 \pm 1.4*	263.0 \pm 3.6	283.3 \pm 2.1*
	ETR ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	60.6 \pm 2.1	65.2 \pm 0.5	112.8 \pm 4.9	115.4 \pm 8.2

Četvrtog i desetog dana biljke pod LL+UV-B su zadržale četiri puta veću g_s u odnosu na biljke pod LL, dok je stimulativni efekat UV-B zračenja na A i c_i bio manje izražen, u odnosu na prvi dan eksperimenta, tabela 4.15. Primena UV-B zračenja uz HL prvog dana je dovela do značajnog porasta g_s i blagog povećanja A , bez promena c_i u poređenju sa biljkama pod HL bez UV-B. Istovremeno merena radna efikasnost PS II je bila značajno povećana pod dejstvom UV-B zračenja samo prvog dana pri LL (tabela 4.15; za vrednosti statističke

značajnosti efekata UV-B zračenja, intenziteta PAR, različitih dana i njihovih međusobnih interakcija videti poglavlje Prilozi i tabelu P2).

4.3.1.3. Sadržaj fotosintetskih pigmenata

Primena UV-B zračenja nije značajno uticala na sadržaj fotosintetskih pigmenata, iako je uočen generalno opadajući trend, tabela 4.16. Međutim, blagi porast sadržaja zeaksantina i anteraksantina utvrđen je pri UV-B zračenju na HL (na LL su bili ispod limita detekcije). S druge strane, intenzitet PAR-a je imao značajan uticaj na sadržaj *hl a*, *hl b*, neoksantina i luteina (efekti „PAR” na sadržaj pigmenata prikazani su u tabeli P3, u poglavlju Prilozi).

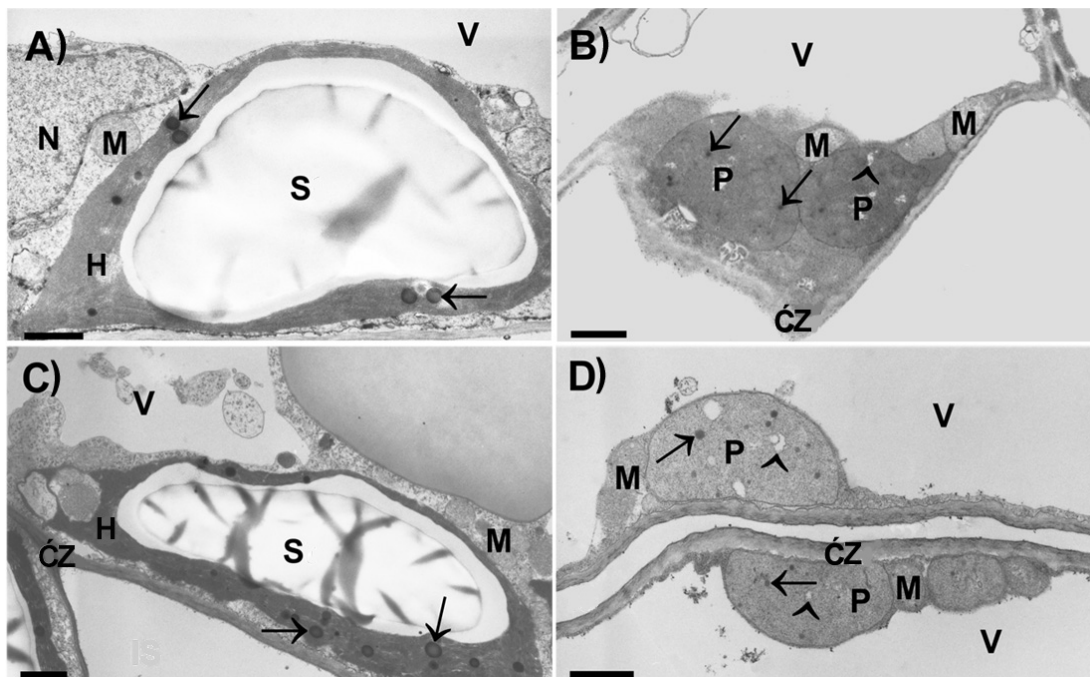
Tabela 4.16. Sadržaj hlorofila i karotenoida ($\mu\text{g g}^{-1}_{\text{FW}}$), maseni odnosi pigmenata i deepoksidacioni indeks u zelenim segmentima listova biljaka *P. coleoides* nakon deset dana izlaganja različitim režimima zračenja: LL, LL+UV-B, HL i HL+UV-B. Predstavljene su srednje vrednosti \pm SE ($n \geq 4$). Različita slova označavaju statistički značajne razlike ($P < 0.05$) u sadržaju određivanih pigmenata i njihovih odnosa između različitih režima zračenja i različitih tipova tkiva.

Sadržaj pigmenata	Režimi zračenja			
	LL	LL+UV-B	HL	HL+UV-B
Hlorofil <i>a</i>	503.8 \pm 51.1 ^a	439.3 \pm 20.5 ^{ab}	335.4 \pm 11.5 ^{bc}	277.6 \pm 20.3 ^c
Hlorofil <i>b</i>	139.7 \pm 12.8 ^a	116.4 \pm 4.8 ^{ab}	90.4 \pm 2.5 ^{bc}	74.5 \pm 5.8 ^c
Hlorofil (<i>a+b</i>)	643.5 \pm 63.8 ^a	555.7 \pm 25.0 ^{ab}	425.8 \pm 14.0 ^{bc}	352.0 \pm 26.0 ^c
β -karoten (K)	27.0 \pm 5.9 ^a	23.2 \pm 3.3 ^a	20.8 \pm 1.1 ^a	16.0 \pm 1.3 ^a
Lutein (L)	47.7 \pm 3.7 ^a	40.5 \pm 1.8 ^{ab}	37.8 \pm 0.2 ^{ab}	31.5 \pm 2.5 ^b
Neoksantin (N)	24.0 \pm 2.1 ^a	20.5 \pm 0.9 ^{ab}	17.4 \pm 0.2 ^b	14.8 \pm 1.1 ^b
Violaksantin (V)	29.8 \pm 3.3 ^a	26.0 \pm 2.8 ^{ab}	24.3 \pm 3.5 ^{ab}	16.5 \pm 1.1 ^b
Anteraksantin (A)	n.d.	n.d.	5.7 \pm 1.2	7.6 \pm 0.7
Zeaksantin (Z)	n.d.	n.d.	6.3 \pm 2.2	9.0 \pm 0.6
V + A + Z	29.8 \pm 3.3 ^a	26.0 \pm 2.8 ^a	36.4 \pm 2.0 ^a	33.1 \pm 2.1 ^a
<u>Odnosi pigmenata</u>				
Hlorofil <i>a/b</i>	3.6 \pm 0.1 ^a	3.8 \pm 0.1 ^a	3.7 \pm 0.03 ^a	3.7 \pm 0.1 ^a
Hlorofil (<i>a+b</i>)/ Σ kar ¹	5.0 \pm 0.1 ^a	5.1 \pm 0.2 ^a	3.8 \pm 0.1 ^b	3.7 \pm 0.03 ^b
Di, % ²	-	-	25.2 \pm 7.2	38.6 \pm 1.3

¹ Σ kar: ukupni karotenoidi: (N+L+V+A+Z+ β -karoten); ² Deepoksidacioni indeks Di = 100% \times (0.5 \times A+Z)/(V+A+Z). n.d.: nije detektovano (ispod praga detekcije).

4.3.1.4. Promene u ultrastrukтури plastida

Rezultati dobijeni pomoću TEM pokazuju da zeleno i belo tkivo listova biljaka *P. coleoides* imaju različitu unutarplastidnu organizaciju. Unutar zelenog tkiva, nalaze se razvijeni hloroplasti sa dobro organizovanim tilakoidnim sistemom, gde se uočavaju razdvojeni tilakoidni grana (poput zelenog tkiva listova biljaka *P. zonale* „BF”, pododeljak 4.2.1.3), plastoglobule i velike granule skroba, slika 4.21A i 4.21C. Suprotno, albino plastidi belog tkiva ne poseduju tilakoidne membrane niti granule skroba, slika 4.21B i 4.21D. Poput belih segmenata listova biljaka *P. zonale* „BF” ovi plastidi u solubilnom unutrašnjem regionu akumuliraju brojne vezikule različitih veličina i oblika, ali za razliku od albino plastida u „BF” biljkama, oni akumuliraju i brojne, sitnije plastoglobule.



Slika 4.21. Transmisiona elektronska mikrografija na kojoj je prikazana ultrastruktura ćelija zelenih (A,C) i belih (B,D) segmenata listova biljaka *P. coleoides* nakon desetodnevnog izlaganja sledećim režimima zračenja: HL (A,B) i HL+UV-B (C, D). Na mikrografijama zelenih segmenata upečatljivi su hloroplasti (H) sa velikim skrobnim granulama (S) i brojni plastoglobuli (strelice). Plastidi belih segmenata sadrže brojne plastoglobule (strelice) i vezikule (vrh strelice), ali ne skrobne granule. ČZ, ćelijski zid; M, mitohondrije; N, nukleus; V, vakuola. Skala predstavlja 1 μm .

Iz pomenutih razloga, nadalje je analiziran efekat UV-B zračenja na unutarplastidnu organizaciju samo zelenih segmenata listova u kombinaciji sa HL, tabela 4.17. U

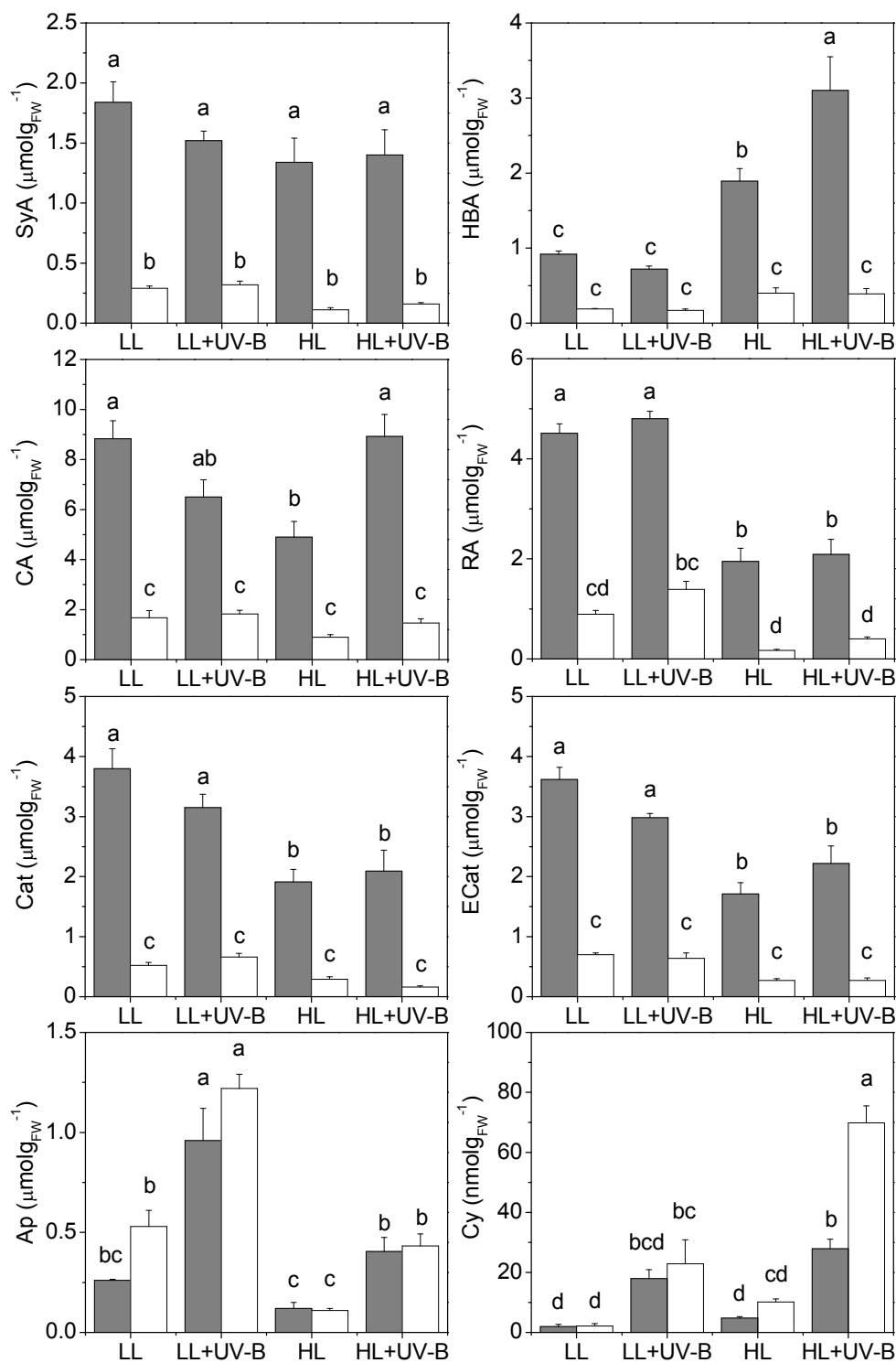
hloroplastima biljaka izlaganih UV-B zračenju, uočen je porast udela površine strome (1.4 puta; $P \leq 0.001$) i udvostručen je broj plastoglobula ($P \leq 0.001$). S druge strane, UV-B zračenje nije imalo uticaja na zastupljenost tilakoida i skroba u hloroplastima zelenog tkiva listova tamjanike, tabela 4.17.

Tabela 4.17. Površine unutarhloroplastnih struktura izražene kao srednje vrednosti procentualne zastupljenosti u ukupnoj površini hloroplasta (\pm SE; $n = 22$) u zelenim segmentima listova biljaka *P. coleoides* nakon desetodnevnog izlaganja sledećim režimima zračenja HL i HL+UV-B. Značajne razlike u površini hloroplastnih struktura između UV-B tretiranih i netretiranih biljaka pri HL prema Man-Vitnijevom U testu su prikazane (** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$).

Udeo površine unutarhloroplastnih struktura u ukupnoj površini hloroplasta	Režim zračenja	
	HL	HL+UV-B
Skrob (%)	53.2 \pm 3.7	49.5 \pm 4.3
Plastoglobuli (%)	0.8 \pm 0.1	2.0 \pm 0.3 ***
Stroma (%)	15.9 \pm 1.6	19.3 \pm 2.0 **
Tilakoidi (%)	30.1 \pm 2.8	29.2 \pm 3.0

4.3.2. *Odgovor fenolnog metabolizma zelenog i belog tkiva listova P. coleoides na visok intenzitet PAR-a i ambijentalne doze UV-B zračenja*

Profili fenolnih jedinjenja rastvornih u metanolu u belom i zelenom tkivu listova biljaka *P. coleoides* izlaganih UV-B zračenju i PAR-u različitih intenziteta analizirani su prethodno razvijenom i optimizovanom HPLC metodom. Rezultati su pokazali da su glavni fenilpropanoidi u biljkama tamjanike bili derivati CA i RA, slika 4.22. Četiri flavonoida: Cat, ECat, Ap i Cy su identifikovani u obliku glikozida. Pet puta veći sadržaj hidroksibenzoevih kiselina, hidroksicinamata, ECat i Cat je izmerena u zelenom, u odnosu na belo tkivo listova biljaka bez obzira na intenzitet PAR kojem su bile izložene, slika 4.22 (značajni efekti tipa tkiva su prikazani u tabeli P4, u poglavlju Prilozi).



Slika 4.22. Sadržaj različitih fenolnih jedinjenja u zelenom (sive kolone) i belom tkivu (bele kolone) listova biljaka *P. coleoides* nakon desetodnevno izlaganja LL, LL+UV-B, HL i HL+UV-B. Prikazane su srednje vrednosti \pm SE ($n = 4-5$) izražene u $\mu\text{mol g}_{\text{FW}}^{-1}$ (za cijanidin u $\text{nmol g}_{\text{FW}}^{-1}$). Različita slova označavaju statistički značajne razlike ($P < 0.05$) u sadržaju fenolnih jedinjenja između različitih režima zračenja i različitih tipova tkiva. SyA, sirinđična kiselina; HBAs, ukupne hidroksibenzoeve kiseline; CA: kafeinska kiselina; RA, rozmarinska kiselina; Cat, katehin; ECat, epikatehin; Ap, apigenin; Cy, cijanidin.

Sadržaji HBA i CA su bili značajno uvećani (za 60% i 80%, redom) nakon izlaganja UV-B zračenju, ali samo u kombinaciji sa HL u zelenom tkivu, slika 4.22 (značajni efekti „UV-B × PAR” interakcije su prikazani u tabeli P4, u poglavlju Prilozi). Sadržaji RA, CA, Cat i Ecat su bili umanjeni u zelenom tkivu listova biljaka izlaganih HL u odnosu na one izlagane LL (slika 4.22, tabela P4).

Najznačajniji efekat UV-B zračenja na sadržaj fenola u celokupnim listovima biljaka *P. coleoides* je bila pojačana akumulacija apigeninskih i cijanidinskih glikozida, posebno u belom tkivu, slike 4.22 i 4.23 (značajni efekti UV-B zračenja i „tkivo × UV-B” interakcija su prikazani u tabeli P4, u poglavlju Prilozi). UV-B zračenje je indukovalo trostruki porast sadržaja Ap u oba tipa tkiva listova, a najveći sadržaj Ap je izmeren u biljkama izlaganih LL+UV-B svetlosnom režimu, slika 4.22. Prvi uočljivi znaci akumulacije antocijana u listovima biljaka *P. coleoides* su se pojavili nakon četvrtog dana izlaganja UV-B zračenju i bili su upadljiviji u kombinaciji sa HL nego sa LL. Nakon deset dana, beli segmenti listova su postali intenzivno roze obojeni, slika 4.23.



Slika 4.23. Efekat UV-B zračenja na biljke *P. coleoides* nakon desetodnevnog gajenja u kombinaciji sa HL. Prikazane su fotografije reprezentativnih biljaka izlaganih HL i HL+UV-B režimu zračenja.

4.3.3. *Odgovor antioksidativnog metabolizma zelenog i belog tkiva listova P. coleoides na visok intenzitet PAR-a i ambijentalne doze UV-B zračenja*

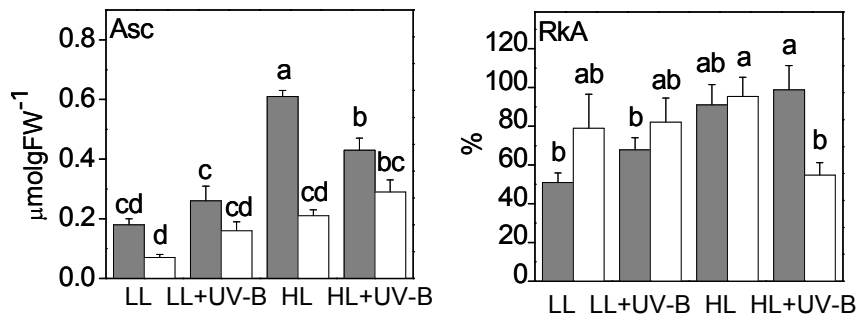
4.3.3.1. Markeri oksidativnog stresa

Da bi se utvrdilo da li je primenjivano UV-B zračenje izazvalo oksidativni stres u listovima biljaka *P. coleoides* upoređivani su nivoi karbonilacije proteina u tkivu listova biljaka izlaganih HL i HL+UV-B režimima. Sadržaj proteinskih karbonila (određivan spektrofotometrijski pomoću 2,4-dinitrofenilhidrazina) je bio veći u zelenom u poređenju sa belim tkivom listova, koji su izlagani PAR-u visokog intenziteta, tabela 4.18. Izlaganje UV-B zračenju nije dovelo do porasta nivoa karbonilacije proteina u listovima tamjanike, u celini.

Tabela 4.18. Sadržaj karbonilovanih proteina u belom i zelenom tkivu listova biljaka *P. coleoides* izlaganih HL i HL+UV-B režimima zračenja tokom deset dana. Srednje vrednosti \pm SE (n = 4) izražene su kao nmol proteinskih karbonila po mg ukupnih proteina. Statistički značajne razlike u vrednostima između uzoraka sa HL i HL+UV-B u istom tkivu nisu nađene.

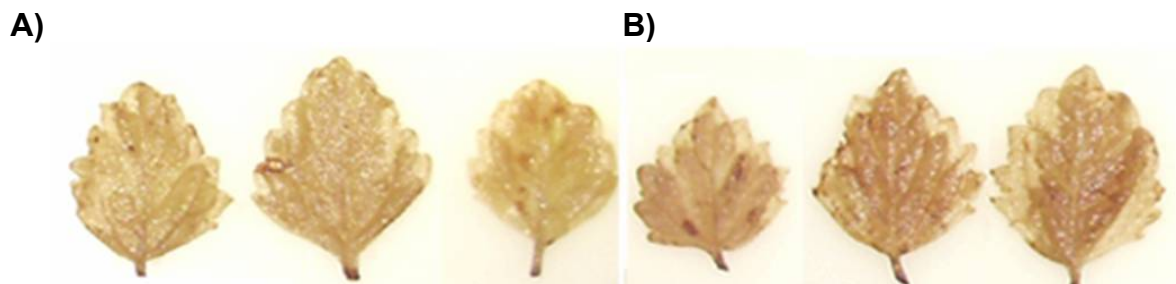
Tip tkiva	Režim zračenja	
	HL	HL+UV-B
Zeleno tkivo	159.2 \pm 26.1	173.1 \pm 19.9
Belo tkivo	51.5 \pm 18.3	66.7 \pm 11.8

Analiza sadržaja Asc u belom i zelenom tkivu listova *P. coleoides* je otkrila da je sadržaj redukovanog Asc u zelenom tkivu veći od istog u belom, nezavisno od tipa zračenja kojem su biljke bile izložene, slika 4.24. Visok intenzitet PAR je indukovao porast sadržaja Asc u oba tkiva, a posebno u zelenom (3 puta). Obrnuto, UV-B zračenje je izazvalo značajan pad nivoa Asc u zelenom tkivu na visokom PAR, dok u belom nije izazvalo statistički značajne promene. Rezultati statističke analize potvrdili su različite efekte UV-B zračenja i PAR-a na sadržaj Asc (tabela P5, u poglavlju Prilozi). Jedini značajan efekat na redoks-stanje Asc imalo je UV-B zračenje pri visokom intenzitetu PAR-a u belom tkivu.



Slika 4.24. Sadržaj redukovanog Asc (izražen u $\mu\text{mol g}^{-1}_{\text{FW}}$) i redoks-koeficijent Asc (RkA, %) u zelenom (sive kolone) i belom (bele kolone) tkivu listova biljaka *P. coleoides* nakon deset dana izlaganja LL, LL+UV-B, HL i HL+UV-B. Prikazane su srednje vrednosti \pm SE ($n = 5-6$). Različita slova označavaju statistički značajne razlike ($P < 0.05$) u sadržaju i redoks-stanju Asc između različitih režima zračenja i različitih tipa tkiva.

S druge strane, u listovima biljaka izlaganih LL i LL+UV-B režimima, ispitivano je prisustvo H_2O_2 bojenjem sa DAB-om. Osim što je zeleno tkivo generalno bilo tamnije obojeno u odnosu na belo, pri UV-B zračenju došlo je do blago tamnijeg bojenja listova, slika 4.25. Ovi rezultati preliminarno ukazuju na pojačano stvaranje H_2O_2 u zelenom tkivu, nezavisno od tipa primenjenog zračenja, i pri primeni UV-B zračenja.



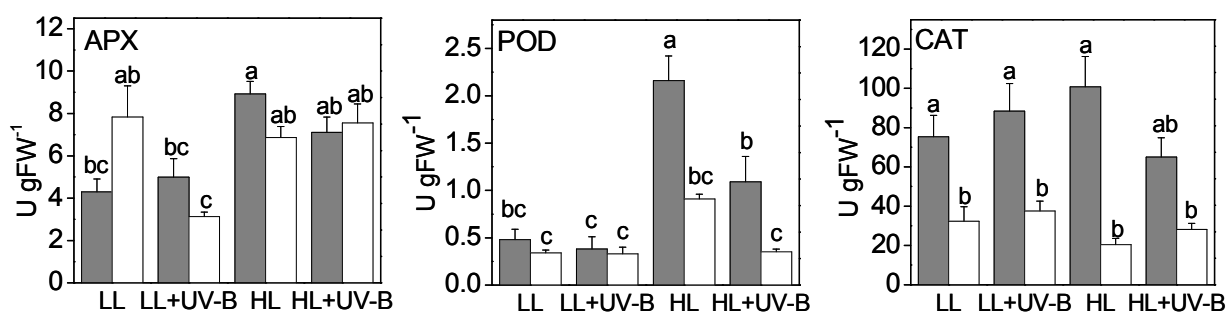
Slika 4.25. Detekcija H_2O_2 u listovima *P. coleoides* pomoću DAB- bojenja. A) Listovi sa LL režima; B) listovi sa LL+UV-B režima nakon desetodnevno izlaganja. Uočava se tamnije bojenje na zelenim segmentima listova koji su bili izloženi LL+UV-B režimu zračenja.

4.3.3.2. Aktivnosti enzima APX, POD i CAT

Antioksidativni odgovor u panaširanim listovima tamjanike na UV-B zračenje praćen je određivanjem aktivnosti APX, POD i CAT. Aktivnost APX, izražena na masu svežeg tkiva listova, je bila dvostruko veća u zelenom tkivu listova biljaka pod HL nego onih pod LL, slika 4.26. Nadalje, aktivnost POD je bila 2.5 puta veća u celom listu, nezavisno od tipa tkiva, kod biljaka sa HL u odnosu na one sa LL. Aktivnost CAT je uvek bila veća u zelenom tkivu, i nije

se značajno menjala ni pod uticajem visokog intenziteta PAR-a, kao ni pod uticajem UV-B zračenja, slika 4.26.

Pri LL režimu zračenja, UV-B zračenje je dovelo do značajnog pada aktivnosti APX u belom, i značajnog pada aktivnosti POD u zelenom tkivu listova, slika 4.26 (značajni efekti „UV-B” su prikazani u tabeli P5, u poglavlju Prilozi). UV-B zračenje nije stimulisalo aktivnost ni jednog od ispitivanih enzima. Rezultati statističke analize dodatno ukazuju na različite efekte UV-B zračenja u zavisnosti od pozadinskog intenziteta PAR-a na aktivnosti APX i POD, tabela P5, poglavlje Prilozi.



Slika 4.26. Aktivnosti enzima odgovornih za uklanjanje H₂O₂ u zelenom (sive kolone) i belom (bele kolone) tkivu listova biljaka *P. coleoides* nakon deset dana izlaganja režimima: LL, LL+UV-B, HL i HL+UV-B. Prikazane su srednje vrednosti ± SE (n = 5-6) izražene u U g⁻¹_{FW}. Različita slova označavaju statistički značajne razlike (P < 0.05) u aktivnosti enzima između različitih režima zračenja i različitih tipova tkiva.

Zbog pomenutog efekta UV-B zračenja na POD, i pokazanog uticaja na sadržaj polifenola, ispitivan je afinitet ekstrahovanih POD iz oba tkiva listova, za različite fenolne supstrate, tabela 4.19. Najveću specifičnost POD oba tkiva listova biljaka *P. coleoides* gajenih pod optimalnim uslovima za rast (250 μmol m⁻² s⁻¹ PAR) pokazale su za CGA, a zatim za CA, gvajakol i najmanji za FA. Aktivnosti sa Q i Cat kao elektron donorima za redukciju H₂O₂ nisu mogle da se izmere na ovaj način, zbog prisustva visoke polifenol-oksidadzne aktivnosti u listovima tamjanke. Pri dodavanju pomenutih flavonoida u reakcionu smešu, odmah je otpočela njihova oksidacija, bez dodatka vodonik-peroksida (podaci nisu prikazani).

Tabela 4.19. Aktivnosti POD sa različitim fenolnim supstratima u zelenom i belom tkivu listova *P. coleoides* biljaka gajenih pod optimalnim osvetljenjem. Specifične enzimске aktivnosti su date u $U\ g^{-1}_{FW}$ (aktivnost po g svežeg tkiva, A_{FW}) i u $U\ mg^{-1}$ (aktivnost po mg proteina, Sp) i predstavljene su srednje vrednosti \pm SE (n=4). Prikazane su statistički značajne razlike u aktivnosti između zelenog i belog tkiva prema Man-Vitnijevom U testu (* $P < 0.05$).

	Gvajakol	CA	FA	CGA
A_{FW} ($U\ g^{-1}_{FW}$)				
Zeleno tkivo	0.33 ± 0.03	0.55 ± 0.05	0.32 ± 0.02	0.99 ± 0.07
Belo tkivo	$0.45 \pm 0.02^*$	$0.79 \pm 0.05^*$	$0.23 \pm 0.02^*$	1.14 ± 0.08
Sp ($U\ mg^{-1}$)				
Zeleno tkivo	0.16 ± 0.02	0.26 ± 0.03	0.16 ± 0.02	0.48 ± 0.03
Belo tkivo	0.17 ± 0.03	0.30 ± 0.03	$0.09 \pm 0.02^*$	0.42 ± 0.03

^a Jedinice za aktivnost POD sa Cat kao supstratom razlikuju se od jedinica enzimskih aktivnosti POD sa drugim supstratima (videti pododeljak 3.6.8.1).

4.4. Izlaganje biljaka *P. zonale* visokom intenzitetu PAR-a i ambijentalnim dozama UV-B zračenja

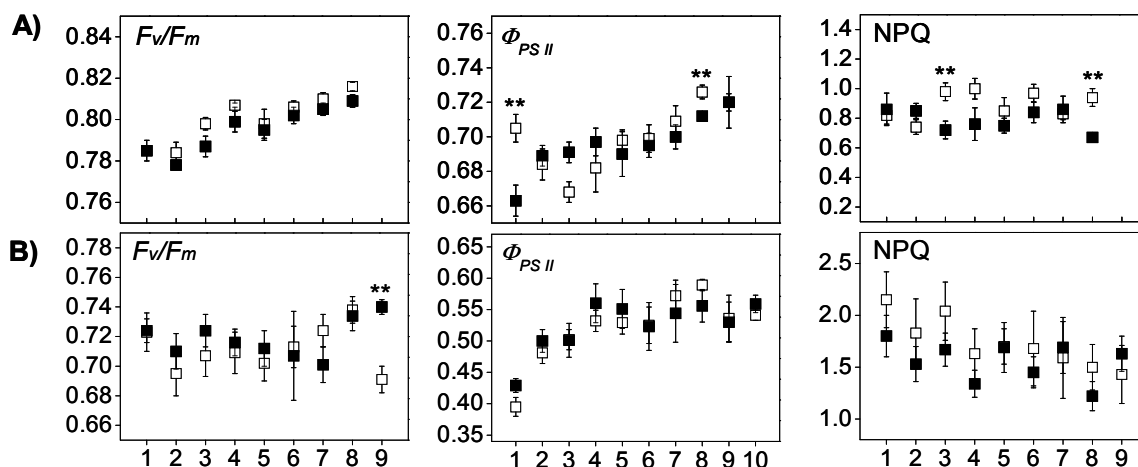
U četvrtom delu eksperimentalnog rada ove teze, slično prethodnom, ispitivana je međusobna povezanost fotosintetskih asimilata, antioksidativnog i fenolnog metabolizma „izvor“ tkiva sa „uvir“ tkivom listova *P. zonale* varijetet „FH“ izlaganih različitim svetlosnim režimima (LL, $395 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PAR; LL+UV-B (UV-B, 0.90 W m^{-2}); HL, $1350 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PAR i HL+UV-B). Kao logičan nastavak prethodnog dela, poređen je odgovor primarnog i sekundarnog metabolizma oba tkiva listova između dve različite, panaširane vrste na date svetlosne režime.

4.4.1. *Odgovor fotosinteze listova P. zonale var. „Frank Headley“ na visok intenzitet PAR-a i ambijentalne doze UV-B zračenja*

4.4.1.1. Dinamika promene parametara fluorescencije $hl a$

Kao prvi korak u proučavanju efekata UV-B zračenja i visokog intenziteta PAR-a na metabolizam panaširanih muškati, praćen je odgovor fotosintetskog aparata. Pokazano je da kod biljaka izloženih LL zračenju maksimalni kvantni prinos raste tokom desetodnevnog izlaganja, nezavisno od UV-B zračenja, slika 4.27. Na visokom intenzitetu PAR-a, UV-B zračenje takođe nije uticalo na vrednosti F_v/F_m , osim što je devetog dana izmerena značajno viša vrednost kod biljaka tretiranih UV-B zračenjem, slika 4.27B. Kao i u slučaju *P. coleoides* biljaka, vrednosti F_v/F_m biljaka izloženih većem pozadinskom osvetljenju bile su generalno niže od onih izlaganih manjem intenzitetu PAR-a. Radna efikasnost se nezavisno od režima zračenja povećavala tokom izlaganja, što znači da je prinos linearnog elektronskog transporta PS II bio sa vremenom veći. UV-B zračenje u kombinaciji sa HL nije uticalo na $\Phi_{PS II}$, slika 4.27B., dok je na nižem PAR, UV-B tretirano lišće imalo nižu $\Phi_{PS II}$ prvog i osmog dana, slika 4.27A.

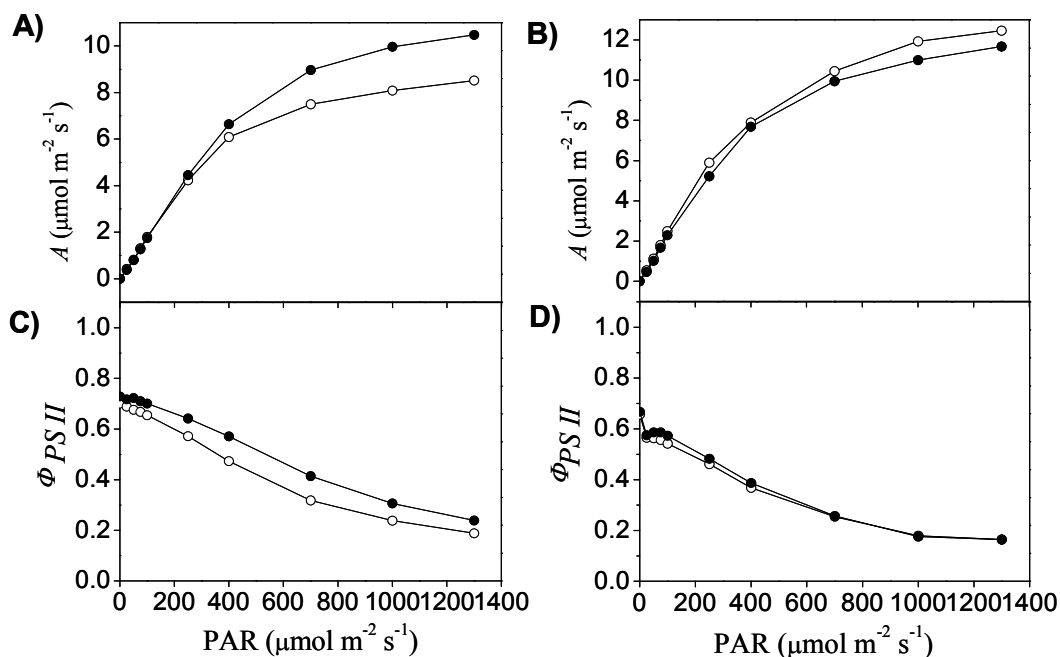
Vrednosti NPQ se nisu menjale značajno sa vremenom, kao ni pod uticajem UV-B zračenja na nižem intenzitetu PAR-a, dok je pri višem intenzitetu PAR-a, UV-B uzrokovalo smanjeno termalno rasipanje trećeg i devetog dana eksperimenta, slika 4.27. S druge strane, visok intenzitet PAR-a je indukovao veće NPQ, kao i u slučaju biljaka *P. coleoides*.



Slika 4.27. Dinamika promene fotosintetskih parametara: maksimalnog kvantnog prinosa (fotohemije) PS II, F_v/F_m ; radne efikasnosti PS II, $\Phi_{PS II}$ i nefotohemijskog gašenja fluorescencije *hl a*, NPQ u zelenim segmentima listova biljaka *P. zonale* izlaganih različitim režimima zračenja: A) LL (beli kvadrati) i LL+UV-B (crni kvadrati) i B) HL (beli kvadrati) i HL+UV-B (crni kvadrati) tokom deset dana. Predstavljene su srednje vrednosti \pm SE ($n = 7-8$). Značajne razlike fotosintetskih parametara između UV-B tretiranih i UV-B netretiranih biljaka na LL i na HL, prema Man-Vitnijevom U testu su prikazane (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$).

4.4.1.2. Dinamika promene parametara izmene gasova

Snimanjem svetlosnih kriva A pokazano je da u zelenim segmentima listova *P. zonale* biljaka, A dostiže zasićenje (A_{max}) na $1000-1300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ i da je optimalni intenzitet PAR-a oko $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ($A = 50\% A_{max}$) slika 4.28A. Nakon deset dana biljke *P. zonale* su se aklimatizovale na visok intenzitet PAR-a, što se vidi kroz porast u A_{max} , slika 4.28B. UV-B zračenje je samo u početku, nakon četiri sata izlaganja, ne i na kraju izlaganja, povećalo efikasnost fotosinteze u datim uslovima. Statistički značajne promene u zavisnosti $\Phi_{PS II}$ od PAR pod dejstvom UV-B zračenja nisu uočene ni prvog, ni devetog dana eksperimenta, slika 4.28C i 4.28D.



Slika 4.28. Asimilacija CO₂, A i radna efikasnost PS II, Φ_{PSII} u funkciji od intenziteta PAR (25 do 1300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) u zelenim segmentima listova biljaka *P. zonale* izlaganih različitim režimima zračenja: 1350 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PAR (HL, beli krugovi, ○) i HL+UV-B (UV-B: 0.90 W m⁻²; crni krugovi, ●) prvog (A, C) i posljednjeg (B i D) dana eksperimenta.

Rezultati osnovnih parametara gasne izmene izmereni u zelenim segmentima listova biljaka *P. zonale* prvog, četvrtog i desetog dana izlaganja različitim režimima zračenja prikazani su u tabeli 4.20, dok su vrednosti ostalih parametara dati u tabeli P6 u poglavlju Prilozi. Primenjeno UV-B zračenje nije imalo efekta na A , g_s i Φ_{PSII} u zelenom tkivu biljaka *P. zonale* pod oba intenziteta PAR-a tokom deset dana, tabela 4.20. Blagi porast u brzini asimilacije je primećen u biljkama izlaganih HL u odnosu na one sa LL (značajan efekat „PAR” u tabeli P7 u poglavlju Prilozi). Uticaj PAR na provodljivost stoma je zavisio od dana eksperimenta (značajne „dan × PAR” interakcije, tabela P7). Kao što je i bilo očekivano, radna efikasnost PS II je bila niža na višem intenzitetu PAR-a, u poređenju sa nižim intenzitetom PAR-a tokom celog perioda izlaganja.

Table 4.20. Efekat UV-B zračenja na fotosintetske parametre u zelenim segmentima listova biljaka *P. zonale* izlaganih različitim režimima zračenja: LL, LL+UV-B, HL i HL+UV-B tokom deset dana. Predstavljene su srednje vrednosti \pm SE (n = 7-8). Različita slova označavaju statistički značajne razlike ($P < 0.05$) u vrednostima datih fotosintetskih parametara između različitih režima zračenja. *A*: brzina asimilacije CO₂; *g_s*: provodljivost stoma; *c_i*: koncentracija CO₂ unutar lista; ETR: brzina elektronskog transporta kroz PS II.

Dani izlaganja	Fotosintetski parametri	Režimi zračenja			
		LL	LL+UV-B	HL	HL+UV-B
1. dan	<i>A</i> ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	8.0 \pm 0.4 ^{ab}	8.2 \pm 0.1 ^{ab}	10.9 \pm 1.0 ^{bc}	11.2 \pm 1.0 ^c
	<i>g_s</i> ($\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	240.9 \pm 22.5 ^{abcd}	208.7 \pm 8.1 ^a	313.3 \pm 29.8 ^{abcd}	334.1 \pm 25.4 ^d
	radna efikasnost PS II	0.59 \pm 0.01 ^{de}	0.58 \pm 0.01 ^d	0.15 \pm 0.01 ^a	0.15 \pm 0.01 ^a
	ETR ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	60.9 \pm 1.4 ^a	61.3 \pm 0.7 ^a	80.5 \pm 3.9 ^b	81.4 \pm 4. ^b
	<i>c_i</i> , ppm	321.1 \pm 3.5 ^{cde}	311.7 \pm 2.3 ^{bc}	318.9 \pm 5.0 ^{cd}	322.1 \pm 2.5 ^{cd}
4. dan	<i>A</i> ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	7.5 \pm 0.4 ^a	7.7 \pm 0.4 ^a	10.3 \pm 0.7 ^{abc}	10.4 \pm 0.8 ^{bc}
	<i>g_s</i> ($\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	312.5 \pm 25.0 ^{bcd}	322.6 \pm 31.4 ^{cd}	239.5 \pm 27.4 ^{ab}	231.4 \pm 17.2 ^{abc}
	radna efikasnost PS II	0.61 \pm 0.03 ^{de}	0.59 \pm 0.01 ^{de}	0.19 \pm 0.01 ^{ab}	0.20 \pm 0.01 ^{bc}
	ETR ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	63.5 \pm 1.8 ^a	61.9 \pm 1.3 ^a	101.1 \pm 3.3 ^c	111.5 \pm 4.4 ^d
	<i>c_i</i> , ppm	334.1 \pm 1.5 ^f	336.5 \pm 2.1 ^{ef}	303.9 \pm 3.6 ^b	302.2 \pm 4.3 ^b
10. dan	<i>A</i> ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	7.8 \pm 0.5 ^a	7.7 \pm 0.5 ^a	7.6 \pm 0.3 ^a	10.2 \pm 0.9 ^{abc}
	<i>g_s</i> ($\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	283.8 \pm 21.8 ^{abcd}	272.9 \pm 21.6 ^{abcd}	235.1 \pm 16.5 ^{abc}	204.8 \pm 23.7 ^a
	radna efikasnost PS II	0.62 \pm 0.01 ^e	0.63 \pm 0.01 ^e	0.19 \pm 0.01 ^{bc}	0.21 \pm 0.01 ^c
	ETR ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	65.4 \pm 1.1 ^a	66.2 \pm 0.5 ^a	103.3 \pm 7.1 ^{cd}	115.2 \pm 5.0 ^d
	<i>c_i</i> , ppm	331.2 \pm 1.9 ^{def}	329.8 \pm 2.3 ^{def}	304.7 \pm 2.9 ^b	289.4 \pm 4.3 ^a

4.4.1.3. Sadržaj fotosintetskih pigmenata

Sadržaji fotosintetskih pigmenata, hlorofila i karotenoida, nisu bili izmenjeni UV-B zračenjem, nezavisno od pozadinskog osvetljenja, tabela 4.21. S druge strane, kao i u slučaju *P. coleoides* biljaka, visok intenzitet PAR-a je izazvao smanjenje sadržaja *hl a*, *hl b*, neoksantina luteina i violaksantina (značajane vrednosti efekta „PAR” na sadržaj pigmenata prikazane su u tabeli P8, u poglavlju Prilozi). Nadalje, HL je izazvao i porast sadržaja anteraksantina i zeaksantina, što je u skladu sa povećanim NPQ na povišenom PAR, slika 4.27.

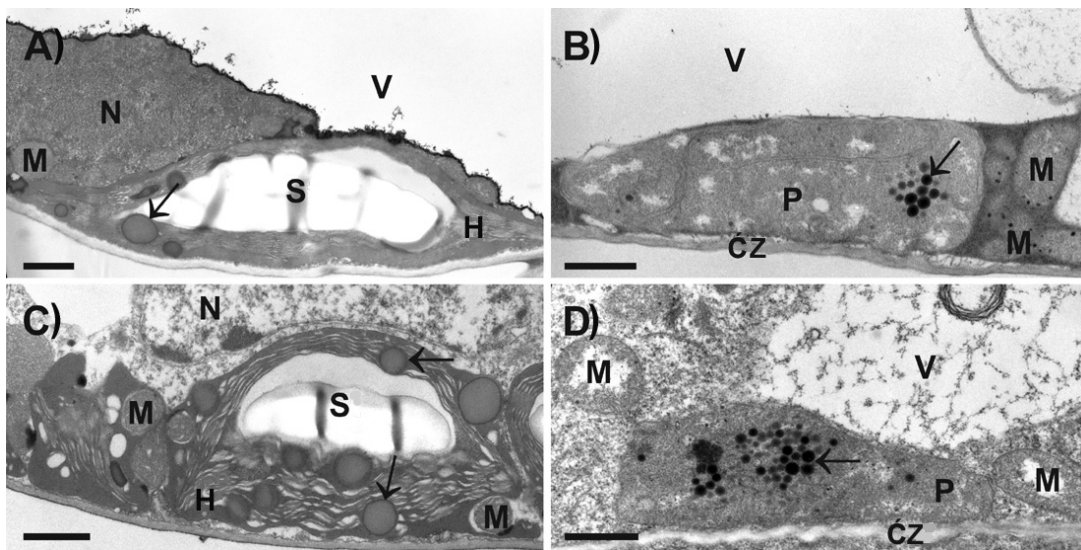
Tabela 4.21. Sadržaj hlorofila i karotenoida ($\mu\text{g g}^{-1}_{\text{FW}}$), maseni odnosi pigmenata i deepoksidacioni indeks u zelenim segmentima listova *P. zonale* nakon deset dana izlaganja različitim režimima zračenja: LL, LL+UV-B, HL i HL+UV-B. Predstavljene su srednje vrednosti \pm SE (n = 7-8). Različita slova označavaju statistički značajne razlike ($P < 0.05$) u sadržaju određivanih pigmenata i njihovih odnosa između različitih režima zračenja.

Sadržaj pigmenata	Režimi zračenja			
	LL	LL+UV-B	HL	HL+UV-B
Hlorofil <i>a</i>	1305.8 \pm 160.1 ^b	1295.5 \pm 69.5 ^b	698.2 \pm 45.0 ^a	797.8 \pm 55.2 ^a
Hlorofil <i>b</i>	353.9 \pm 38.9 ^b	338.9 \pm 17.8 ^b	175.8 \pm 8.3 ^a	194.1 \pm 12.1 ^a
Hlorofil (<i>a+b</i>)	1659.7 \pm 198.9 ^b	1634.4 \pm 87.0 ^b	874.0 \pm 53.0 ^a	991.8 \pm 67.1 ^a
β -karoten (K)	71.2 \pm 13.7 ^a	77.0 \pm 5.8 ^a	48.7 \pm 3.4 ^a	53.4 \pm 4.3 ^a
Lutein (L)	121.9 \pm 13.5 ^a	120.2 \pm 6.3 ^a	87.3 \pm 4.4 ^a	89.0 \pm 4.8 ^a
Neoksantin (N)	62.0 \pm 6.8 ^b	60.8 \pm 3.3 ^b	39.5 \pm 2.0 ^a	40.5 \pm 2.5 ^a
Violaksantin (V)	81.4 \pm 11.2 ^b	85.6 \pm 5.4 ^b	36.5 \pm 5.5 ^a	46.9 \pm 10.1 ^a
Anteraksantin (A)	3.3 \pm 0.2 ^a	4.0 \pm 0.3 ^a	31.2 \pm 2.9 ^b	25.4 \pm 2.2 ^b
Zeaksantin (Z)	n.d.	n.d.	32.1 \pm 3.8	27.5 \pm 5.1
V + A + Z	83.9 \pm 11.3 ^a	89.6 \pm 5.5 ^a	99.9 \pm 6.2 ^a	99.9 \pm 6.5 ^a
Odnosi pigmenata				
Hlorofil <i>a/b</i>	3.7 \pm 0.1 ^a	3.8 \pm 0.1 ^{ab}	4.0 \pm 0.1 ^{bc}	4.1 \pm 0.1 ^c
Hlorofil (<i>a+b</i>)/ Σ kar ¹	5.0 \pm 0.1 ^b	4.7 \pm 0.1 ^b	3.2 \pm 0.1 ^a	3.5 \pm 0.1 ^a
Di, ² %	-	-	48.3 \pm 3.7 ^b	41.8 \pm 6.6 ^b

¹ Σ kar: ukupni karotenoidi: (N+L+V+A+Z+ β -karoten); ² Deepoksidacioni indeks, Di = 100% x (0.5x(A+Z))/(V+A+Z). n.d.: nije detektovano (ispod praga detekcije).

4.4.1.4. Promene u ultrastrukturi plastida

Ispitivanja ultrastrukture ćelija pomoću TEM, potvrđuju da i u „FH“ varijetetu muškatile u zelenim segmentima postoje razvijeni hloroplasti sa tilakoidima (kao i u slučaju „BF“ varijeteta i *P. coleoides* biljaka), sa velikim i dobro definisanim plastoglobulima (koji su izostajali kod biljaka „BF“ varijeteta gajenih na $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PAR) i dominantnim granulama skroba, slika 4.29A i 4.29C. Slično kao i u prethodno ispitivanim belim segmentima panaširanih listova, detektovani plastidi su bili manji od hloroplasta, bez razvijenih tilakoida i skrobnih granula, ali sa brojnim membranskim vezikulama različite veličine i manjim, grupisanim plastoglobulima, slika 4.29B i 4.29D. Štaviše, kao ni u prethodno ispitivanim vrstama, u belim ćelijama listova nisu uočeni peroksizomi.



Slika 4.29. TEM mikrografija na kojoj je prikazana ultrastruktura ćelija zelenih (A,C) i belih (B,D) segmentima listova biljaka *P. zonale* nakon desetodnevno izlaganja režimima zračenja: HL (A,B) i HL+UV-B (C, D). Na mikrografijama zelenih segmenata upečatljivi su hloroplasti (C) sa velikim skrobnim granulama (St) i brojni plastoglobuli (strelice). Plastidi belih segmenata takođe sadrže brojne plastoglobule (strelice) i vezikule (vrh strelice), ali ne skrobne granule. CZ, ćelijski zid; M, mitohondrije; N, nukleus; V, vakuola. Skala predstavlja 1 μm .

Dalja analiza unutarplastidnih struktura je nastavljena samo na zelenim segmentima listova. U biljkama izlaganim visokom intenzitetu PAR-a, UV-B zračenje je indukovalo smanjenje udela skroba (1.5 puta, $P \leq 0.001$) bez promena u zastupljenosti plastoglobula,

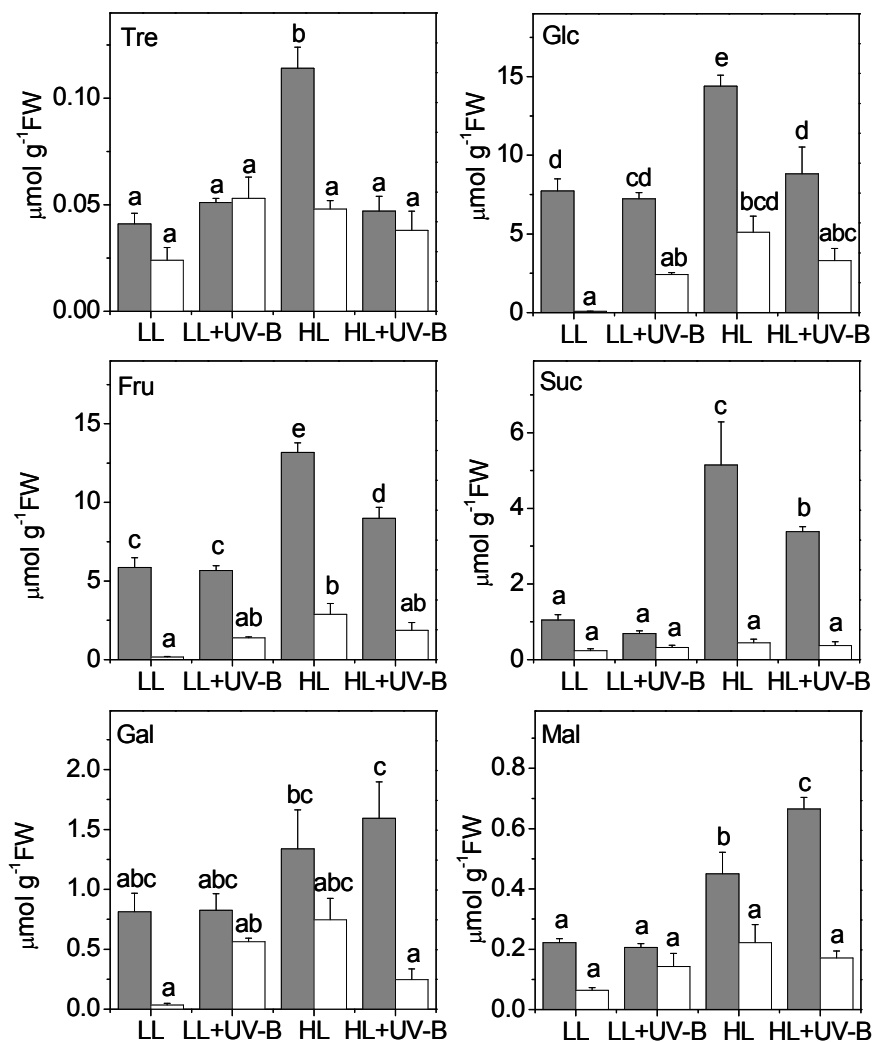
tabela 4.22. Paralelno sa degradacijom skroba, UV-B zračenje je uzrokovalo porast površine koji zauzimaju tilakoidi (1.3 puta, $P \leq 0.005$) i stroma (1.7 puta, $P \leq 0.001$).

Tabela 4.22. Površine sub-hloroplastnih struktura izražene kao srednje vrednosti procenata od ukupne površine hloroplasta (\pm SE; $n = 22$) u zelenim segmentima listova biljaka *P. zonale* nakon desetodnevnog izlaganja različitim režimima zračenja: HL (PAR: $1350 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) i HL+UV-B (UV-B: 0.90 W m^{-2}). Značajne razlike između UV-B tretiranih i netretiranih biljaka sa HL prema Man-Vitnijevom U testu su prikazane (** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$).

Udeo površine sub-hloroplastnih struktura u ukupnoj površini hloroplasta	Režim zračenja	
	HL	HL+UV-B
Skrob (%)	49.8 ± 2.3	33.3 ± 3.0 ***
Plastoglobuli (%)	10.4 ± 1.1	10.2 ± 1.0
Stroma (%)	14.2 ± 0.9	23.6 ± 1.7 ***
Tilakoidi (%)	26.1 ± 1.2	32.9 ± 1.8 **

4.4.2. *Odgovor metabolizma rastvornih ugljenih hidrata zelenog i belog tkiva listova P. zonale na visok intenzitet PAR-a i ambijentalne doze UV-B zračenja*

Sadržaj glavnih rastvornih ugljenih hidrata (glukoze, Glc; fruktoze, Fru; saharoze, Suc; trehaloze, Tre; galaktoze, Gal i maltoze, Mal) određenih u zelenom i belom tkivu listova biljaka *P. zonale* nakon deset dana izlaganja različitim režimima zračenja prikazani su na slici 4.30, dok su vrednosti ostalih identifikovanih mono-, di- i trisaharida prikazani na slici P3 u poglavlju Prilozi. Osnovni, konstitutivni nivo glavnih rastvornih ugljenih hidrata je bio veći u zelenom nego belom tkivu listova *P. zonale*, slika 4.30 (značajan efekat tipa tkiva prikazan je u tabeli P9 u poglavlju Prilozi), iako je sadržaj alkoholnih šećera: sorbitola, galaktitola i manitola, kao i rafinoze bio sličan u oba tkiva (slika P3). Visok intenzitet PAR-a je uzrokovao dvostruko povećanje sadržaja rastvornih ugljenih hidrata (svih sem rafinoze) u fotosintetski aktivnom tkivu, što je bilo praćeno i porastom sadržaja svih određivanih ugljenih hidrata (sem Suc i rafinoze) u fotosintetski neaktivnom tkivu, slike 4.30 i P3 (statistički potvrđeno Man-Vitnijevim U testom i značajnim efektom „PAR” prikazanim u tabeli P9 u poglavlju Prilozi).



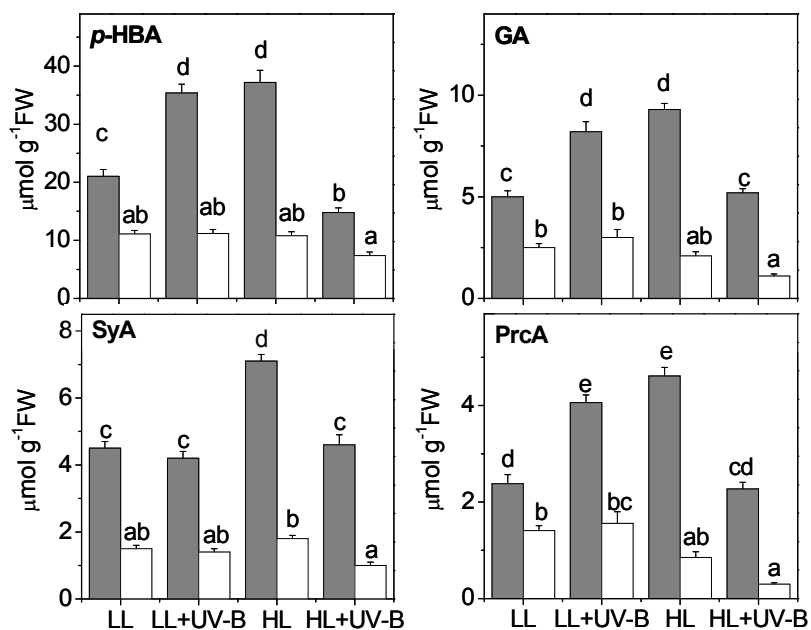
Slika 4.30. Sadržaj rastvornih ugljenih hidrata u zelenom (sive kolone) i belom (bele kolone) tkivu listova biljaka *P. zonale* nakon desetodnevnog izlaganja radijacionim režimima: LL, LL+UV-B, HL i HL+UV-B. Prikazane su srednje vrednosti \pm SE ($n = 5-6$) izražene u $\mu\text{mol g}^{-1}\text{FW}$. Različita slova označavaju statistički značajne razlike ($P < 0.05$) u sadržaju rastvornih ugljenih hidrata između različitih režima zračenja i različitih tipova tkiva. Fru, fruktoza; Gal, galaktoza; Glc, glukoza; Mal, maltoza; Suc, saharoza; Tre, trehaloza.

Pod LL, UV-B zračenje nije imalo efekta na sadržaj pojedinačnih ugljenih hidrata u zelenom tkivu listova, dok je u belom dovelo do značajnog porasta sadržaja Glc, Fru, Tre, Gal i Mal ($0.01 < P < 0.05$, Man-Vitnijev U test), slika 4.30. Suprotno, pod HL, UV-B zračenje je uslovalo smanjenje nivoa Glc, Fru, Suc i Tre u zelenom tkivu listova ($0.001 < P < 0.05$, Man-Vitnijev U test). U zelenom tkivu, samo je sadržaj Mal bio povećan pod dejstvom UV-B

zračenja, ($P = 0.009$, Man-Vitnijev U test), što je u saglasnosti sa smanjenim sadržajem skroba, tabela 4.22. Pod HL, u belom tkivu listova, UV-B zračenje je jedino uticalo na sadržaj Gal i to tako što je izazvalo smanjenje ($P = 0.032$, Man-Vitnijev U test). Interesantan je rezultat da se sadržaj Suc u belom tkivu nije menjao niti pri izlaganju visokom intenzitetu PAR-a, niti UV-B zračenju. Zavisnost efekta UV-B zračenja na sadržaj glavnih rastvornih ugljenih hidrata pri različitim intenzitetima PAR-a i u različitom tkivu listova je prikazana u tabeli P9 u poglavlju Prilozi.

4.4.3. Odgovor fenolnog metabolizma zelenog i belog tkiva listova *P. zonale* na visok intenzitet PAR-a i ambijentalne doze UV-B zračenja

Fenolni profili u zelenom i belom tkivu listova biljaka *P. zonale* određivani su HPLC metodom i sumirani rezultati nakon kisele hidrolize glikozida u metanolnim ekstraktima su prikazani na slikama 4.31, 4.32 i 4.33.



Slika 4.31. Sadržaj hidroksibenzojevih kiselina u zelenom (sive kolone) i belom (bele kolone) tkivu listova biljaka *P. zonale* nakon deset dana izlaganja LL, LL+UV-B, HL i HL+UV-B. Prikazane su srednje vrednosti \pm SE ($n = 4-7$) izražene u $\mu\text{mol g}^{-1}\text{FW}$. Različita slova označavaju statistički značajne razlike ($P < 0.05$) u sadržaju hidroksibenzojevih kiselina između različitih režima zračenja i različitih tipova tkiva. GA, galna kiselina; *p*-HBA, *p*-hidroksibenzojeva kiselina; PrcA, protokatehuinska kiselina; SyA, siringična kiselina.

4.4.3.1. Konstitutivni profili fenolnih jedinjenja u zelenom i belom tkivu listova

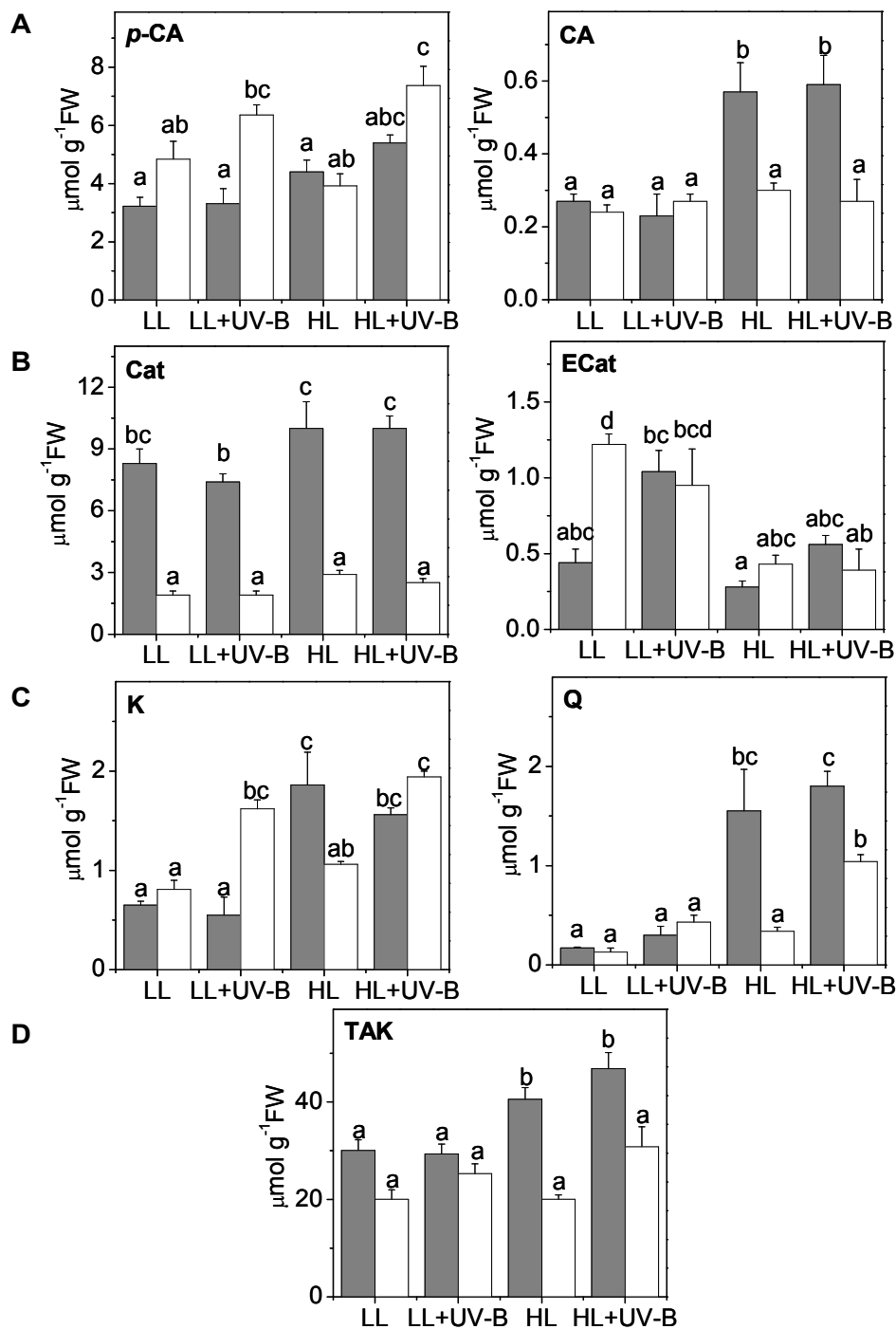
Konstitutivna fenolna jedinjenja (u uslovima pod LL) se nisu kvalitativno razlikovala u zelenom i belom tkivu listova biljaka *P. zonale*, ali su utvrđene razlike u njihovom sadržaju. Tako su sadržaji svih određivanih HBAs bile gotovo dvostruko veće u zelenom u poređenju sa belim tkivom, slika 4.31 (značajni efekti tipa tkiva predstavljeni su u tabeli P10 u poglavlju Prilozi).

Derivati CA i *p*-CA su bili jedini detektovani hidroksicinamati, i to uglavnom u obliku estara i glikozida. Bazalni nivo (pod LL) *p*-CA bio je veći u belom tkivu, dok je nivo CA bio veći u zelenom tkivu listova, slika 4.32A. Sadržaj Cat je bio veći u zelenom, a ECat u belom tkivu listova, slika 4.32B. Flavon-3-oli, Q i K, prisutni u metanolnim ekstraktima oba tipa tkiva, bili su u obliku glikozida. Nakon hidrolize, njihovi sadržaji u oba tkiva (LL) se nisu međusobno razlikovali, slika 4.32C.

U cilju sagledavanja doprinosa specifičnih fenolnih jedinjenja (Cat, ECat, *p*-CA, CA, Q, K i Cy) u TAK zelenog i belog tkiva listova muškatile, njihove antioksidativne aktivnosti su normirana na antioksidativnu aktivnost Asc (prema podacima iz Rice-Evans i saradnika, 1997, prikazano u tabeli 3.2), pomnoženi su sa njihovim koncentracijama u tkivu. Dobijeni rezultati ukazuju na blago povećan antioksidativni kapacitet u zelenom u poređenju sa belim tkivom listova, slika 4.32D.

4.4.3.2. Uticaj UV-B zračenja na sadržaj fenolnih jedinjenja u zelenom i belom tkivu listova

Primenjeno UV-B zračenje je uticalo na sadržaj HBA u zelenom tkivu listova i to pri LL uzrokujući porast za 60%, dok je pri HL izazvalo smanjenje svih HBA za 50%, slika 4.31 (statistički značajne „PAR × UV-B“ i „PAR × UV-B × tkivo“ interakcije su predstavljene u tabeli P10 u poglavlju Prilozi). Što se tiče ostalih fenolnih podklasa, UV-B zračenje je imalo veći uticaj na belo, u odnosu na zeleno tkivo. Naime, UV-B zračenje je podstaklo biosintezu *p*-CA, K i Q nezavisno od pozadinskog PAR u belom tkivu, dok je u zelenom uticalo samo na porast sadržaja ECat, slika 4.32 (statistički značajne interakcije su prikazane u tabeli P10).

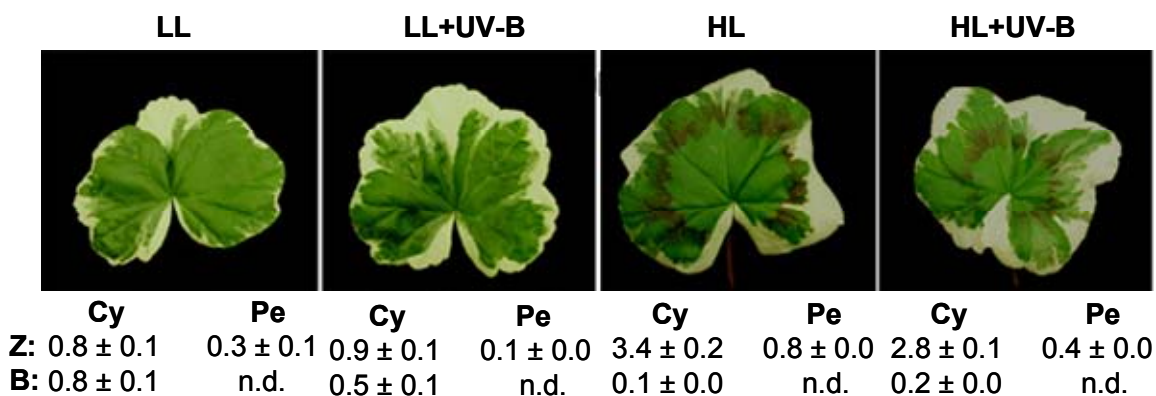


Slika 4.32. Sadržaj A) hidroksicinamata; B) flavan-3-ola; C) flavon-3-ola; D) izračunatog ukupnog antioksidativnog kapaciteta (TAK) u zelenom (sive kolone) i belom (bele kolone) tkivu listova biljaka *P. zonale* nakon desetodnevnog izlaganja LL, LL+UV-B, HL i HL+UV-B. Prikazane su srednje vrednosti \pm SE (n = 7-8) izražene u $\mu\text{mol g}^{-1}\text{FW}$. Različita slova označavaju statistički značajne razlike ($P < 0.05$) u sadržaju hidroksibenzojevih kiselina između različitih režima zračenja i različitih tipova tkiva. *p*-CA, *p*-kumarna kiselina; CA, kafeinska kiselina; Cat, katehin; ECat, epikatehin; Q, kvercetin; K, kampferol. TAK je izračunat tako što su koncentracije Cat, ECat, *p*-CA, CA, Q, K i antocijanidina pomnožene sa odgovarajućim antioksidativnim kapacitetom predstavljenim u *Rice-Evans et al.* (1997).

4.4.3.3. Uticao visokog intenziteta PAR-a na sadržaj fenolnih jedinjenja u zelenom i belom tkivu listova

Uticao visokog intenziteta PAR-a na fenolni metabolizam u listovima muškatele se razlikovao u odnosu na UV-B zračenje. Naime, visok intenzitet PAR-a je snažnije uticao na zeleno tkivo listova, nego na belo, utičući na porast sadržaja svih HBA, CA, Cat i glikozida Q, K, Cy i Pe u zelenom tkivu, slike 4.31, 4.32 i 4.33 (statistički značajne „PAR × UV-B”, „PAR × tkivo” i „PAR × UV-B × tkivo” interakcije su prikazane u tabeli P10). Visok intenzitet PAR-a nije imao uticaja na sadržaj fenolnih jedinjenja u belom tkivu, izuzev smanjenja PrcA i ECat, slike 4.31 i 4.32B. Ove promene su imale za posledicu veći Q/K odnos i veći totalni antioksidativni kapacitet u zelenom nego u belom tkivu listova biljaka nakon deset dana izlaganja visokom intenzitetu PAR-a, slika 4.32D.

Uočljiva promena koju je HL izazvao isključivo u zelenom tkivu listova *P. zonale* je akumulacija Cy i Pe, zbog čega su zeleni segmenti listova dobili braonkasto-crvenu boju, slika 4.33.



Slika 4.33. Fotografije reprezentativnih listova biljaka *P. zonale*, kojima su pridružene vrednosti sadržaja (izražene u $\text{nmol g}^{-1}_{\text{FW}}$) cijanidina (Cy) i peonidina (Pe), dobijene nakon desetodnevog izlaganja biljaka različitim režimima zračenja a. Prikazane su srednje vrednosti \pm SE, za $n = 7-8$. Značajne statističke razlike u odnosu na primenu UV-B zračenja u kombinaciji sa oba intenziteta PAR-a nisu nađene ($P < 0.05$).

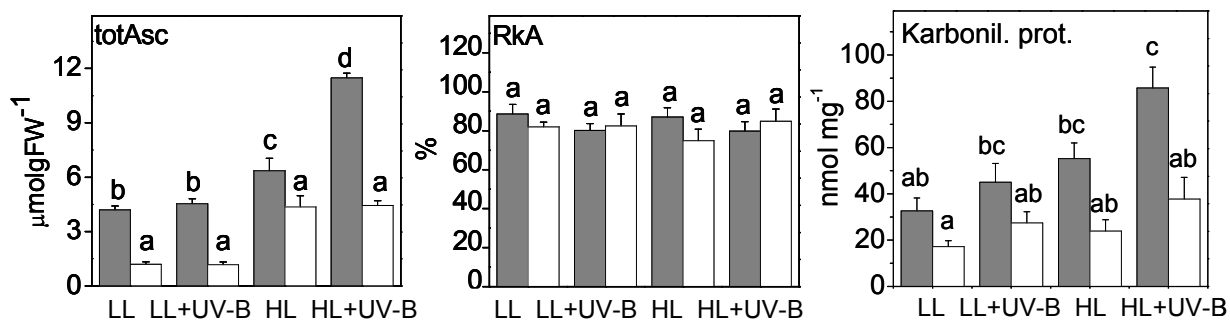
4.4.4. Odgovor antioksidativnog metabolizma zelenog i belog tkiva listova biljaka *P. zonale* na visok intenzitet PAR-a i ambijentalne doze UV-B zračenja

4.4.4.1. Markeri oksidativnog stresa

Sa svrhom da se ispita da li ambijentalne doze UV-B zračenja ili visok intenzitet PAR-a izazivaju oksidativni stres u panaširanim listovima biljaka *P. zonale*, analiziran je sadržaj karbonilovanih proteina, određivan sadržaj Asc i njegovo redoks-stanje, slike 4.34 i 4.35.

Sadržaj ukupnog Asc je bio viši u zelenom tkivu listova, u odnosu na belo pod svim režimima zračenja, u slučaju obe ispitivane biljne vrste, i muškatile varijeteta „BF“ i tamjanike (značajni efekti tipa tkiva su prikazani u tabeli P11, poglavlja Prilozi). U listovima biljaka *P. zonale* „FH“ visok intenzitet PAR-a je izazvao porast sadržaja Asc u oba tkiva, dok je UV-B indukovao porast Asc samo u zelenom tkivu u kombinaciji sa HL, slika 4.34. Redoks-stanje Asc je bilo slično u oba tkiva, pri sva četiri režima zračenja, i variralo je od 75-90%, slika 4.34.

Sadržaj proteinskih karbonila je bio značajno veći u zelenom nego u belom tkivu listova, nakon desetodnevnog izlaganja HL režimu ($P = 0.029$) i HL+UV-B režimu ($P = 0.029$, prema Man-Vitnijevom U testu), slika 4.34 (statistički značajni uzicaji tipa tkiva su prikazani u tabeli P11, poglavlja Prilozi). Visok intenzitet PAR-a i UV-B zračenje su izazvali blagi porast sadržaja karbonilovanih proteina u fotosintetski aktivnom tkivu listova, dok je isti u belom tkivu ostao nepromenjen, tabela P11.



Slika 4.34. Sadržaj totalnog Asc (izražen u $\mu\text{mol g}^{-1}\text{FW}^{-1}$), redoks-stanje Asc (RkA, %) i stepen karbonilacije proteina (nmol proteinskih karbonila po mg proteina) u zelenom (sive kolone) i belom (bele kolone) tkivu listova biljaka *P. zonale* nakon desetodnevnog izlaganja režimima: LL, LL+UV-B, HL i HL+UV-B. Prikazane su srednje vrednosti \pm SE ($n = 4-7$). Različita slova označavaju statistički značajne ($P < 0.05$) razlike u vrednostima markera oksidativnog stresa između različitih režima zračenja i različitih tipa tkiva

Nakon bojenja DAB-om, na listovima *P. zonale* prethodno izlaganim UV-B zračenju u toku deset dana, nije primećena braonkasta boja koja bi ukazivala na oksidovani, polimerizovan precipitirajući proizvod, koji se stvara u prisustvu vodonik-peroksida. Dakle, nije nađena razlika između listova izloženih i neizloženih UV-B zračenju, ni u belim ni u zelenim segmentima. Zeleno tkivo izloženo HL je bilo intenzivnije obojeno u odnosu na belo, slika 4.35.



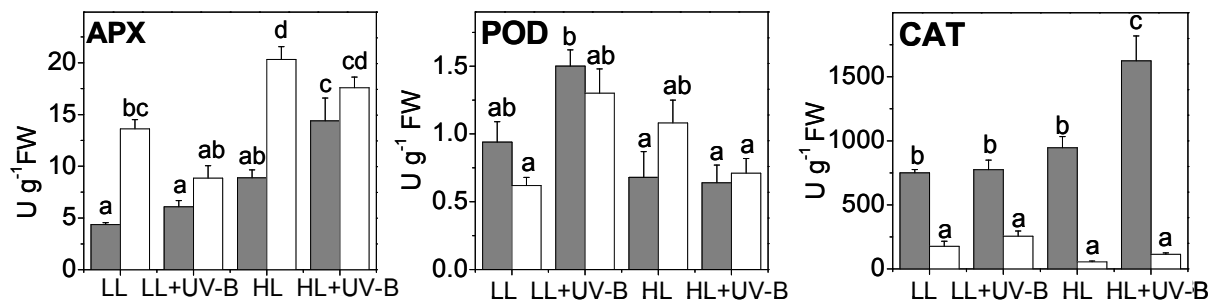
Slika 4.35. Ispitivanje akumulacije H₂O₂ (bojenjem sa DAB-om) u listovima biljaka *P. zonale* nakon desetodnevnog izlaganja režimima: LL, LL+UV-B, HL i HL+UV-B. Uočava se tamnija boja na zelenim segmentima listova koji su bili izloženi HL i HL+UV-B režimima zračenja, dok se uticaj UV-B zračenja na akumulaciju H₂O₂ ne uočava.

4.4.4.2. Aktivnosti enzima APX, CAT i POD

Osnovna, konstitutivna aktivnost CAT je bila veća u zelenom tkivu u poređenju sa belim, slika 4.36 (značajni efekti tipa tkiva su prikazani u tabeli P11, poglavlja Prilozi). U suštini, značajnija aktivnost CAT u fotosintetski neaktivnom tkivu listova nije nađena, što je saglasno sa odsustvom peroksizoma u ovom tipu tkiva (pododeljak 4.3.4.4). Međutim, aktivnost APX je konstitutivno bila veća u belom u odnosu na zeleno tkivo listova, slika 4.36 (značajni efekti tipa tkiva su prikazani u tabeli P11).

Pri izlaganju muškati LL+ UV-B režimu zračenja, nisu nađene značajne promene aktivnosti ispitivanih enzima u oba tkiva, kao i u slučaju Asc. Izuzetak je bila povećana aktivnost POD u belom tkivu listova, slika 4.36. Pod HL, UV-B zračenje je imalo izraženiji efekat u zelenom tkivu listova biljaka *P. zonale*, u odnosu na belo tkivo, što se odnosilo na stimulaciju aktivnosti APX i CAT, paralelno sa porastom sadržaja Asc. S druge strane, viši intenzitet PAR-a je izazvao pojačanu aktivnost APX i POD, što se može dovesti u vezu sa

povećanim sadržajem Asc u belom tkivu, i pojačanom aktivnošću APX i CAT, zajedno sa povećanim sadržajem Asc u zelenom tkivu, slike 4.34 i 4.36.



Slika 4.36. Aktivnosti enzima odgovornih za uklanjanje H_2O_2 u zelenom (sive kolone) i belom (bele kolone) tkivu listova biljaka *P. zonale* nakon desetodnevnog izlaganja režimima: LL, LL+UV-B, HL i HL+UV-B. Prikazane su srednje vrednosti \pm SE ($n = 4-7$) izražene u $U\ g^{-1}\ FW$. Različita slova označavaju statistički značajne razlike ($P < 0.05$) u aktivnosti enzima između različitih režima zračenja i različitih tipa tkiva.

5. DISKUSIJA

5.1. Određivanje redoks-stanja Asc u listovima

Askorbat je jedan od najzastupljenijih metabolita u zelenim listovima, jer čini čak 10-19% od ukupnih organskih jedinjenja (*Noctor & Foyer 1998a; Gest et al. 2012*). Visoko redoks-stanje Asc je prisutno u zdravim biljkama, a niže vrednosti (niže od 0.85-0.95) ukazuju na poremećenu redoks-homeostazu i pojavu oksidativnog stresa (*Sanmartin et al. 2003; Foyer & Noctor 2011*). Jedan od preduslova za eksperimentalni rad ove disertacije, bio je da se optimizuju uslovi za tačno i precizno određivanje redoks koeficijenta Asc, $R_{kA} = 100\% \times \frac{[Asc]}{[Asc] + [DHA]}$.

Neizbežno izlaganje tkiva kiseoniku i međusobno mešanje sadržaja različitih subćelijskih odeljaka tokom procesa homogenizacije i ekstrakcije pro- i antoksidanata, može da bude izvor nastanka artefakata. Ilustracije radi, nakon 25 minutnog inkubiranja rastvora Asc sa $10 \mu\text{M Fe}^{2+}$ i Cu^{2+} na ledu, koncentracija Asc je bila umanjena za skoro 10%, slika 4.1. Prosečni sadržaj jona Cu^{2+} u biljkama je u opsegu 2-50 μg po g suvog tkiva (*Burkhead et al. 2009*). Pokazano je da niske koncentracije prelaznih metala (μM) mogu katalizovati neželjenu oksidaciju Asc tokom ekstrakcije (*Kanner et al. 1977; Buettner & Jurkiewicz 1996*).

Upravo zbog ovih svojstava Asc i nestabilnosti DHA u vodenom rastvoru (*Deutsch 2000; Valpuesta & Botella 2004; Green & Fry 2005; Debolt et al. 2007*), bilo je neophodno optimizovati uslove homogenizacije i ekstrakcije. Nakon testiranja različitih rastvora kiselina za ekstrakciju Asc, najbolji rezultati dobijeni su ekstrakcijom sa 1.5% MPA, koji sadrži 1 mM

EDTA. Tokom poslednje dve decenije, istraživači koji se bave ispitivanjima promena sadržaja i redoks-stanja Asc u biljkama pod stresom uglavnom su koristili 6% trihloro- ili trifluorosirćetnu kiselinu (*Kampfenkel et al.* 1994; *Bartoli et al.* 2006; 2009) ili 1-10% metafosfornu kiselinu (*Tausz et al.* 1996; *Sanmartin et al.* 2003; *De Pinto & De Gara* 2004; *Kärkönen & Fry* 2006; *Page et al.* 2012). Prednost upotrebe metafosforne kiseline u odnosu na trihlorosirćetnu je u tome što ona nema značajnu apsorbciju na 265 nm, tako da ne ometa spektrofotometrijsko određivanje Asc (u eseju baziranom na smanjenju A^{265} nakon dodatka komercijalne AO). Takođe, ona ima višu pKa vrednost od trihlorosirćetne kiseline, pa je pH rastvora blaže i ne dovodi do degradacije Asc (*Takahama & Oniki* 1992).

U literaturi je opisano više načina određivanja Asc HPLC metodama kuplovanim sa fluorimetrijskim ili UV-VIS fotodiodnim detektorima, koje imaju visoku osetljivost (*Pole et al.* 1990; 1996; *Bartoli et al.* 2006; 2009; *Page et al.* 2012; *Morina et al.* 2013). U eksperimentalnom radu ove disertacije bilo je potrebno da odabrani HPLC metod bude kompatibilan sa ekstraktima biljaka čiji su listovi bogati fenolnim jedinjenjima (poput muškatele, tamjanike, divizme). Poznato je da je redukovani Asc u stanju da reaguje sa fenoksi-radikalima, pri čemu se oksiduje (*Yamasaki et al.* 1997; *Takahama* 2004).

Dehidroaskorbat iz ekstrakata se može odrediti direktno, npr. fluorimetrijski nakon derivatizacije pomoću *o*-PDA (*Polle et al.* 1990, 1996), ili u obliku Asc, nakon prethodne redukcije pomoću DTT ili GSH na pH 7-8.5 (*Foyer et al.* 1983; *Takahama & Oniki* 1992; *De Pinto & De Gara* 2004; *Queval & Noctor* 2007; *Bartoli et al.* 2009). Uočeno je da je po dodatku DHA u ekstrakt muškatele, određena količina prisutnog Asc je bila za 20-30 % niža. Takođe, 5 minutna inkubacija ekstrakta sa 25 mM GSH, kao i sa 25 mM DTT, nije dovoljna za potpunu redukciju DHA. U istim ekstraktima je uočena i niža količina ukupnog askorbata, kao i niža količina redukovanog Asc. Slični rezultati su dobijeni u studiji *Queval-a* i *Noctor-a* (2007) u kojoj je pokazano da 30 minutna inkubacija 40 μ M Asc i 40 μ M DHA sa 1 mM DTT nije dovela do efikasne redukcije DHA. Postepeno povećavanje koncentracije DTT-a takođe nije dovelo do potpune redukcije DHA (sa 5 mM DTT-om redukovano je oko 66%, a sa 20 mM DTT-om samo 33% DHA), već je potpuno neočekivano, dovelo do degradacije Asc (najpre za oko 15%, a zatim i za oko 30%). Ovakvi rezultati mogu da se protumače bilo slobodno radikalskom reakcijom (*Queval & Noctor* 2007), bilo uspostavljanjem ravnoteže između oksidovanog i redukovanog oblika askorbata, pri čemu se deo DHA u uslovima

derivatizacije nepovratno degradira (hidrolizom laktonskog prstena, pododeljak 2.4.2.1). Na osnovu svega navedenog, odlučeno je da se redukovani Asc u ovoj tezi direktno određuje uspostavljenom hromatografskom metodom, a da se DHA u uzorku derivatizuje pomoću *o*-PDA odmah nakon homogenizacije, i zatim analizira HPLC-om kuplovanim sa fluorimetrijskom detekcijom.

Izračunat sadržaj Asc u zelenim listovima muškatele gajenim pod osvetljenjem od 250-300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PAR iznosio je oko 3.5 $\mu\text{g po g}$ svežeg tkiva, što se dobro poklapa sa rezultatima izmerenim u listovima biljaka *Arabidopsis* (*Bartoli et al.* 2006, *Page et al.* 2012), duvana (*Sanmartin et al.* 2003) i mladim listovima graška starog sedam dana (*De Pinto & De Gara* 2004). Redoks-koeficijent Asc od 98.1% je jedan od parametara koji ukazuje da su biljke rasle pod optimalnim uslovima, odnosno da nisu bile izložene oksidativnom stresu.

5.2. Simultano određivanje sadržaja fenolnih kiselina i flavonoida u listovima različitih biljnih vrsta

U literaturi su opisane brojne HPLC metode za analizu fenolnih jedinjenja. Međutim, one se uglavnom baziraju ili na razdvajanju fenola koji pripadaju istim podklasama, ili na analizi fenolnog profila određenih biljnih vrsta, npr. voća i povrća (*Häkkinen et al.* 1998; *Revilla et al.* 1998; *Toker et al.* 2001; *Nuutila et al.* 2002; *Kundu & Laskar* 2010; *Said et al.* 2010). Mnogo je manje studija koje se bave opisom metoda za analizu raznolikih fenolnih jedinjenja u različitom biljnom materijalu (*Crozier et al.* 1997; *Sakakibara et al.* 2003; *Shan et al.* 2005; *Majer et al.* 2014). U ovoj disertaciji bilo je neophodno razviti efikasan metod u kome bi uslovi ekstrakcije, hidrolize i razdvajanja bili optimizovani u cilju preciznog i istovremenog određivanja fenolnih jedinjenja prisutnih pre svega u listovima biljaka *P. zonale*, *P. coleioides*, *A. altissima* i *T. platyphyllos*.

Metodom, razvijenom u ovoj tezi, razdvojena su 42 različita standardna fenolna jedinjenja širokog spektra polarnosti, prisutnih u odabranim biljnim vrstama. Uspostavljena procedura je tačna i pouzdana, jer je tokom ekstrakcije očuvana struktura fenolnih jedinjenja, čak i u slučaju onih manje stabilnih, sklonih oksidaciji, poput galne i hlorogene kiseline (*Crozier et al.* 1997; *Antolovich et al.* 2000, *Merken & Beecher* 2000; *Stalikas* 2007). Za očuvanje strukture antocijana, u metanol upotrebljen za ekstrakciju dodata je 0.1%

hlorovodonična kiselina, s obzirom na to da je flavilijum-katjon stabilan samo na niskim pH. S druge strane, rastvarači koji sadrže više od 1% HCl dovode do parcijalne hidrolize acetilovanih antocijana iz ekstrakta (*Revilla et al.* 1998).

Upotrebljeni eluenati i elucioni gradijent su početno odabrani iz *Durst & Wrolstad* (2001), a zatim su optimizovani i modifikovani. Nakon probnih injektovanja i analiza standardnih rastvora, ustanovljeni su uslovi kojima je omogućeno istovremeno razdvajanje većeg broja fenolnih jedinjenja u jednom injektovanju. Komparacija spektara analita iz ekstrakata pre i posle hidrolize, olakšala je identifikaciju glikozida. Naime, raznolikost prirodnih fenolnih glikozida je velika (*Merken & Beecher* 2000; *Neill* 2002; *Winkel* 2004; *Vogt* 2010), te je nemoguće imati standardna jedinjenja za sve prisutne glikozide u ispitivnoj vrsti. Ukoliko je cilj da se jednom pristupačnom i ekonomičnom aparaturom (kakav je HPLC aparat kuplovan sa UV/VIS fotodiodnim detektorom) identifikuje što veći broj ovih jedinjenja, pomenuta prednost je opravdana. Takođe, prednost ove metode je njeno kraće trajanje (u odnosu npr. na metode predstavljene u *Sakakibara i saradnici* (2003) ili *Shan i saradnici* 2005), jer se za 40 min dobija fenolni profil ispitivanog ekstrakta.

Identifikacija analita je bila zasnovana na određivanju retencionih vremena i spektralnih karakteristika standardnih rastvora, dok je metod standardnog dodatka upotrebljen za konačnu potvrdu identifikacije. U slučaju glikozida čiji standardi nisu bili dostupni, nakon upoređivanja hromatograma pre i posle hidrolize, identifikacija je bazirana na retencionim vremenima, izgledu spektra i literaturnim podacima za analizirane biljne vrste (*Craig* 1998; *Toker et al.* 2001; *Kundu & Laskar* 2010; *Said et al.* 2010). Važan doprinos identifikaciji u takvim slučajevima dala su karakteristična jedinjenja prisutna u različitim plodovima (bobičasto voće, plavi patlidžan i sl.; ovi rezultati nisu prikazani).

Postupak pripreme uzoraka listova je dao zadovoljavajuće *recovery* vrednosti, tabela 4.3, što je slično ili bolje od rezultata dobijenih drugim metodama (npr. *Hertog et al.* 1992; *Häkkinen et al.* 1998; *Sakakibara et al.* 2003). Najčešće upotrebljavan način hidrolize glikozida fenolnih jedinjenja je kisela hidroliza, pomoću HCl, uz zagrevanje (*Hertog et al.* 1992, *Antolovich et al.* 2000; *Merken & Beecher* 2000, *Stalikas* 2007). Uspostavljanje optimalnog vremena hidrolize (u trajanju od 40 minuta) je esencijalno, jer uslovi koji su optimalni za raskidanje *O*-glikozidnih veza mogu da dovedu do izmene strukture drugih fenola-aglikona u ekstraktu (*Häkkinen et al.* 1998, *Antolovich et al.* 2000; *Nuutila et al.* 2002;

Stalikas 2007). Mana primenjenog postupka pripreme uzorka je niska *recovery* vrednost dobijena za kampferol, zbog dodavanja hloroforma. Odluka da se hloroform dodaje u ekstrakte je usledila nakon preliminarnih testiranja i injektovanja biljnih ekstrakata, jer je značajno doprineo „pročišćenju“ ekstrakta od lipofilnih supstanci (hlorofila, karotenoida, masnih kiselina, sterola, voskova i sl.), što je dalo bolju baznu liniju hromatograma, a izbegnuto je i nepotrebno „prljanje“ kolone. Na taj način je uštedeno vreme njenog čišćenja i ekvibracije između injektovanja uzoraka. Međutim, ovo je podrazumevalo dodatnu analizu kod fenolnih jedinjenja sa retencionim vremenom većim od 35 min.

U tabeli 4.4. su predstavljena najvažnija fenolna jedinjenja prisutna u listovima ispitivanih biljnih vrsta. Kod panaširanih vrsta nije bilo kvalitativnih razlika u fenolnim jedinjenjima prisutnim u belom i zelenom tkivu. Na osnovu podataka dostupnih u opisu prijave patenta, varijeteta „Ben Franklin“ (Craig 1998), urađena je preliminarna identifikacija glikozida Q i K (treba napomenuti da su analizirana i fenolna jedinjenja iz latica ove vrste, što je takođe pomoglo u identifikaciji). U listovima varijeteta *P. zonale* detektovane su veće količine C₆-C₁ fenola, odnosno hidroksibenzoevih kiselina i to pre svega *p*-HBA i GA, dok je značajno pomenuti i prisustvo hidroksicinamata i flavon-3-ola: *p*-CA i flavon-3-ola, K i Q. S tim u vezi, u suvim nadzemnim delovima biljaka *P. reniforme*, koje se koriste u tradicionalnoj afričkoj medicini, nakon ekstrakcije acetonom, otkriveno je prisustvo više hidrolizabilnih tanina, jedinjenja koja predstavljaju konjugate sa GA (Latte & Kolodziej 2000). I hidrolizabilni tanini sa elaginskom kiselinom (derivat GA) i nehidrolizabilni tanini (proantocijanidini) su nađeni u većim količinama u mnogim vrstama roda *Pelargonium* poput *P. cucullatum*, *P. graveolens*, *P. quercifolium* i *P. tomentosum* (Williams et al., 2000; Lalli 2005). Osim visokog sadržaja GA i tanina, u *P. reniforme* detektovano je i prisustvo Q i rutina, ali za razliku od *P. zonale*, ovde su detektovani C-glikozidi Ap i Lu (Latte & Kolodziej 2000; 2004). Opsežna analiza metanolnih ekstrakata 56 različitih vrsta roda *Pelargonium* je pokazala da su među flavonoidima dominantni flavonoli, i to Q, prisutan u svim vrstama, zatim K, prisutan u 50% vrsta i M, prisutan u 38% ispitivanih vrsta, dok se povremeno javlja i Lu i njegovi C-glikozidi (Williams et al. 1997; 2000; Saraswathi et al. 2011). Takođe, već pomenuta GA je bila prisutna u 62% ispitanih vrsta, PrCA u 38%, a u nekim vrstama je detektovana i slobodna elaginska kiselina (Williams et al. 2000). Prisustvo derivata *p*-CA, CA i CGA je takođe potvrđeno u listovima biljaka ovog roda (Saraswathi et al. 2011).

S druge strane, u listovima tamjanike nisu detektovani flavon-3-oli, a umesto njih, zastupljeni su glikozidi flavona, Ap i Lu (Lu u veoma niskim koncentracijama, te je izostavljen iz prikaza rezultata). Što se tiče hidroksicinamičnih kiselina, CA i njen derivat RA predstavljaju jedine hidroksicinamate u tamjanici. Ovo je u skladu sa prethodno pokazanim rezultatima gde RA i njeni derivati predstavljaju glavne rastvorne fenilpropanoide u listovima biljaka reda *Lamiales* i roda *Plectranthus*, dok flavon-3-oli nisu značajno zastupljeni (*Abdel-Mogib et al.* 2002; *Shan et al.* 2005; *Grayer et al.* 2010; *Porfirio et al.* 2010; *Vogt* 2010). U začinskim biljkama: origanu, ruzmarinu, bosiljku i žalfiji (porodica *Lamiaceae*) detektovane su GA, CA, RA, SyA, *p*-HBA i vanilinska kiselina, glikozidi i derivati Ap i Lu (*Shan et al.* 2005; *Hossain et al.* 2010), što se umnogome poklapa sa fenolnim profilom *P. coleoides*. U listovima različitih varijeteta bosiljka detektovano je prisustvo 11 antocijanina na bazi Cy i tri na bazi Pe (*Phippen & Simon* 1998). Glavni flavonoidi detektovani u listovima 14 vrsta roda *Ajuga*, porodica *Lamiaceae* bili su flavoni i to Ap, Lu, 6-hidroksiluteolin i glikozid acacetin (*Inomata et al.* 2013). Prema autoru dostupnoj literaturi, u ovoj disertaciji je po prvi put opisan fenolni profil u listovima *P. coleoides* biljaka.

U listovima *T. platyphyllos* sastav fenolnih jedinjenja je odgovarao prethodno opisanim (*Toker et al.*, 2001; *Majer et al.* 2014). U prezentovanoj studiji, udeli Q, K i M u ukupnom sadržaju flavon-3-ola u listovima lipe izloženim suncu je bio 90.7: 8.6: 0.8, dok su slični odnosi (70.7: 21.9: 7.4) dobijeni u studiji *Majer* i saradnici (2014). U analizama *Toker*-a i saradnika (2001), utvrđeno je prisustvo glikozida Q i K (M nije detektovan), gde je Q činio oko 62% od ukupnog sadržaja flavonoida. Veća količina HBA, posebno *Pr*cA otkrivena je u listovima srebrne lipe, *T. argentea*, a od ostalih fenolnih jedinjenja detektovani su: FA, *p*-CA, CGA, Cat i Q (*Demiray et al.* 2009). Kako u ispitivanim listovima *T. platyphyllos* GA nije detektovana, a tokom hidrolize je oslobođena veća količina Cy i Dp poreklom od proantocijanidina (*proc*ijanidin i *prod*elfinidin), pokazano je da su u listovima lipe dominantni nehidrolizabilni tanini, za razliku od listova muškatele.

Listovi kiselog drveta, *A. altissima*, su sadržali najraznovrsnija fenolna jedinjenja, zastupnike najviše podklasa, tabela 4.4. Naime, jedino je u ovoj vrsti detektovano prisustvo i flavona i flavon-3-ola. Ovo je u skladu sa rezultatima grupe autora *Said* i saradnici (2010), koji su opisali četiri 7-*O*-glikozida Ap i Lu i sedam flavon-3-ola na bazi K i Q u listovima biljaka *A. excelsa*. Konkretno, u *A. altissima* je pokazano prisustvo više glikozida K, Q i L,

dok je u vrstama *A. triphysa* i *A. glandulosa* i otkriveno prisustvo Ap glikozida (Kundu & Laskar 2010). U kori stabla biljne vrste *A. integrifolia* detektovan je i flavanon naringenin i fenolne kiseline: FA, *p*-CA i PrcA (Kundu & Laskar 2010). Na osnovu detaljnog pregleda literature, u ovoj disertaciji je po prvi put pokazano prisustvo antocijanina u lišću *A. altissima*.

Upoređujući dobijene rezultate, najveći antioksidativni kapacitet (TAK, Rice-Evans *et al.* 1996; 1997) imali su metanolni ekstrakti listova *T. platyphyllos*, zatim *P. zonale* „FN“, *A. altissima*, pa preostala dva varijeteta muškatile i najniži, ekstrakti listova *P. coleoides*. Od toga, u svim vrstama sem *P. coleoides*, najveći doprinos TAK-u potiče od HBA (60-84%), dok su u slučaju *P. coleoides* najefikasniji antioksidanti bili hidroksicinamati i favanoli (po 42.9%). Kada se posmatra udeo ostalih fenolnih podklasa u TAK-u, bez učešća HBA, uočavaju se značajne razlike između ispitivanih vrsta. Naime, udeo flavon-3-ola, prvenstveno Q, je najveći u listovima lipe (85%), dok su u muškatlama najefikasniji antioksidanti flavanoli (50-70%) i flavon-3-oli (25-35%), zavisno od varijeteta. U listovima kiselog drveta, kada se ne uračunaju HBA, doprinos HCA, flavanola i flavon 3-ola TAK-u je međusobno sličan i iznosi: 40%, 22% i 34%. Zbog izuzetno male količine antocijana po masi svežih listova, njihov udeo u TAK-u je izuzetno mali (<0.5%). Kod svih ovih poređenja, treba imati u vidu odnos mase svežeg tkiva po površini lista, koji je kod biljaka *P. coleoides* najveći (deblji listovi sa većim sadržajem vode), dok su listovi kiselog drveta i lipe tanji, sa manjim sadržajem vode.

Na osnovu dobijenih rezultata teško je povezati otpornost kiselog drveta na različite negativne uticaje spoljašnje sredine sa sadržajem fenolnih jedinjenja u njemu. Rezultati koji se odnose na lipu svakako ne idu u prilog njene osetljivosti, kako je bilo pokazano prethodno (Kropczynska *et al.* 2002). Ubedljivo najveći odnos Q/K (10.6) među svim ispitanim vrstama je detektovan u listovima lipe, što ovu vrstu čini veoma dobro adaptiranom na visok intenzitet sunčeve svetlosti (Tattini *et al.* 2005; Agati *et al.* 2009; Brunetti *et al.* 2013; Majer *et al.* 2014). Takođe, u listovima kiselog drveta izmereni sadržaj Lu je bio veći od sadržaja Ap. Ukratko, sadržaj fenolnih jedinjenja sa *orto*-dihidroksil-supstituisanim aromatičnim prstenom, poput GA, PrcA, CA, RA, CGA, Q, M, Lu, Cy i Dp bio je najveći u listovima lipe, a zatim kiselog drveta i muškatile „FN“, a najniži u listovima muškatile „FH“. Ovim rezultatima je, takođe, pokazano da distribucija fenolnih jedinjenja u listovima panaširane muškatile ne zavisi od položaja dela lista (margina ili središte), već isključivo od tipa tkiva, tj. hlorofilnog i ahlorofilnog.

5.3. Antioksidativni sistem u zeleno-belim listovima *P. zonale*

Panaširani listovi muškatele su u ovoj disertaciji poslužili kao odličan model-sistem za proučavanje razlika i veze između autotrofnog, izvor tkiva i heterotrofnog, uvir tkiva. Takođe, ovaj eksperimentalni model je omogućio ispitivanje uticaja fotosinteze, kao glavnog izvora ROS u biljkama, na ostale važne metaboličke sisteme u ćelijama, poput antioksidativnog i sekundarnog metabolizma. Indukovanjem pojačane akumulacije ROS u fotosintetskom ETL, bilo izlaganjem biljaka povišenom intenzitetu sunčeve svetlosti, bilo upotrebom parakvata koji ubrzava stvaranje $O_2^{\bullet-}$ na PS I, moguće je pratiti odgovor antioksidativnog sistema belog tkiva i na taj način zaključivati o prenosu signala između ova dva tipa tkiva u istom listu.

5.3.1. Akumulacija ROS u zelenom i belom tkivu listova *P. zonale*

S obzirom na to da je zeleno tkivo, kao fotosintetski aktivno, glavni izvor ROS u listovima, povišen nivo karbonilovanih proteina detektovan u ovom tkivu je bio očekivan. Međutim, u biljkama gajenim pod optimalnim uslovima za rast, povišena akumulacija H_2O_2 nije detektovana ni u zelenom, ni u belom tkivu listova, kao ni u potpuno zelenim, nepanaširanim listovima. Ovi rezultati ukazuju da, i pri optimalnim uslovima za rast, u zelenom tkivu listova dolazi do većeg stvaranja ROS, poput singletnog kiseonika i $O_2^{\bullet-}$, koji mogu da izazovu trenutnu oksidaciju bočnih aminokiselinskih ostataka (*Stadtman & Levine* 2003), ali da do povećane akumulacije H_2O_2 ne dolazi, jer se on efikasno neutrališe u oba tipa tkiva.

Ni u belim segmentima listova zeleno-belog panaširanog mutanta *Arabidopsis* *var* 2 nije pokazana akumulacija ni H_2O_2 ni $O_2^{\bullet-}$ (*Kato et al.* 2009; *Miura et al.* 2010). Kod ovog mutanta, panaširanost je uslovljena nedostatkom FtsH2 hloroplastne proteaze uključene u degradaciju oksidovane D1 subjedinice PS II. Usled onemogućene reparacije D1, PS II postaje nefunkcionalan i u zelenim segmentima listova dolazi do pojačane akumulacije $O_2^{\bullet-}$ i H_2O_2 (*Kato et al.* 2009).

Koji će proteini u prisustvu viška ROS ili smanjene antioksidativne aktivnosti biti karbonilovani, zavisi od samog proteina, biljne vrste, pa čak i od organele (*Johansson et al.* 2004; *Nyström* 2005). Naime, pokazano je da se u *Arabidopsis*u značajna karbonilacija dešava

u hloroplastima, a da su mete proteinske podjedinice Rubisco-a, hloroplastne ATP-aze, kompleksa za stvaranje vode i Rubisco aktivaze, dok zastupljenost ovih proteina u ćeliji, kao ni svetlosni režim nisu određujući činioci (Johansson *et al.* 2004). Primećeno je da nivo karbonilacije može da raste, iako se količina datog proteina ne smanjuje, što je posebno interesantno, s obzirom na činjenicu da se karbonilovani proteini veoma brzo degradiraju u proteazomima (Nyström 2005). Kako nivo karbonilacije zavisi i od stadijuma razvića i starosti biljke/lista, smatra se da karbonilacija može da predstavlja sekundarni signal (primarni su ROS) u regulisanju životnog ciklusa i razvoja biljke (Johansson *et al.* 2004; Suzuki *et al.* 2012). Na ovaj način gledano, povišeni nivo karbonilacije u zelenom tkivu ne mora da predstavlja samo marker oksidativnog stresa. Da bi se izveo pravilan zaključak o pojavi oksidativnog stresa, i ostali parametri, koji će biti diskutovani u narednim poglavljima, moraju biti uračunati i razmotreni

5.3.2. Konstitutivni činioci antioksidativnog sistema zelenog i belog tkiva listova biljaka *P. zonale* su različiti

5.3.2.1. Askorbat i glutation: sadržaj i distribucija

Askorbat i glutation predstavljaju najzastupljenije i najvažnije neenzimske antioksidante u biljkama. Oko 10% fotoasimilata se usmerava u put biosinteze Asc (Noctor & Foyer 1998a), te je dvostruko veći sadržaj Asc izmeren u zelenom, u odnosu na belo tkivo listova biljaka *P. zonale*, bio očekivan. S druge strane, u belom tkivu listova muškatile izmeren je za oko 66% veći sadržaj glutaciona u odnosu na zeleno tkivo. Ovakvi rezultati navode na zaključak da, kada se radi o neenzimskim antioksidantima, autotrofno tkivo se više oslanja na askorbat, dok je glutation važniji u heterotrofnom (koren i seme kod biljaka).

Ilustracije radi, u biljkama pasulja, sadržaj Asc u listovima bio veći nego u korenu i to oko 10 puta (Cuyppers *et al.* 2001), a oko 5 puta u slučaju listova i korena divizme (Morina *et al.* 2010). U planinskim biljnim vrstama, čak 19% sadržaja ukupnih organskih jedinjenja u zelenim listovima čini Asc, i za razliku od većine viših biljaka u kojima je sadržaj Asc u opsegu 1-20 $\mu\text{mol g}^{-1}_{\text{FW}}$, kod planinskih vrsta može da dostigne i 45 $\mu\text{mol g}^{-1}_{\text{FW}}$ (Cuyppers *et al.* 2001; Veljović Jovanović *et al.* 2001, Bartoli *et al.* 2006; Morina *et al.* 2010; 2013; Gest *et*

al. 2012; Colville et al. 2015). S druge strane, u studiji Colville-a i saradnika (2015) ispitivan je sadržaj neproteinskih tiola u raznim vrstama mahunarki, i pokazano je da je od njih 66, u 47 najveća koncentracija glutaciona nađena u semenu (prosečno 71%; u listu 16% i u korenu 13%), u 6 vrsta glutaciona je bilo najviše u korenu (prosečno 46%; u semenu 29% i u listovima 24%), a samo u 13 vrsta najveći sadržaj glutaciona izmeren je u listovima (prosečno 53%; u semenu 33% i u korenu 14%). To znači da se u svih 66 vrsta, u heterotrofnom tkivu nalazilo prosečno 76% od ukupne količine glutaciona u biljci. Sadržaji GSH određeni u listovima kukuruza, Arabidopsisa i duvana su u opsegu od 200-370 nmol g⁻¹_{FW}, što odgovara vrednostima određenim u listovima muškatle (Veljović Jovanović et al. 2001; Masi et al. 2002; Sanmartin et al. 2003; Quevall & Noctor 2007).

Kada su u pitanju panaširane vrste, koncentracija Asc u zelenim segmentima listova begonije (*Coleus blumei*) je bila čak 10× viša nego u belim segmentima listova (*Peltzer et al. 2002*). U zelenim i belim segmentima listova *C. blumei*, redoks koeficijent Asc je iznosio oko 45-50%, odnosno 10-30%, što je u oba slučaja mnogo niže od RkA izmerenih u listovima *P. zonale*. Tri puta veći sadržaj GSH u belom tkivu u odnosu na zeleno je izmeren u listovima biljaka *C. blumei* izlaganih nižim temperaturama (10 °C; *Peltzer et al. 2002*).

U zelenim mezofilnim ćelijama listova *P. zonale* Asc je bio najzastupljeniji u peroksizomima, jedru, zatim u hloroplastima i mitohondrijama, citosolu, a najmanja u vakuolama i apoplastu, što je slično poretku dobijenom za listove biljaka duvana gajenih na 250 μmol m⁻² s⁻¹ PAR (*Zechmann et al. 2011*). Značajna je lokalizacija Asc u citosolu belih mezofilnih ćelija *P. zonale*, u odnosu na zelene. Kada se uzme u obzir zapremina ispitivanih organela u zelenim ćelijama muškatle, izuzetno visoka koncentracija Asc (90-80 mM) je izračunata za mitohondrije i peroksizome, što je više nego što je izračunato za mezofilne ćelije Arabidopsisa izlaganih PAR-u od 700 μmol m⁻² s⁻¹, gde koncentracija u peroksizomima i mitohondrijama iznose 28.8 i 10.4 mM, redom (*Zechmann 2011*). Takođe, u hloroplastima zelenih ćelija je izračunata dvostruko niža koncentracija Asc nego u plastidima belih ćelija, gde je koncentracija od 8.2 mM slična onoj koja se odnosi na prethodno pomenute biljke Arabidopsisa (10.8 mM). Ova vrednost je malo niža od vrednosti dobijene biohemijskim metodama (10-30 mM, a u stromi oko 50 mM) (*Foyer et al. 1983; Noctor & Foyer 1998a; Asada 2000; Smirnoff 2000*). Dakle, veća ukupna koncentracija askorbata u zelenim segmentima listova u odnosu na bele, bazira se na većim koncentracijama askorbata u

mitohondrijama, jedru i peroksizomima. Ćelijski odeljci za čije funkcionisanje je jako važno prisustvo askorbata: plastidi i citosol u zelenim mezofilnim ćelijama imaju nižu koncentraciju Asc, u odnosu na bele ćelije.

Poznato je da biosinteza Asc ne zavisi direktno od fotosinteze, jer Asc nastaje i u fotosintetski aktivnim i u fotosintetski neaktivnim tkivima (*Noctor & Foyer 1998a*). Enzim GalLDH je prisutan u oba tipa tkiva listova panaširane *P. zonale*, mada je veća količina detektovana u belom tkivu, dok je u zelenom tkivu nađen veći broj transkripata ovog enzima. U Arabidospisu, duvanu, slatkom krompiru i karfiolu enzim GalLDH je kodiran jednim genom sa nuklearne DNK (*Bartoli et al. 2005*). Imunoblot analizom, primarno antitelo se vezalo za tri proteinske subjedinice (Mm: 68, 64 i 57 kDa), dok se uočeni i produkti degradacije na 45 i 33 kDa. Primarni produkt translacije GalLDH ima molekulsku masu oko 68 kDa, dok post-translacionim isecanjem N-terminusa nastaje funkcionalni protein od 56–58 kDa (*Bartoli et al. 2000; Schertl et al. 2012*). Imunoblot analizom GalLDH iz kukuruza, pšenice, soje, Arabidospisa i suncokreta, određena je Mm od 64 kDa (*Bartoli et al. 2005*).

Veća zastupljenost GalLDH u belom tkivu listova muškatile može da se objasni i odsustvom proteina uključenih u fotosintetske procese, smanjenom zapreminom citosola i nedostatkom peroksizoma, te je zastupljenost mitohondrijskih proteina u ukupnom sadržaju proteina veća. U tabeli 4.7 vidi se da se zapreminska zastupljenost mitohondrija u belim i zelenim mezofilnim ćelijama ne razlikuje.

Zastupljenost glutaciona po organelama i u zelenim i u belim mezofilnim ćelijama *P. zonale* je imala isti poredak: najviše u mitohondrijama (> 50%), zatim u jedru (18% i 28%) i citosolu (10% i 20%), a najmanje u apoplastu (0.2% i 0.3%). Važno je napomenuti da su koncentracije glutaciona u mitohondrijama, jedru, citosolu i plastidima belih mezofilnih ćelija biljaka *P. zonale* od 1.5 do 6 puta veće nego u zelenim ćelijama. Iznenadujuće je da je u plastidima zelenih i belih ćelija bilo samo 1-1.5% glutaciona, mada se ovaj podatak dobro poklapa sa skorašnjim rezultatima za Arabidopsis, gde je udeo glutaciona u hloroplastima bio takođe nizak (u opsegu od 2.8-6.3%; *Zechmann et al. 2008; Han et al. 2013; Heyneke et al. 2013; Tolin et al. 2013*). Poredak koncentracija glutaciona u zasebnim ćelijskim odeljcima oba tipa tkiva odgovara onom prikazanom za mezofilne ćelije Arabidopsisa (*Zechmann et al. 2008; Queval et al. 2011; Han et al. 2013; Heyneke et al. 2013; Tolin et al. 2013*). U apoplastu Arabidopsisa glutacion ili nije detektovan ili su izmerene izuzetno niske koncentracije (<1%)

(Vanacker et al. 1998; Pignocchi et al. 2003; Zechmann et al. 2008; Noctor et al. 2012). Poslednje decenije pokazano je da se u plazminoj membrani, ćelijskom zidu i tonoplastu nalaze γ -glutamil-transpeptidaze (GGT1-4; EC 2.3.2.2) koje započinju degradaciju GSSG (Masi et al. 2007; Ferretti et al. 2009; Destro et al. 2010). U skladu sa tim su i rezultati tima Antonia Masija, koji ukazuju na prisustvo glutaciona u apoplastu *ggt1*⁻ mutanata Arabidopsisa (Masi et al. 2007; Ferretti et al. 2009; Tolin et al. 2013).

Najveći sadržaj glutaciona u mitohondrijama, u odnosu na ostale ćelijske odeljke, je pokazan i u listovima *Cucurbita pepo* (Müller et al. 2004), ali i u životinjskom tkivu (Huster et al. 1998) i u kulturama sisarskih ćelija (Söderdahl et al. 2003). Ovi podaci govore o važnoj ulozi glutaciona u heterotrofnim organima i organelama.

5.3.2.2. Enzimski antioksidanti

Enzimске komponente Asc-GSH ciklusa su različito eksprimirane u zelenom i belom tkivu listova biljaka *P. zonale*. S obzirom na to da su aktivnosti solubilnih izofomi APX (sAPX i cAPX), DHAR i GR bile veće u belom tkivu, zaključuje se da u belom tkivu listova *P. zonale* Asc-GSH ciklus aktivniji u odnosu na zeleno tkivo. Tilakoidna izoforma APX je detektovana samo u zelenom tkivu, što je posledica odsustva tilakoidnih struktura u plastidima belog tkiva.

Dvostruko veća aktivnost solubilnih APX, MDAR detektovana je i u belom tkivu listova biljaka *Coleius blumei* (Peltzer et al. 2002). Aktivnost GR je bila veća u belim nego u zelenim segmentima listova *C. blumei* gajenih na 10 °C, dok u biljkama gajenim na 35 °C nije nađena razlika u aktivnosti. U mutantu *var2*, koji predstavlja specijalan slučaj, jer je mutacija odgovorna za panaširanost povezana sa pojačanom produkcijom ROS u zelenom tkivu listova, sAPX je bila više eksprimirana i zastupljena u belom tkivu, a tAPX je bila više zastupljena u zelenom (Miura et al. 2010). Takođe, u *im* mutantu gde je panaširanost ima drugačiji uzrok, detektovano je više transkripta sAPX u belom nego u zelenom tkivu (Aluru et al. 2009). U istom mutantu, MDAR je bila više eksprimirana u zelenom tkivu, dok je DHAR bila suprimirana u belom tkivu (Aluru et al. 2009).

Manja aktivnost Asc-GSH ciklusa u zelenom tkivu, kompenzovana je četiri puta većom aktivnošću i količinom CAT u odnosu na belo tkivo. Peroksizomi u belim mezofilnim

ćelijama nisu bili uočeni TEM-om, što može da se dovede u vezu sa nepostojanjem fotosintetske aktivnosti, pa samim tim i nepostojanjem fotorespiracije u ovom tkivu. Ovo je u suprotnosti sa rezultatima koji se odnose na belo tkivo listova *im* mutanta, u kojem su detektovani transkripti Rubisco-a i CAT1, dok su transkripti CAT3 bili suprimirani (Aluru et al. 2009). Kako je u belom tipu tkiva listova *P. zonale* izmerena niska aktivnost CAT, potrebno je obaviti specifičnije analize TEM-om, kako bi se definitivno potvrdilo odsustvo ovih važnih organela za detoksikaciju. Pitanje o prisustvu CAT u drugim organelama biljne ćelije, sem u peroksizomima, je i dalje otvoreno. Nekoliko studija govori o katalaznoj aktivnosti u citosolu, mitohondrijama i hloroplastima (Scandalios et al. 1997; Mhamdi et al. 2010b).

Trake na nativnom elektroforegramu koje odgovaraju Cu/ZnSOD i MnSOD su slične onima pokazanim u radu Miura i saradnici (2010). Tip FeSOD nije detektovan u listovima muškatle. U okviru podklase *Rosidae*, kojem propada i porodica *Geraniaceae*, izoforme FeSOD su detektovane u pojedinim vrstama redova *Malpighiales*, *Fabales*, *Brassicales* i *Sapindales* (Niewiadowska et al. 1997; Alscher et al. 2002; Mittler 2004). Na osnovu saznanja autora ove disertacije, ovo je prvi put da je ispitivano prisustvo FeSOD, ali i ostalih SOD izoformi u biljnim vrstama porodice *Geraniaceae*. Detektovane izoforme MnSOD u listovima *P. zonale* imaju Mm od 40-62 kDa, što se dosta dobro uklapa sa Mm (od oko 50 kDa) MnSOD izoforme, koja je detektovana u listovima metvice (*Nepeta* spp.; Dmitrović et al. 2015). Dve trake koje predstavljaju Cu/ZnSOD izoforme po molekulskim masama od 16 i 18 kDa ulaze u opseg Mm od 16.3 do 22.0 kDa, što je specifično za Cu/ZnSOD izoforme detektovane u listovima Arabidopsisa, krompira i metvice (Momčilović et al. 2014; Dmitrović et al. 2015).

Aktivnost ukupnih SOD je bila veća u belom tkivu biljaka *P. zonale*, zahvaljujući povećanoj aktivnosti Cu/ZnSOD izoformi i MnSOD izoforme sa Mm oko 62 kDa. Ovakav rezultat se poklapa sa prethodno dobijenim za mutante *var 2* Arabidopsisa, gde je u belom tkivu pokazana značajno veća ekspresija gena koji kodiraju citosolnu i hloroplastnu izoformu Cu/ZnSOD, kao i veća zastupljenost njihovih proteinskih produkata i njihove aktivnosti (Miura et al. 2010). Takođe, u belim segmentima listova *im* mutanta Arabidopsisa i citosolna i hloroplastna Cu/ZnSOD su pojačano eksprimirane (Aluru et al. 2009).

U belom tkivu listova *P. zonale* izmerena je blago povišena aktivnost POD enzima izražena po masi svežeg tkiva, u odnosu na zeleno tkivo. Ovo se može povezati sa činjenicom da je zapremina vakuole u belim mezofilnim ćelijama bila za 60% veća nego u zelenim. Vakuola je glavno mesto u kome su locirane POD, pored apoplasta, i u koje se deponuju i fenilpropanoidi i flavonoidi (Takahama 2004; Ferreres et al. 2011). U oba tipa tkiva listova muškatle brzine reakcije POD sa fenolnim ko-supstratima je bio sledeći: Q>FA>Gv>CA>CGA >Cat. Peroksidaze III klase, izolovane iz biljaka *Catharanthus roseus* su imale najveći afinitet za K, zatim za neohlorogenu kiselinu (izomer CGA), Q, CA, a najmanji za FA (Ferreres et al. 2011). Jonski vezane POD za ćelijski zid korena graška su takođe imale veći afinitet za FA, a zatim za CA i CGA (Kukavica et al. 2012).

Ekspresiji POD u zelenom i belom tkivu listova panaširanih mutanata nije jasno razgraničena. U slučaju *var2* mutanta *Arabidopsis* u belom tkivu je otkrivena 5-10 puta pojačana ekspresija četiri izoforme POD, u odnosu na zeleno tkivo (Miura et al. 2010), dok su u belom tkivu listova *im* *Arabidopsis* neke izoforme POD bile pojačano eksprimirane (i do 10×) u belom, a neke u zelenom tkivu listova (Aluru et al. 2009).

Upotreba genetski transformisanih biljaka u proučavanju biohemije biljaka može da pomogne razumevanju uloga komponenata antioksidativne zaštite, ali i sagledavanju načina kojima biljne ćelije kompenzuju nedostatke određenih komponenti. Mutanti biljaka duvana, u kojima je smanjena aktivnost APX skoro na trećinu u odnosu na genetski neizmenjene biljke duvana, *wt*, (sa kojima može da se uporedi zeleno tkivo muškatle) pokazuju izražen porast aktivnosti CAT (+1.5×) i GR (+2×), kao i sadržaja Asc (+3×) i GSH (+8×) u odnosu na *wt* biljke (Rizhsky et al. 2002). S druge strane, mutanti duvana koji imaju samo 15% katalazne aktivnosti u odnosu na *wt* osim što imaju izražena oštećenja listova čak i kada se biljke gaje na 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PAR-a, pokazuju 10× veću količinu GSH, 6× količinu Asc, blago povišenu aktivnost GR, 2× veću aktivnost GPX, 2.5× MDAR i 1.5× veću aktivnost APX u odnosu na *wt* biljke (Rizhsky et al. 2002). Studija Veljović Jovanović i saradnika (2001) je izučavala antioksidativni profil mutanata *Arabidopsis*: *vtc1*, koji imaju za 70% niži sadržaj totalnog askorbata u odnosu na *wt*, ali koji zauzvrat imaju za oko 30% povišen sadržaj ukupnog glutaciona, oko 3× veću aktivnost POD, 50% veću ekspresiju cAPX i oko 5× veću aktivnost cAPX. S druge strane, aktivnosti GR, DHAR i CAT su slične u *vtc1* mutantima i *wt* biljkama,

a redoks stanje Asc i GSH i izmerena količina H₂O₂ su identične u ova dva genotipa (*Veljović Jovanović et al.* 2001).

5.3.3. Stimulacija Melerove reakcije sunčevom svetlošću i parakvatom aktivira komponente Asc-GSH ciklusa zelenog i belog tkiva listova biljaka *P. zonale*

Izlaganjem listova *P. zonale* intenzivnoj sunčevoj svetlosti (sa podnevnim maksimumom od oko 2000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PAR, koji predstavlja višak ekscitona koji mogu biti efikasno konvertovani u elektrone i transportovani fotosintetskim elektronskim transportom do NADP⁺) očekivan je nastanak oksidativnog stresa u zelenom tkivu, poreklom od O₂⁻ koji nastaje u Melerovoj reakciji i njegovog produkta, H₂O₂ koji takođe nastaje i u fotorespiraciji u peroksizomima (*Noctor et al.* 2002a). Upotrebom parakvata (1-100 μM) stimuliše se Melerova reakcija, pa se veoma često koristi u studijama u kojima je cilj da se izazove oksidativni stres u funkcionalnim hloroplastima (*Yosimura et al.* 2000; *Rizhsky et al.* 2002; *Murgia et al.* 2004; *Kangasjärvi et al.* 2008; *Scarpeci et al.* 2008). Ovo se zasniva na poznatom svojstvu Pq⁺ da stvara O₂⁻ na PS I osvetljenih hloroplasta, preko autokatalizovane ciklične oksidacije (konstanta brzine je $7.7 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) (*Asada* 2000; *Vicente et al.*, 2001). Ovde treba imati u vidu da Pq zarobljava gotovo sve elektrone koji se proizvode na PS I, odnosno da ga skoro 100% linearnog elektronskog transporta redukuje (*Asada* 2000). Kako belo tkivo listova ne poseduje funkcionalne hloroplaste, a ni peroksizomi nisu bili uočeni, očekivan je manji oksidativni pritisak i manja akumulacija ROS, u odnosu na zeleno tkivo.

Posmatrajući dinamiku promena enzimskih aktivnosti uočava se da su aktivnosti nekih enzima, poput GR i CAT već nakon nakon sat vremena dostigli maksimum, dok su aktivnosti APX, DHAR i POD dostigli maksimume u podne, kad je intenzitet sunčevog zračenja bio najveći. Promene aktivnosti APX, DHAR, GR i POD su imale isti trend u oba tkiva. U zelenom tkivu, porast GR aktivnosti prvog sata se podudara sa porastom sadržaja GSH i smanjenjem sadržaja GSSG, odnosno poboljšanjem RkG, kao što se porast aktivnosti DHAR i APX u četvrtom satu može povezati sa očuvanjem redoks-stanja Asc u ovom tkivu. S druge strane, iako su aktivnosti APX i DHAR u belom tkivu porasle već prvog sata, došlo je do smanjenja RkA na račun povećanja sadržaja DHA. Iako je zeleno tkivo bilo pod većim oksidativnim pritiskom zbog fotosinteze, redoks-stanje Asc i GSH je bilo više u odnosu na

belo tkivo. Interesantno je da nagli porast količine Asc u zelenom tkivu nakon prvog sata, nije bio ispraćen u belom tkivu, dok su se porast sadržaja GSH i aktivnosti APX, DHAR i GR podudarali u oba tkiva. Aktivnost cAPX, koja čini glavninu solubilnih izoformi u belom tkivu, je počela da raste bar sat vremena pre nego u zelenom. Poznata je činjenica da se citosolne izoforme APX u Arabidopsisu, APX1 i APX2, eksprimiraju već nakon 15 min izlaganja biljaka izuzetno visokom intenzitetu PAR-a ($2000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), kako posledica promene redoks stanja PQ, što je praćeno i akumulacijom H_2O_2 (Karpinski *et al.* 1997). Pomenuta studija ukazuje i da redoks-stanje glutaciona ima uticaja na ovaj mehanizam. Nagli porast RkG u zelenom tkivu ispitivanih biljaka *P. zonale* nakon prvog sata može da privremeno „uspori“ ekspresiju APX u zelenom tkivu, za razliku od belog, gde je uočen blagi pad RkG i pad RkA, koji mogu biti signali za značajnu ekspresiju citosolnih APX. Nakon izlaganja sunčevoj svetlosti porast aktivnosti CAT i MDAR i sadržaja Asc bili su jedini specifičan odgovor antioksidativnog sistema u zelenom tkivu. Pomenuti porast aktivnosti CAT i POD nakon sat vremena izlaganja svetlosti u zelenom tkivu, može da ukaže na pojačanu produkciju H_2O_2 u fotorespiraciji. Takođe, porast sadržaja Asc u zelenom tkivu odmah nakon sat vremena izlaganja se podudara sa aktiviranjem Kalvin-Bensonovog ciklusa i sintezom heksoza, prekursora za sintezu Asc. Porast sadržaja Asc i aktivnosti MDAR prvog sata samo u zelenom tkivu ukazuje na značaj zaštitne uloge voda-voda ciklusa koji uklanja $\text{O}_2^{\cdot-}$ sa PS I i od njega nastao H_2O_2 , uz očuvanje adekvatnog ATP/NADPH odnosa za asimilaciju CO_2 (Asada 2000). Efikasno uklanjanje H_2O_2 je neophodno i za održanje funkcionalnosti Kalvin-Bensonovog ciklusa (Kaiser 1979; Baier & Dietz 2005; Dietz & Pfannschmidt 2011)

Tokom izlaganja biljaka duvana povišenom intenzitetu svetlosti ($360 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PAR) tokom šest dana aktivnosti CAT, DHAR i GR nisu menjale (Gechev *et al.* 2003). Aktivnost MDAR u listovima pomenutog duvana je bila povišena prvog dana da bi se potom vratila na početnu, a jedino se aktivnost APX povećavala postepeno tokom tretmana kao i jedna izoforma POD. Kada se porede rezultati dobijeni u ovoj disertaciji sa drugim studijama, treba imati u vidu da su listovi biljaka muškatle bili odsećeni, što predstavlja dodatni stres u smislu povređivanja i smanjenog uvira metabolita, ali i da su bili izloženi i UV-A i UV-B zračenju (podnevni maksimum je bio: UV-A $\sim 45 \text{ W m}^{-2}$, UV-B $\sim 15 \text{ W m}^{-2}$).

Za razliku od reakcije izazvane sunčevim zračenjem, sadržaj Asc u zelenom tkivu se nije menjao tokom tretmana Pq-om, dok je u belom tkivu Asc i RkA porastao već nakon

prvog sata. Dinamika promena GSH, GSSG i RkG u zelenom tkivu listova je bila ista i pri izlaganju svetlosti i pri tretmanu sa Pq-om. Specifično za tretman Pq-om u odnosu na odgovor listova koji su istovremeno bili izloženi sunčevom zračenju, APX (u oba tkiva) i CAT (u zelenom tkivu) su opadale tokom prvog sata. Generalni zaključak je da je na tretman Pq značajnije odgovorilo belo tkivo, što podrazumeva brzim porastom aktivnosti DHAR, GR, POD i MDAR, porast RkA i smanjenje RkG. Prvi sat inkubiranja sa Pq-om je u zelenom tkivu listova muškatile doveo do pada aktivnosti enzima uključenih u voda-voda ciklus u hloroplastima: APX i MDAR, i ključnog enzima za uklanjanje H₂O₂ u peroksizomima: CAT. Ovakav rezultat se uklapa sa činjenicom da je produkcija ROS bila značajno viša u listovima tretiranim Pq-om u odnosu na one koji su istovremeno izlagani samo sunčevom zračenju. Smanjenje aktivnosti APX u zelenom tkivu može biti posledica inhibicije sAPX usled smanjene brzine regeneracije Asc ili akumulacije H₂O₂ (Nakano & Asada 1987; Miyake & Asada 1992; Schigeoka et al. 2002; Ishikawa & Shigeoka 2008). Nepromenjen sadržaj Asc, kao vrednost RkA tokom izlaganja Pq-u u zelenom tkivu, mogao bi da se objasni prethodno dobijenim rezultatima da je Asc značajno manje zastupljen u hloroplastima.

Generalno, sadržaji Asc i GSH, koji su određeni u listovima izlaganih Pq, su bile niži u odnosu na sadržaje određene u listovima istovremeno izlaganim sunčevoj svetlosti. Aktivnosti CAT i GR u zelenom tkivu, i aktivnosti APX u oba tkiva listova muškatile izlaganih sunčevom zračenju tokom jednog, odnosno četiri sata, bile su dvostruko veće od onih izlaganih Pq tokom istog vremena. S druge strane, dvostruko veće aktivnosti POD i tri puta veće aktivnosti DHAR nađene su u belom tkivu listova muškatile nakon izlaganja Pq, u poređenju sa listovima istovremeno izlaganim sunčevoj svetlosti. Značajan je rezultat da su POD koje su odreagovale na prisustvo Pq u listovima *P. zonale* bile locirane isključivo u belom tkivu. U studiji autorke Scarpeci i saradnika (2008) dvonedeljne biljke Arabidopsisa tretirane su 50 µM Pq i tokom 6 sati aktivnosti GR, SOD i CAT se nisu menjale, APX je opala za 25% nakon 4 i 6 sati. Genetski transformisane biljke duvana sa povećanom ekspresijom DHAR imaju veću toleranciju na tretman parakvatom transformisane (Lee et al. 2007). Ovakav rezultat, kao i u slučaju muškatile, ukazuje na važnost DHAR u održavanju redoks-stanja Asc tokom stimulisane Melerove reakcije.

Na osnovu odgovora antioksidativnog sistema specifičnog za druge organele, osim hloroplasta (POD i CAT npr.) može da se zaključi da je redoks-homeostaza i u ostalim

ćelijskim odeljcima bila narušena. Iako su biohemijske studije pokazale da u biljnim ćelijama Pq dominantno oksiduje hloroplaste (Asada 2000; Vicente et al. 2001), pokazano je da u životinjskim mitohondrijama preuzima elektrone sa kompleksa I elektron-transportnog lanca (Cochemé & Murphy 2008). U model-biljci Arabidopsisu u kojoj je eksprimiran redox osetljivi GFP (*green fluorescence protein*), Stonebloom i kolege (2012) su uočili da tretman sa 1 μ M Pq izaziva značajno oksidovanje tiolnih grupa GFP u mitohondrijama, hloroplastima i citosolu, što ukazuje na širenje uticaja na redoks-homeostazu sa hlorofila. Analizom ekspresije gena nakon šestočasovnog tretmana sa 50 μ M Pq-om, pokazano je da se preko $O_2^{\bullet-}$ aktiviraju specifični proteini koji učestvuju u prenosu signala i tako započinju ekspresiju klastera gena odgovornih za odbranu od napada patogena i povređivanja (Scarpeci et al. 2008).

5.3.4. Različitost i povezanost antioksidativnog sistema zelenog i belog tkiva listova panaširane muškatile

S obzirom na prisustvo „potrošačkog” uvir tkiva, zaštita fotosintetskog aparata od potencijalnih oštećenja sa ROS, čak i pri optimalnim uslovima za rast, je veoma značajna. Može da se rezimira da u fotosintetski aktivnim ćelijama listova muškatile glavne komponente zaštite od ROS, koje nastaju prvenstveno u hloroplastima i peroksizomima, čine enzimi CAT i tAPX, kao i Asc (najzastupljeniji u mitohondrijama, peroksizomima i jedru) i GSH (najzastupljeniji u mitohondrijama i peroksizomima). S obzirom na direktnu fizičku dostupnost fotoasimilata, veća količina Asc u zelenim, u odnosu na bele ćelije je bila očekivana, ali je iznenađujuće da je u hloroplastima koncentracija Asc bila niska. Može da se zaključi da u hloroplastima i citosolu autotrofnih ćelija glavnu liniju odbrane čine enzimske komponente, prvenstveno Cu/ZnSOD i tAPX, a zatim i ostali enzimi Asc-GSH ciklusa. U citosolu se sintetišu, a zatim deponuju u vakuolu i veće količine fenolnih jedinjenja (videti tekst dalje), koje zajedno sa POD takođe dori nose regulaciji nivoa H_2O_2 . Da je cela ova mreža antioksidanata u zelenom tkivu efikasna, vidi se i po tome što uprkos povišenom stvaranju ROS u ovom tkivu (veći nivo karbonilacije proteina) ne dolazi do značajne akumulacije H_2O_2 (DAB bojenje).

Heterotrofne ćelije, u kojima najveći izvor ROS-a pri optimalnim uslovima za rast predstavlja respiratorni lanac mitohondrija, sadrže veću koncentraciju glutaciona, i to najviše u

mitohodrijama, a potom u jedru i citosolu (oko 20 puta manje). U skladu sa tim, u belom tkivu je veća količina i aktivnost ukupnih MnSOD, slika 4.9. Iako je količina ukupnog Asc u celom listu veća u zelenom tkivu, količina ključnog enzima za njegovu biosintezu (GalLDH) je veća u belim ćelijama, što dovodi do toga da je sadržaj ovog metabolita u plastidima i posebno u citosolu, veći nego u istim odeljcima u zelenim ćelijama. Saglasno sa time, povećana je i ekspresija i aktivnost cAPX izoforme, ali i DHAR i GR, u odnosu na zelene ćelije. Kada je biljka izložena optimalnim uslovima za rast, redoks homeostaza u belom tkivu je nenarušena, što je predstavljeno i niskim nivoom karbonilacije proteina, visok RkA i RkG. Ovakva situacija je omogućena veoma dobrom „opremljenosti” antioksidantima, pre svega glutationom, Asc na „ključnim” pozicijama, kao i Cu/ZnSOD u citosolu i hloroplastima, Asc-GSH ciklusom uopšte, i POD u kombinaciji sa fenolnim jedinjenjima (npr. Ecat i pCA su zastupljeniji u belom, u odnosu na zeleno tkivo, videti tekst dalje).

Poredeći odgovore antioksidativnog sistema belog i zelenog tkiva listova muškatele tokom izlaganja Pq i sunčevom zračenju, uočava se da promene u sadržaju i redoks stanju Asc nisu imale isti trend. Slična situacija je zabeležena za aktivnosti CAT, MDAR i POD (samo pri tretmanu Pq). S druge strane, dinamika odgovora aktivnosti APX, DHAR i GR i sadržaja GSH (bez Pq) su se podudarali u oba tkiva. Ovakvi rezultati upućuju na postojanje redoks-komunikacije između zelenog i belog tkiva, posebno iz razloga što je i APX iz belog tkiva uključena. Nakon izlaganja sunčevoj svetlosti porast aktivnosti solubilnih APX u belom tkivu (prvenstveno cAPX) je detektovana barem sat vremena ranije nego u zelenom, što može da ukaže da je senzor za okidanje ekspresije ovog enzima možda prisutan u belom tkivu. Kako je nakon prvog sata izlaganja Pq-u uočeno smanjenje aktivnosti APX i u belom tkivu, može se pretpostaviti postojanje posebnog signalnog puta koji reguliše aktivnost APX, i koji takođe može poticati i iz belog tkiva.

Poznato je da su hloroplasti senzori nepovoljnih spoljnih uslova (visok intenzitet PAR-a, npr.), koji preko redoks-stanja PQ, degradacionih produkata hlorofila ili ROS-a retrogradnim prenosom usmeravaju signale ka drugim ćelijskim odeljcima, poput mitohondrija ili jedra (Foyer & Noctor 2003; Piñas Fernández & Strand 2008; Pogson *et al.* 2008; Hüner *et al.* 2012). Na taj način hloroplasti mogu da kontrolišu metabolizam sekundarnih metabolita, ali i mnogih procesa u koje su uključeni geni kodirani sa jedarnog genoma. Ovi signali mogu da se prenose od zelenih do belih ćelija listova električno preko

plazma membrane, tzv. fotoelektrofiziološkim prenosom signala (*Szechyńska-Hebda et al.* 2010). Ovaj put prenosa signala se indukuje promenama u redoks-stanju PS II, NPQ i metabolizmu GSH koje nastaju izlaganjem visokom PAR-u. Brzina i lokacija širenja električnih signala zavisi od aktivnosti citosolne izoforme APX, što upravo ukazuje na važnost promene aktivnosti ovog enzima (porast u slučaju izlaganja samo sunčevoj svetlosti, smanjenje u slučaju izlaganja Pq). Takođe, NADPH oksidaze u plazminoj membrani proizvode H_2O_2 u apoplastu nakon izlaganja HL, koji akumuliran dalje izaziva električni signal koji se širi sistemski, brzinom od 8 cm po min (*Miller et al.* 2009).

Dodatni načini prenosa signala su unutarćelijski i podrazumevaju da se redoks-signal iz hloroplasta prevode u drugi tip signala putem npr. redoks-osetljivih kinaza/fosfatasa (*Mullineaux & Karpinski* 2002; *Baier & Dietz* 2005; *Dietz & Pfannschmidt* 2011) koji zatim bivaju transportovani kroz plazmodezme (*Suzuki et al.* 2012). Plazmodezme su citosolni podružeci koji povezuju susedne biljne ćelije i omogućavaju transport makro- i mikromolekula (*Stahl & Simon* 2013). Kroz ove strukture se u ćelije tkiva koja se razvijaju i uvir listova mogu transportovati i veći molekuli, dok je u slučaju zrelih ćelija transport većih molekula ograničen. Skorašnja studija *Stonebloom*-a i saradnika (2012) otkrila je da redoks-stanje plastida i mitohondrija različito reguliše transport kroz plazmodezme. Naime, oksidativno redoks-stanje u mitohondrijama, ili reduktivno u plastidima, dovodi do pojačavanja transporta između ćelija kroz plazmodezme, dok se oksidovanjem plastida (sa ili bez oksidovanja mitohondrija, pomoću Pq konkretno) suprimira transport preko plazmodezmi. S druge strane, pokazano je i da nekoliko različitih peroksidaza III klase mogu da budu locirane u blizini plazmodezmi, koje produkovanjem H_2O_2 indukuju lokalne promene u sastavu polisaharida ćelijskog zida i tako regulišu stepen otvornosti plazmodezmi (*Ehlers & van Bel* 2010). Zna se da deponovanje kaloze (β -1,3-glukan) dovodi do začepjivanja (okluzije) otvora plazmodezmi (*Stahl & Simon* 2013), a njihovo deponovanje je pozitivno regulisano pomoću ROS.

U oba slučaja, i izlaganjem sunčevom zračenju i tretmanom Pq-om, plazmodezme bi prema pomenutoj studiji (*Stonebloom et al.* 2012) trebalo da budu zatvorene. Kako redoks-komunikacija između belih i zelenih mezofilnih ćelija listova muškate ipak postoji, ostaje da se u budućnosti ispita koji od ovih načina prenosa signala je uključen.

5.4. Uticaj UV-B zračenja i visokog PAR-a na metabolizam zelenog i belog tkiva listova biljaka *P. coleoides* i *P. zonale*

5.4.1. Prednost simulacije ambijentalnih doza UV-B zračenja u izučavanju dejstva na metabolizam biljaka

Balans između štetnih i regulatornih efekata UV-B zračenja na biljni metabolizam u mnogome zavisi od doze UV-B zračenja i/ili spektralnih karakteristika zračenja, kao i od pozadinskog intenziteta PAR-a i UV-A zračenja (*Jenkins et al.* 2001; *Götz et al.* 2010; *Hideg et al.* 2013). U cilju oponašanja realnih uslova spoljne sredine i uticaja ekološki relevantnog UV-B zračenja, biljke *P. coleoides* i *P. zonale* su deset dana izlagane visokom i niskom intenzitetu PAR (HL i LL) i UV-B zračenju unutar komora SSZ Helmholtz Centra Minhen, slike 3.6 i 3.7. Režim zračenja HL+UV-B odgovara sunčanom prolećnom danu srednje-severnih evropskih geografskih dužina (Nemačka).

Rezultati dobijeni u ovoj disertaciji pokazuju uticaj UV-B zračenja na panaširane listove biljaka *P. coleoides* i *P. zonale*, primenjivanog u jednom delu komore SSZ, a odsutnog u drugom delu. Kako bi se ambijentalno sunčevo zračenje u potpunosti oponašalo, tokom aklimatizacionog perioda i tokom eksperimenta, biljke su bile izložene i različitom intenzitetu UV-A zračenja u zavisnosti od inteziteta PAR i prisustva UV-B zračenja, tabela 3.1, pa se stoga mora uzeti u obzir i njihov mogući kombinovani efekat. Pokazano je da dejstvo plave i UV-A svetlosti može da umanje štetni uticaj UV-B zračenja (*Jenkins et al.* 2001; *Ibdah et al.* 2002; *Brown et al.* 2005), dovodeći do povećanja sadržaja transkripta-halkon sintaze, ključnog enzima u biosintezi flavonoida u epidermisu. Međutim, cilj ove disertacije je bio ispitivanje efekta UV-B zračenja na metabolizam panaširanih listova, što je pokazano upoređivanjem efekata LL i LL+UV-B režima zračenja, odnosno HL i HL+UV-B režima zračenja, čime je (mogući) uticaj UV-A zračenja minimalizovan.

5.4.2. *UV-B zračenje je stimulisalo asimilaciju CO₂ i provodljivost stoma u biljkama P. coleoides*

Panaširanost listova biljaka *P. coleoides* i *P. zonale* predstavlja odličan model-sistem za ispitivanje zavisnosti fotosintetske aktivnosti na uticaj UV-B zračenja. Belo, fotosintetski neaktivno, tkivo panaširanog lišća predstavlja dodatni uvir za asimilate nastale procesom fotosinteze u zelenom tkivu. Slično, *Aluru* i saradnici (2009), koristeći panaširane *im* mutante *Arabidopsis*a, i *Tcherkez* i saradnici (2012), koristeći panaširane muškatile *Pelargonium* × *hortorum*, su proučavali metabolizam „uvir” tkiva u belim segmentima listova.

Rezultati eksperimenata pokazuju da je primena ambijentalnih doza UV-B zračenja imala pozitivan efekat na brzinu fotosinteze u listovima biljaka *P. coleoides* (tabela 4.15 i slike 4.19A i 4.19B), posebno u kombinaciji sa LL. Prema saznanjima autora, stimulacija fotosinteze UV-B zračenjem do sada nije pokazana. Veliki broj istraživanja u kojima su opisani štetni efekti na fotosintetski aparat, odnosi se na primenu visokog intenziteta UV-B zračenja u staklenicima i komorama za gajenje pomoću lampi (*Nogués et al.* 1998, 1999; *Kakani et al.* 2003; *Ranjbarfordoei et al.* 2011). Takođe, u oblastima gde je intenzitet sunčevog zračenja visok, poput velikih nadmorskih visina ili arktičkog regiona, detektovana je smanjena fotosintetska aktivnost u odnosu na umanjenje UV-B zračenja postignuto specifičnim filterima (*Ruhland et al.* 2005; *Albert et al.* 2008; 2011; *Berli et al.* 2013). S druge strane, uticaj nižih, ambijentalnih UV-B doza na fotosintetsku aktivnost je minimalan (*Searles et al.* 2001; *Valkama et al.* 2003; *Ballaré et al.* 2011; *Hideg et al.* 2012; *Müller et al.* 2013). Izveštaji o uticaju UV-B zračenja na provodljivost stoma su nekonzistentni, što se objašnjava različitim PAR/UV-B odnosima, različitim vremenima izlaganja (*Jansen & van der Noort* 2000), ali i različitim odgovorima na UV-B zračenje, zavisnih od same vrste ili varijeteta (*Nogués et al.* 1998; *Surabhi et al.* 2009; *Klem et al.* 2012; *Gitz et al.* 2013). Ilustracije radi, povećana provodljivost stoma pod dejstvom ambijentalnog UV-B zračenja tokom letnjih meseci u Finskoj je primećena u listovima breze (*Kostina et al.* 2001)

Povećana brzina asimilacije CO₂ (*A*) i povećana vrednost maksimalne asimilacije (*A_{max}*) u panaširanim *P. coleoides* biljkama postavljenih pod LL+UV-B režim zračenja, već nakon prvog dana može da se objasni brzim odgovorom stoma na UV-B zračenje, kojim se prevazilazi ograničenje asimilacije zavisno od stoma ('*stomatal limitation*', *Flexas & Medrano* 2002), tabela 4.15.

Kod tamjanika izlaganih HL, došlo je do porasta brzine asimilacije CO₂ i do porasta maksimalne, zasićujuće vrednosti za asimilaciju CO₂ pod dejstvom primenjenog UV-B zračenja, slike 4.19A i 4.19B. Devetog dana eksperimenta u biljkama sa HL koje nisu bile izložene UV-B zračenju, uočena je manja efikasnost u asimilaciji CO₂, u odnosu na vrednosti dobijene za HL i HL+UV-B prvog dana i HL+UV-B devetog dana, slika 4.20. Ovaj povećan odnos linearnog elektronskog transporta i asimilacije CO₂ kod biljaka sa HL bez UV-B, ukazuje na preusmeravanje toka elektrona u alternativne potrošačke puteve, npr. u fotorespiraciju (*Oberhuber & Edwards 1993*), ili u Melerovu reakciju (*Fryer et al. 1998*). Dakle, UV-B zračenje je na visokom PAR-u, nakon devet dana, uticalo na smanjenje toka elektrona u alternativne puteve, što je potvrđeno i povećanom maksimalnom asimilacijom CO₂, slika 4.19B. Veći nagib prave zavisnosti kvantnog prinosa PS II od CO₂ asimilacije je pokazan i kod mutanta ječma sa smanjenim sadržajem *hl b*, u odnosu na *wt* ječam (*Genty et al. 1989*) i kod biljaka *Vigna unguiculata* varijetet CB-5 (*Surabhi et al. 2009*).

S druge strane, u listovima biljaka *P. zonale* UV-B zračenje nije uticalo na brzinu fotosinteze, maksimalnu i radnu efikasnost PS II, čak ni pri povećanim anaboličkim zahtevima u oba tkiva.

UV-B zračenje nije imalo značajan uticaj na sadržaj ukupnih hlorofila ni karotenoida u zelenom tkivu listova obe ispitivane biljne vrste. To je u skladu sa prethodno objavljenim rezultatima gde UV-B zračenje nije uticalo na sadržaj fotosintetskih pigmenata u listovima kukuruza, badema i pirinča (*Barsig & Malz 2000; Ranjbarfordoei et al. 2011; Yi et al. 2013*), mada je u listovima krompira i mahunarki *V. unguiculata* i *Glicine max* nakon izlaganja UV-B zračenju došlo do pada sadržaja hlorofila (*Santos et al. 2004; Surabhi et al. 2009; Hu et al. 2013*).

5.4.3. UV-B zračenje je indukovalo razgradnju skroba u listovima biljaka *P. zonale*

Rezultati dobijeni pomoću TEM pokazuju sličnu organizaciju unutarplastidnih struktura u zelenom i u belom tkivu listova obe biljne vrste. Naime, kao i u slučaju varijeteta „BF“, zeleno tkivo obe vrste ima normalno razvijene hloroplaste sa dobro organizovanim tilakoidnim sistemom, dominantnim granulama skroba i sa brojnim plastoglobulima. Suprotno, „albino“ plastidi belog tkiva i muškatle i tamjanike ne poseduju tilakoidne membrane, niti granule skroba, već se u solubilnom unutrašnjem regionu akumuliraju brojne vezikule različitih veličina i oblika i brojne, sitnije plastoglobule. Literaturni podaci o ultrastrukturi plastida u belim ćelijama listova panaširanih biljaka nisu konzistentni, već zavise od proučavane vrste (Evenari 1989; Wetzler et al. 1994; Chen et al. 1999; Wang et al. 2000). U belim delovima panaširanih mutanta *Arabidopsis*a, plastidi su nalik amiloplastima koji ne sadrže skrobne granule, nemaju organizovane lamelarne strukture i nemaju fotosintetske pigmente, a uočavaju se manji plastoglobuli i vakuolarna tela (Wetzler et al. 1994; Aluru et al. 2001). Plastidi detektovani u belim segmentima listova muškatle i tamjanike slični su i leukoplastima opisanim u epidermalnim ćelijama zrelih listova, koji su manji po zapremini i imaju veoma malo tilakoida.

Nakon deset dana izlaganja režimima: HL i HL+UV-B, pokazano je da je UV-B zračenje imalo dva različita mehanizma delovanja na ultrastrukturu hloroplasta biljaka *P. zonale* i *P. coleoides*. U hloroplastima biljaka *P. zonale* detektovano je smanjenje sadržaja skroba ($-1.5\times$), dok je u biljkama *P. coleoides* veličina i broj plastoglobula bio udvostručen, bez promene veličine skrobnih granula. Smanjenje zapremine skroba je detektovano u listovima breze i jagode gajenih napolju uz primenu dodatnog UV-B zračenja putem fluorescentnih lampi (dnevna biološki efektivna UV-B iradijansa za studiju sa brezom je bila $3-4 \text{ kJ m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ (Kostina et al. 2001), a za studiju sa jagodom $2-3 \text{ kJ m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ (Valkama et al. 2003), što je 2-3 puta manje od primenjene doze u ovoj tezi, tabela 3.1). S druge strane, UV-A zračenje nije imalo efekat na smanjenje skroba, ni kod jagoda, ni kod breze. Takođe, tretiranjem listova krompira 12% većom biološki efektivnom UV-B dozom (u odnosu na dozu primenjenu u ovoj tezi) smanjena je zapremina skroba u hloroplastima mezofilnih ćelija (pri $450 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ PAR; Santos et al. 2004). Ovo smanjenje sadržaja skroba autori su objasnili smanjenom koncentracijom hlorofila u mezofilnim ćelijama krompira, i smanjenjem

aktivnosti CO₂ fiksacije usled njene zavisnosti od kapaciteta apsorpcije LHC. Kako u listovima muškate UV-B zračenje nije uticalo na fotosintetski aparat, niti na sadržaj *hl a*, *hl b*, niti karotenoida, ovo ne može biti razlog smanjenja sadržaja skroba dobijenog u ovoj disertaciji. Suprotno, u listovima ječma (tretiranih kao i prethodno opisane biljke jagoda, *Valkama et al.* 2003) UV-B zračenje nije uticalo nije imalo efekta na zapreminu skrobnih granula, kao ni u slučaju sa biljkama *P. coleoides*.

Poznata je da pri izlaganju biljaka visokom intenzitetu bele svetlosti dolazi do porasta broja i veličine plastoglobula, što se objašnjava degradacijom tilakoidnih membrana i deponovanjem degradacionih lipidnih produkata tilakoida, ETL (*Ladygin* 2004; *Lichtenthaler* 2007; *Bréhélin & Kessler* 2008). Iako u tamjanici nije detektovano UV-B-zavisno smanjenje tilakoidnih membrana pod HL, blagi pad fotosintetskih pigmenata bi mogao da bude povezan sa porastom udela plastoglobula u stromi hloroplasta. Slični porast zapremine plastoglobula izazvan sličnim intenzitetom UV-B zračenja je dobijen u listovima „super visokoprinosnog“ hibrida pirinča, paralelno sa smanjenjem efikasnosti fotofosforilacije i aktivnosti ključnih enzima u fiksiranju ugljenika (*Yu et al.* 2013).

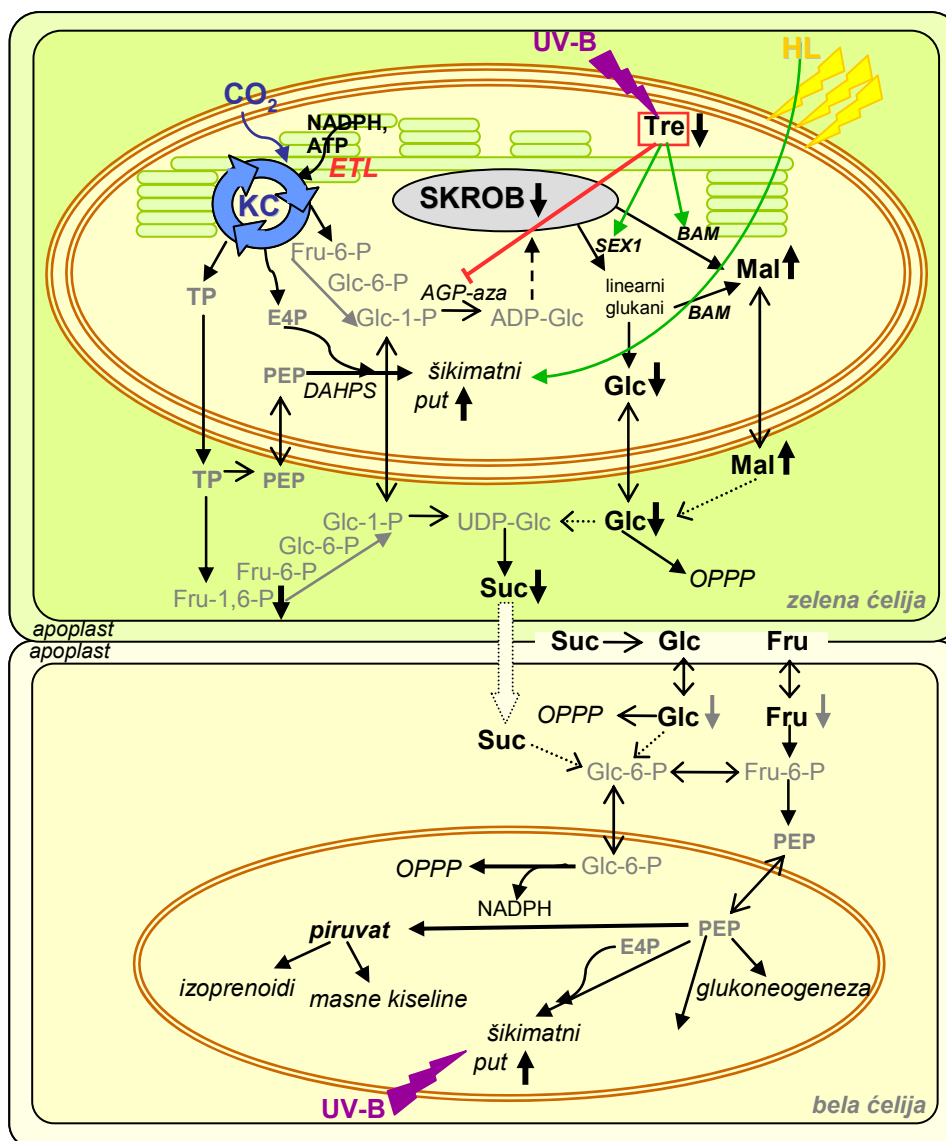
5.4.4. Fotosintetski aparat obe panaširane vrste je uspešno aklimatizovan na visok intenzitet bele svetlosti

Visok intenzitet PAR-a je imao značajan efekat na fotosintetski aparat u obe panaširane vrste. Pad sadržaja $hl\ a$ i $hl\ b$ (tabele 4.16 i 4.21) ukazuje na moguće smanjenje broja reakcionih centara, odnosno smanjenje veličine LHC antena pigmentata što umanjuje energiju koja se apsorbuje. Kako vrednosti F_v/F_m i $\Phi_{PS\ II}$ nisu bile značajno smanjene u obe vrste, može se zaključiti da je PS II bio zaštićen od pretrpljenog povišenog ekscitacionog pritiska, čemu je uglavnom doprineo povećan NPQ, već nakon prvog dana tretmana, slike 4.18 i 4.27. Isti trendovi promena fotosintetskih parametara (F_v/F_m , $\Phi_{PS\ II}$, NPQ, sadržaj $hl\ (a+b)$) su uočeni u mediteranskim žbunastim vrstama *Ligustrum vulgare* i *Phillyrea latifolia* koje su bile izložene punom sunčevom zračenju tokom 10 i 30 dana, u odnosu na zaklonjene biljke, izlagane samo 12%-nom sunčevom zračenju (Tattini et al. 2005). Postepeni pad sadržaja ukupnih hlorofila i karotenoida sa porastom intenziteta PAR u opsegu od 50-1500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ zabeležen je i u slučaju biljaka *A. thaliana* (Heyneke et al. 2013). Udeo pigmentata ksantofilskog ciklusa (V+A+Z) u ukupnom sadržaju karotenoida je bio povećan za više od 40% u obe panaširane vrste, što zajedno sa porastom NPQ, takođe predstavlja korak u aklimatizaciji listova na povišen PAR (Bilger & Björkman 1990; Lichtenthaler 2007).

Pri LL, u listovima muškatele sadržaj hlorofila i karotenoida je bio više od 2.5 puta veći u odnosu na listove tamjanike, iako je odnos $hl\ a/b$ i $hl\ (a+b)/\Sigma\text{kar}$ bio jednak u obe vrste. Pomenute razlike ukazuju da su obe vrste bile tolerantne na visok PAR, mada su biljke *P. coleoides* bile bolje adaptirane. Potvrde radi, u listovima ginka, bukve i rotkvica izloženih visokom intenzitetu bele svetlosti izmereni su sledeći odnosi $hl\ a/b$: 3.1, 3.3 i 3.8, dok je odnos $hl(a+b)/\Sigma\text{kar}$ iznosio 4.1, 4.2 i 4.9, redom (Lichtenthaler et al. 1982; Lichtenthaler 2007; Sarijeva et al. 2007).

5.4.5. *Transport ugljenih hidrata između zelenog i belog tkiva u listovima P. zone izlaganih UV-B zračenju*

Analiza rastvornih ugljenih hidrata pokazala je da i UV-B zračenje i visok PAR stimulišu efikasan transport ovih molekula iz „izvor” (zelenog) tkiva u „uvir” (belo) tkivo listova. Ova konstatacija proizilazi iz odnosa glukoze i fruktoze, koji je bio veći u belom tkivu (osim kada su biljke gajene pod LL režimom), ukazujući da je skrob (iz zelenog tkiva) glavni izvor glukoze za „uvir” tkivo. Smanjenje količine skroba pod dejstvom UV-B zračenja na visokom intenzitetu PAR dodatno ide u prilog takvom zaključku, tabela 4.18. Na osnovu svega pomenutog, pretpostavljeno je da UV-B zračenje pri HL ima ulogu u kontroli razgradnje skroba preko trehaloznog signalnog puta i pratećeg transporta šećera iz „izvor” u „uvir” tkivo, bez izazivanja promena u sadržaju saharoze u „uvir” tkivu, slika 5.1. Skorašnja istraživanja su ukazala na učešće trehalozo-6-fosfata (T6P) u homeostazi ugljenih hidrata i, što je mnogo važnije, u premeštanju ugljenika u „uvir” tkiva (npr. u koren) (Ramon *et al.* 2007; Paul *et al.* 2008; Smeeckens *et al.* 2010). U skladu sa tim saznanjima, degradacija skroba je povezana sa padom sadržaja Tre u listovima biljaka *P. zone* sa HL+UV-B, slike 5.1 i 5.2. Naime, Tre, neredukujući disaharid koga čine dva molekula Glc povezana α,α -1,1- vezom, prisutna je u većini biljaka u veoma niskim koncentracijama, osim u slučaju biljaka otpornih na sušu. Biljke koje su rasle na medijumu sa povišenom Tre, ekspimiraju visok nivo regulatornog proteina nezavisnog od abscisinske kiseline 4 (ABI4, *abscisic acid insensitive 4*), koji suprimira ekspresiju gena odgovornih za razgradnju skroba (npr. SEX, BAM), slika 5.1 (Ramon *et al.* 2007; Paul *et al.* 2008).



Slika 5.1. Shematski prikaz veze između metabolizma fenolnih jedinjenja i ugljenih hidrata u zelenim („izvor”) i belim („uvir”) ćelija mezofila biljaka *P. zonale* izlaganih HL+UV-B režimu. Crnom bojom su prokazani analizirani ugljeni hidrati, a sivom fosfatni intermedijeri koje bi trebalo analizirati u sledećim istraživanjima. Smer punijih crnih strelica ukazuje na izmereni rast ili smanjenje sadržaja specifičnog metabolita. Tanke tačkaste strelice ukazuju na postojanje više koraka u datoj konverziji, dok bela tačkasta strelica ukazuje na transport Suc između „izvor” i „uvir” tkiva. OPPP, oksidativna grana pentozofosfatnog puta, AGP-aza, ADP-Glc pirofosforilaza; KC, Kalvinov ciklus. Ostale skraćenice su objašnjene na slici 4.30. Metabolički putevi u beloj ćeliji su bazirani na rezultatima prikazanim u *Aluru et al.* 2009 i *Facchinelli & Weber* 2011, a u zelenoj na rezultatima iz *Ramon et al.* 2007 i *Stitt & Zeeman* 2012.

Povišeni nivo T6P aktivira ADP-Glc pirofosforilazu (AGP-azu, prvi enzim u sintezi skroba koji konvertuje Glc-1-fosfat u ADP-Glc), što ima za rezultat pojačanu sintezu skroba –

ovaj mehanizam nije zavistan od ABI4 (*Ramon et al. 2007; Smeekens et al. 2010 Sttit & Zeeman 2012*). Shematski prikaz veze između fenolnog metabolizma i metabolizma šećera u „izvor” i „uvir” tkivu listova muškatele, sa osvrtom na učešće UV-B zračenja pri visokim PAR u regulaciji Tre signalnog puta je predstavljen na slici 5.1.

Pad nivoa Tre u zelenom tkivu uslovljen UV-B zračenjem vodi do degradacije skroba i pratećeg povišenog nivoa maltoze. S obzirom na činjenicu da nije izmeren porast ni Glc, ni Suc, pretpostavljeno je da se dobijene heksoze odmah koriste kao gradivni blokovi za sintezu fenolnih jedinjenja u zelenom tkivu, ali i za izvoz u „uvir” tkivo, gde je, nakon izlaganja UV-B zračenju zapažen porast sadržaja *p*-CA, K i Q (videti dalje u tekstu).

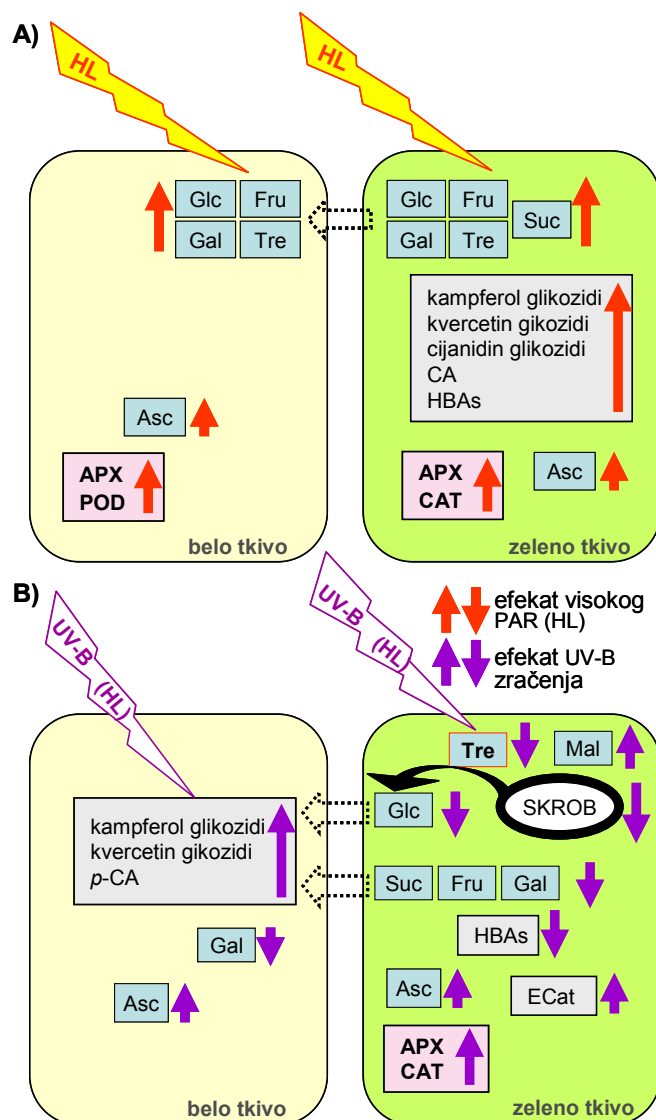
Saglasno sa prethodnim zaključkom, u ćelijama belog tkiva listova *im Arabidopsis* mutanta pokazano je veoma malo, skoro nimalo, *de novo* biosinteze ugljenih hidrata, odsustvo skroba i nizak sadržaj Suc, što je praćeno jakom indukcijom ekspresije gena koji kodiraju invertaze, uključujući i invertaze ćelijskog zida, fruktokinazu, sintazu saharoze i transportere heksoza (*Aluru et al. 2007, 2009*). Dakle, izvezena saharoza iz zelenih ćelija može biti hidrolizovana u apoplastu belih ćelija i nastale Glc i Fru mogu da dospeju u citosol belih ćelija putem specifičnih transportera u plazma membrani. Sve ovo označava belo tkivo kao „uvir” tkivo u listovima *im* mutanta.

5.4.6. Stimulacija fenilpropanoidnog i flavonoidnog biosintetskog puta UV-B zračenjem – antioksidativna i apsorbujuća uloga

Stimulacija fenilpropanoidnog i flavonoidnog biosintetskog puta i njihove akumulacije u ćelijama listova se smatra ključnom u aklimatizaciji biljaka na UV-B zračenje (*Winkel-Shirley* 2002; *Santos et al.* 2004; *Brown et al.* 2005; *Favori et al.* 2009; *Ruhland et al.* 2005; *Jenkins* 2009; *Agati & Tattini* 2010). Višefazne promene u metaboličkom profilu ranog odgovora listova *Arabidopsis* na UV-B zračenje podrazumevaju porast koncentracije glikozida flavonoida, Q i K, i fenilpropanoida, uglavnom estara sinapinske kiseline (*Lake et al.* 2009; *Götz et al.* 2010; *Morales et al.* 2010; *Page et al.* 2012). Usled jake apsorpcije u UV oblasti, flavonoidi i derivati HCA funkcionišu kao efikasni UV-B zaštitni pigmenti, kako je pokazano i u drugim biljnim vrstama (*Rueber et al.* 1996; *Ibdah et al.* 2002; *Müller et al.* 2013; *Nascimento et al.* 2015). Proverom transkriptoma zelenog i belog tkiva panaširanih listova *im* mutanta *Arabidopsis*, pokazano je da oba tkiva imaju povećanu indukciju enzima uključenih u biosintezu flavonoida, u odnosu na zeleno tkivo listova nepanaširanog *wt* *Arabidopsis* (*Aluru et al.* 2007; 2009).

U panaširanim vrstama, ispitivanim u ovoj tezi, primenjeno UV-B zračenje je izazvalo akumulaciju glikozida Ap i Cy u oba tipa tkiva listova biljaka *P. coleoides* i akumulaciju glikozida K, Q i *p*-CA, samo u belom tkivu listova biljaka *P. zonale*, slike 5.2, 5.3 i P4, P5 poglavlja Prilozi. S druge strane, visok PAR gotovo da nije stimulisao fenolni metabolizam u tamjanici (osim porasta ukupnih HBA u zelenom tkivu), dok je u muškatici izazvao značajni porast sadržaja CA, Cat, Q, K i Cy i to samo u zelenom tkivu listova, slike P4 i P5. Ovakvi rezultati ukazuju na postojanje različitih aklimatizacionih odgovora fenolnog metabolizma u listovima biljaka *P. zonale* i *P. coleoides*, kako između vrsta, tako i između zelenog i belog tkiva listova iste vrste, što je shematski predstavljeno na slikama 5.2 i 5.3.

Ako se analiziraju rezultati koji prikazuju pojačanu akumulaciju fenolnih jedinjenja u zelenom i belom tkivu listova *P. zonale*, uočava se da različiti režimi zračenja, indukuju akumulaciju različitih tipova fenolnih jedinjenja u ova dva tkiva, slika 5.2.



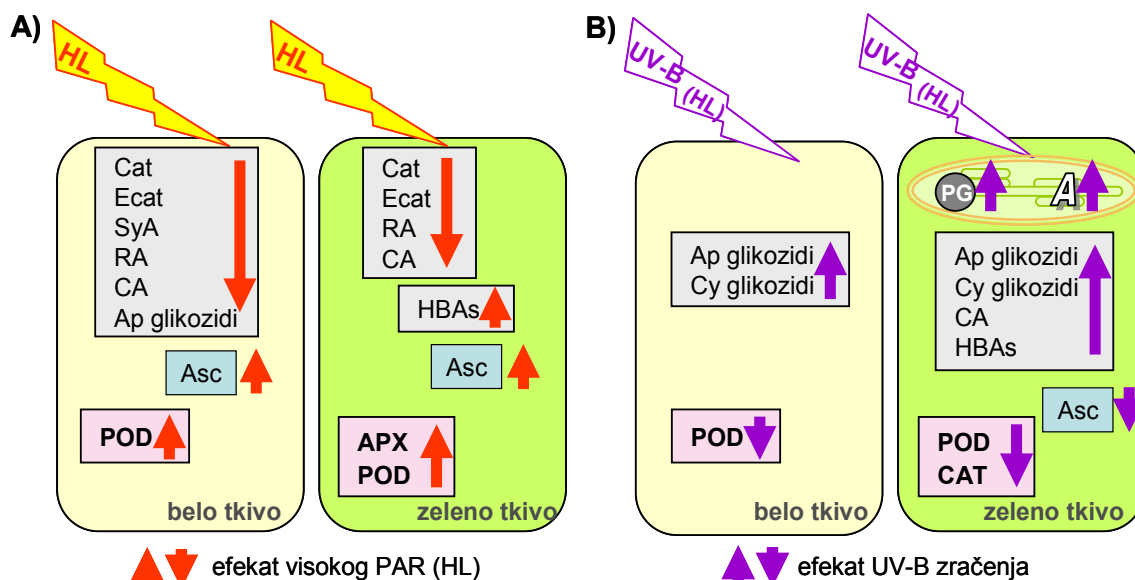
Slika 5.2. Shematski prikaz aklimizacionog odgovora u zelenom i belom tkivu listova biljaka *P. zonale* na A) visok intenzitet PAR-a (HL); B) ambijentalne doze UV-B zračenja. Smer strelica ukazuje na porast ili smanjenje sadržaja specifičnog metabolita ili aktivnosti specifičnog enzima. Tačkaste strelice ukazuju na transport između „izvor” i „uvir“ tkiva.

Naime, u zelenim segmentima listova, sva fenolna jedinjenja akumulirana pri visokom intenzitetu PAR-a (sem K) imaju *orto*-dihidroksi-supstutuisan B prsten, što ih čini efikasnijim antioksidantima od fenolnih jedinjenja sa monohidroksilnom supstutucijom, poput onih čija se sinteza indukuje UV-B zračenjem u belim segmentima listova. S tim u vezi, veći odnos Q/K i veća vrednost izračunatog TAK je dobijena u zelenim segmentima listova muškatile. Porast odnosa glikozida „jačih antioksidanata”(Q i Lu) i „slabijih antioksidanata” (K i Ap), sa porastom intenziteta sunčevog zračenja su pokazani i u listovima lipe, *T. platyphyllos* (Majer

et al. 2014), *L. vulgare* (Agati et al. 2009; Brunetti et al. 2013) i *P. latifolia* (Tattini et al. 2005). U skladu sa time, pretpostavljeno je da indukovana akumulacija (poli)fenola u zelenom tkivu listova *P. zonale* imaju prvenstveno antioksidativnu ulogu, dok je uloga (poli)fenola u belom tkivu, čija je akumulacija indukovana UV-B zračenjem, preferencijalno zaštitna, tzv. ‘UV-B- screening’. Da li će, i u kom će stepenu, flavonoidi akumulirani bilo pod dejstvom UV-B zračenja ili visokog PAR-a imati antioksidativnu ili ‘UV-B- screening’ funkciju zavisice od njihovog položaja u listu i u ćelijama, i od njihove strukture (npr. prisustvo *orto*-dihidroksil-supstitucije B prstena). Dominantno prisustvo glikozida flavonoida u vakuoli, koja je fizički odvojena od glavnog mesta nastanka ROS, je osnovni pokretač debata o njihovoj antioksidativnoj ulozi tokom poslednje decenije (Ibdah et al. 2002; Neill & Gould 2003; Tattini et al. 2005; Hernández et al. 2009; Agati & Tattini 2010; Pollastri & Tattini 2011; Agati et al. 2012, 2013; Brunetti et al. 2013). U prilog antioksidativnoj ulozi flavonoida sa *orto*-dihidroksil-supstituisanim B prstenom je i njihovo prisustvo u ovojnici hloroplasta mezofinih ćelija, otkriveno u biljkama *L. vulgare* i *P. latifolia* nakon izlaganja sunčevoj svetlosti sa i bez UV-B zračenja (Agati et al. 2007; 2009). Ovakav položaj flavonoida sa *orto*-dihidroksil-supstituisanim B prstenom omogućava da oni učestvuju u uklanjanju ROS koji nastaju u fotosintezi na visokom PAR-u, kako je i pokazano na primeru $^1\text{O}_2$ i *P. latifolia* (Agati et al. 2009).

Nadovezujući se na prethodne zaključke, pretpostavljeno je da glikozidi apigenina u biljkama *P. coleoides* imaju ‘UV-B–screening’ ulogu. S druge strane, prisustvo glikozida Cy u epidermisu belog i zelenog tkiva listova tamjanike, akumuliranih pod dejstvom UV-B zračenja, moglo bi da ima dve funkcije, slika 5.3. Osim što Cy apsorbuje u UV oblasti, on ima snažnu apsorbciju i u oblasti zelene svetlosti (515-550 nm; maksimum na 525 nm), te zbog njegovog prisustva u epidermisu zelenih segmenata, pruža zaštitu fotosintetskom aparatu od fotooštećenja pri visokom intenzitetu PAR-a (Gould et al. 1995; Neill 2002; Hughes et al. 2005). Ovome ide u prilog i nalaz da je sadržaj glikozida Cy u biljkama, izlaganim HL+UV-B režimu zračenja, veći nego u biljkama izlaganim LL+UV-B režimu. Međutim, kako se Cy, kao i Ap, specifično akumulira pod dejstvom UV-B zračenja, i u abaksijalnom i u adaksijalnom epidermisu i u većem stepenu u belom tkivu, objašnjenje uloge Cy nije jednostavno. Prisustvo antocijana je zabeleženo u planinskim zimzelenim vrstama tokom zime (Hughes & Smith 2007). Može se pretpostaviti da manji intenzitet UV-B zračenja prodire u

zeleno tkivo, u odnosu na belo. Naime, hlorofil u značajnom stepenu apsorbuje u UV spektralnoj oblasti (Bilger et al. 1997; Cerović et al. 2002), što za posledicu ima atenuaciju, tj. umanjene intenziteta UV-B zračenja u zelenom tkivu. Kako se glikozidi Ap akumuliraju u oba tkiva u jednakom stepenu, i kako u kombinaciji sa HL samo u zelenom tkivu dolazi do akumulacije HBA i CA, očigledno je da ni hlorofil, ni povišeni bazalni nivo fenola (pozadinski UV apsorberi) ne umanjuju efekat UV-B zračenja u zelenom tkivu.



Slika 5.3. Shematski prikaz proučavanog aklimatizacionog odgovora u zelenom i belom tkivu listova biljaka *P. coleoides* na A) visok intenzitet PAR-a (HL) i B) ambijentalne doze UV-B zračenja. Smer strelica ukazuje na porast ili smanjenje sadržaja specifičnog metabolita ili aktivnosti specifičnog enzima. PG, plastoglobuli; A, brzina asimilacije CO₂. Ostale skraćenice su date u legendi slike 4.22.

5.4.7. Visok intenzitet PAR-a i ambijentalne doze UV-B zračenja stimulišu antioksidativni metabolizam u obe ispitivane vrste. Veza sa fenolnim jedinjenjima.

Zajedničko za obe panaširane vrste jeste povišeni sadržaj proteinskih karbonila u fotosintetski aktivnom u poređenju sa fotosintetski neaktivnom tkivom. Stoga je očekivano da kada se ove biljke osvetle visokim intenzitetom PAR-a, veći oksidativni pritisak bude u zelenom tkivu. Kao posledica ove hipoteze je i povećanje akumulacije Asc i aktivnosti APX u listovima obe vrste pod dejstvom HL. Porast nivoa pomenutih antioksidanata pokazan je u fotosintetski aktivnim ćelijama listova Arabidopsisa i duvana, nakon osvetljavanja visokim intenzitetom bele svetlosti (Fryer et al. 2003; Gechev et al. 2003; Bartoli et al. 2006; Heyneke et al. 2013; Szechyńska-Hebda & Karpiński 2013).

Uporednim pregledom efekata visokog intenziteta PAR-a i UV-B zračenja na antioksidativni sistem u listovima uočavaju se razlike u odgovorima panaširane muškatile i tamjanike.

U biljkama *P. coleoides*, osim pomenutog porasta aktivnosti APX i sadržaja Asc, visok intenzitet PAR-a je uzrokovao i porast aktivnosti peroksidaza III klase i to više u zelenom, nego u belom tkivu listova, što je u saglasnosti sa smanjenim sadržajem njihovih supstrata (CA, RA, Cat i ECat) u zelenom tkivu. Ukupni efekat visokog intenziteta PAR-a i UV-B zračenja na oba tkiva panaširanih listova tamjanike je shematski prikazan na slici 5.3. Mada su sadržaji Asc određeni u listovima tamjanike bili značajno niži od onih određenih u drugim vrstama, poput Arabidopsisa (Bartoli et al. 2006, Page et al. 2012), bambusa (Morina et al. 2013), divizme (Morina et al. 2010) i muškatile, pretpostavlja se da je efikasno uklanjanje H₂O₂ omogućeno upravo Asc/fenoli/peroksidaznim (Takahama 2004) i Asc/APX sistemom. O efikasnosti ovih sistema, svedoči i povećan nivo redoks-stanja Asc određen u zelenom tkivu listova nakon desetodnevnog izlaganja HL režimu, u odnosu na LL. Iako je UV-B zračenje na visokom intenzitetu PAR-a izazvalo smanjenje aktivnosti POD i CAT, nisu detektovani ni pad redoks-koeficijenta Asc, niti značajno povećana karbonilacija proteina, što znači da UV-B zračenje nije izazvalo oksidativni stres u listovima tamjanike. Ovaj rezultat je u skladu sa aktuelnim „trendom” u UV-B istraživanjima, koji preispitujući koncept „UV-B stresa” u uslovima spoljašnje sredine, zastupa generalni stav da je stres izazvan UV-B zračenjem relativno retka pojava u biljkama koje žive napolju (Ballaré et al. 2011; Hideg et al. 2013).

Kada se radi o uticaju različitih režima zračenja na antioksidativni metabolizam muškatle, situacija je umnogome drugačija. Veći porast aktivnosti APX i CAT, i sadržaja Asc u zelenom tkivu listova biljaka *P. zonale* izalaganih HL+UV-B u odnosu na one izlagane HL režimu, ukazuje na sinergističku stimulaciju antioksidativne odbrane od strane visokog intenziteta PAR-a i UV-B zračenja. Odavde proizilazi da su muškatle gajene pod HL+UV-B režimom zračenja bile bolje aklimatizovane na (foto)oksidativni stres. Poznato je da u cilju povećavanja tolerantnosti biljaka na faktore spoljne sredine koji mogu uzrokovati oksidativni stres, UV-B zračenje aktivira antioksidativnu odbranu preko UVR8 signalnog puta (*Brown et al.* 2005; *Favory et al.* 2009; revija: *Hideg et al.* 2013). Indukcija antioksidativne zaštite visokim intenzitetom PAR-a, nakon prethodnog tretmana UV-B zračenjem je pokazana u listovima pasulja i graška (*Bolnik et al.* 2001). Takođe, biljke duvana koje su aklimatizovane na visok intenzitet PAR-a, pri izlaganju UV-B zračenju, održavale su bolje redoks-stanje Asc u odnosu na biljke koje nisu bile aklimatizovane na visok intenzitet PAR-a (*Majer & Hideg* 2012). Aklimatizacioni odgovori na UV-B zračenje u listovima duvana su se preklapali sa odgovorima na visok intenzitet PAR-a (*Majer & Hideg* 2012). Dodatna potvrda sinergističkog dejstva UV-B zračenja i visokog PAR na antioksidativni metabolizam biljaka *P. zonale*, proizilazi iz dobijenih rezultata da UV-B zračenje na LL nije uticalo na antioksidativni status listova (osim idukcije POD u belom tkivu listova).

5.4.8. *Integracija metaboličkog odgovora zelenog i belog tkiva listova P. coleoides na UV-B zračenje i visok intenzitet PAR-a*

UV-B-indukovana akumulacija flavonoida u belom tkivu listova tamjanike podržava hipotezu da je UV-B zračenje predstavljao specifičan signal za biosintezu flavonoida, koji nije direktno zavistan od fotosinteze. S druge strane, skoro pet puta veći ukupni sadržaj fenolnih jedinjenja u zelenom tkivu, u odnosu na belo, ukazuje na posrednu vezu sa fotosintezom. Iako je pokazano da se više od 20% fotoasimilata usmerava u fenilpropanoidni put (*Jensen 1986*), i dalje je veza između fotosinteze i fenolnog metabolizma nedovoljno ispitana (*Fritz et al. 2006*).

Osim ukupnih fenola, u zelenom tkivu listova tamjanike zabeležen je veći sadržaj Asc, POD i CAT. Takođe, sadržaj ukupnih fenilpropanoida (CA i RA) i flavanola (Cat i ECat) u listovima *P. coleoides* je bio 20-40 puta veći od sadržaja Asc. Ovo ukazuje na efikasniju antioksidativnu zaštitu u fotosintetski aktivnom tkivu, što je saglasno sa činjenicom da je fotosinteza glavni izvor nastanka ROS u listovima. U zelenom tkivu listova tamjanike naglašena je uloga Asc/fenoli/peroksidaznog i Asc/APX sistema u zaštiti od povećanog ekscitacionog pritiska na HL. Međutim, u ovim listovima postoji razvijen mehanizam koji sprečava da do povećanja ekscitacionog pritiska tokom izlaganja HL uopšte i dođe. Dalje, bez UV-B komponente, na HL pojačani su bili i alternativni potrošači elektrona, i to Melerove reakcije i fotorespiracije.

Sa UV-B zračenjem, u listovima biljaka *P. coleoides* pojačane su *A* i *Amax*, što je predstavljalo preduslov za pojačanu biosintezu Ap i Cy, (i CA i HBAs u zelenom tkivu) na HL, slika 5.3. Ukoliko se uzme u obzir smanjenje aktivnosti enzima koji uklanjaju H₂O₂, POD i CAT i sadržaja Asc u zelenom tkivu na HL, indukcija biosinteze pomenutih fenolnih jedinjenja potencijalno ima značaj u zaštiti fotosintetskog aparata, bilo u uklanjanju ROS ili u prigušivanju primenjenog zračenja. Sistemska akumulacija Cy u gornjem i donjem epidermisu oba lisna tkiva je u skladu sa ovim tvrdnjama.

Poznato je da na povišenom intenzitetu PAR-a dolazi do prekomerne redukcije molekula PQ koji, poput ROS, predstavljaju signalne molekule u retrogradnom prenosu signala hloroplast-jedro (*Adamiec et al. 2008; Pogson et al. 2008; Szechyńska-Hebda & Karpiński 2013*). U skorašnjoj studiji *Akthar*-a i saradnika (2010) pokazano je da niske doze

UV zračenja dovode do povišene redukcije PQ molekula, što je imalo za posledicu povećanu biosintezu apigenin- i luteolin-glikozida u biljkama *Lemna gibba*, na način koji nije zavistan od ROS. Ovaj rezultat je potvrđen i sprečavanjem oksidacije PQH₂ primenom niskih temperatura, Cu²⁺ i specifičnih inhibitora. Autori su pretpostavili da UV zračenje inhibira aktivnost Rubisco, pa da zato dolazi do pojačane redukcije PQ molekula, dok su u slučaju tamjanike stimulisanjem glavnog uvira elektrona-asimilacije CO₂, smanjene mogućnosti za povećanu redukciju PQ. Takođe, u biljkama *L. giba* je uočen pad operativne efikasnosti PS II pod dejstvom UV zračenja, što nije bio slučaj sa tamjanikom.

Ono što može biti ključna veza flavonoidnog metabolizma i fotosinteze je da flavonoidni metabolizam funkcioniše kao privremeni potrošač redukovanog ugljenika, odnosno fotoasimilata, pa se na taj način ponaša kao 'ventil za oslobađanje viška energije' trošeći i ATP i NADPH tokom svoje biosinteze (*Hernández & Van Breusegem 2010*).

5.4.9. *Integracija metaboličkog odgovora zelenog i belog tkiva listova P. zonale na UV-B zračenje i visok intenzitet PAR-a*

Suprotno od listova tamjanike, gde se najvažniji uticaj UV-B zračenja odnosio na stimulaciju fotosinteze, kao preduslova za pojačanu biosintezu flavonoida (Ap i Cy), u biljkama muškatle, ključan je bio uticaj UV-B zračenja na Tre, signalni molekul koji reguliše redistribuciju ugljenika iz skroba zelenog tkiva u fotosintetski neaktivno, „uvir” tkivo. UV-B-indukovana akumulacija *p*-CA, K i Q uglavnom u obliku glikozida u belom tkivu listova muškatle pri HL, dodatno povećava potrebe za molekulima rastvornih ugljenih hidrata. Kao što je rečeno, ovi zahtevi mogu biti obezbeđeni degradacijom skroba i stimulacijom izvoza Suc iz zelenog tkiva, slike 5.1 i 5.2. Sličan mehanizam bi mogao biti odgovoran za porast Glc, Fru i Gal u listovima biljaka izlaganih LL+UV-B režimu zračenja. Na taj način, UV-B zračenje stimuliše kompenzacijski mehanizam za biosintezu fenilpropanoida i flavonoida u „uvir” tkivu listova biljaka *P. zonale*, nadomešćujući nedostatak fotosinteze u ovom tkivu. Za potpunu potvrdu ovog zaključka potrebno je izvesti detaljniju analizu metabolita, prvenstveno fosfatnih šećera prikazanih na slici 5.3.

Pojačani uticaj visokog intenziteta PAR-a na fotosintetski aktivno tkivo listova muškatle, posebno na antioksidativne enzime, Asc i fenolna jedinjenja sa *orto*-dihidroksil-supstituisanim aromatičnim prstenom, ukazuje na postojanje specifičnih retrogradnih hloroplastnih signala (*Suzuki et al.* 2012). Kao što je već ranije napomenuto, ti signali mogu da se prenose do belih ćelija bilo fotoelektrofiziološkim putem (*Szechyńska-Hebda et al.* 2010), bilo prenosom H₂O₂ kroz apoplast (*Miller et al.* 2009) ili transportom oksidovanih oblika specifičnih metabolita, sekundarnih metabolita i ROS simplastom kroz plazmodezme (*Stonebloom et al.* 2012)

Ekperimentima u okviru ove disertacije je pokazano da UV-B zračenje nije izazvalo oksidativni stres u listovima obe vrste, već je u zelenom tkivu listova muškatle aktiviralo antioksidativnu zaštitu od ROS, potencijalno nastalih kao posledica viška ekscitacionog pritiska u tilakoidima. Da fenolni antioksidanti (CA, Cat, Q, K i Cy) zajedno sa APX, CAT i Asc predstavljaju efikasnu zaštitu od oksidativnog stresa u fotosintetski aktivnom tkivu listova biljaka *P. zonale* izlaganih visokom intenzitetu PAR-a dodatno je potvrđeno izostankom

inhibicije fotosinteze (fotoinhibicije), zatim očuvanjem redoks-stanja Asc i formiranja proteinskih karbonila. Ilustracije radi, *Gould* i saradnici (2002) su pokazali da crvenkaste mezofilne ćelije (ćelije koje sadrže antocijane) biljaka *Pseudowintera colorata* efikasnije uklanjaju H₂O₂ nego zelene ćelije. Cijanidin u vakuoli može da se oksiduje pomoću vakuolarnih POD i H₂O₂, koji može da prođe kroz tonoplast difuzijom ili kroz akvaporine (*Neill, Desikan & Hancock 2002; Cheeseman 2007*), a zatim može ponovo da se redukuje pomoću Asc (*Yamasaki et al. 1997*). S druge strane, na osnovu apsorpcije u zelenoj oblasti vidljivog dela spektra, i isključive distribucije u zelenom tkivu listova biljaka *P. zonale*, cijanidin može imati i drugu ulogu. Naime, cijanidin intenzivno umanjuje intenzitet PAR-a koji dopire do hloroplasta mezofilnih ćelija i na taj način indirektno smanjuje mogućnost fotoinhibicije i fotooksidacije, bez uticaja na brzinu fotosinteze. U slučaju zimzelene planinske vrste *Galax urceolata*, na niskim temperaturama pri jakom svetlu, antocijani se intenzivno sintetišu i akumuliraju u ćelijama spoljnog mezofilnog sloja, pa štite fotosintetski aparat u uslovima povećanog ekscitacionog pritiska u PS II (*Hughes 2005*). Fotoprotektivna uloga antocijana je pokazana i u sledećim biljkama: *Lactuca sativa* cv. Dark Lolo Roso (*Neill 2002; Neill & Gould 2003*), *Begonia pavonina* (*Gould et al. 1995*), *Elatostema rugosum* i *Quintinia serrata* (*Neill 2002*).

Porast sadržaja Asc u oba tkiva listova muškatile na visokom PAR-u (u sinergiji sa UV-B zračenjem), sem značaja za uklanjanje H₂O₂ i uloge kao kofaktora VDE, enzima ključnog za NPQ, može se dovesti u vezu i sa sintezom flavonoida, odnosno antocijanidina, slika P5, u poglavlju Prilozi. Naime, Asc je kofaktor trima dioksidogenazama zavisnim od 2-oksoglutarata, uključenim u biosintezu flavon3-ola i antocijanidina: flavanon 3-hidroksilazi, flavonol-sintazi i antocijanidin-sintazi. *Page* i saradnici (2012) su pokazali da mutanti *Arabidopsis*, koji imaju bar 20% smanjenu količinu Asc u listovima: *vtc1*, *vtc 2* i *vtc3*, na povišenom PAR-u (550–650 μmol m⁻² s⁻¹) proizvode manje glikozida Cy. S druge strane, kada su mutanti izlagani visokom PAR, nije bilo značajne promene u sadržaju glikozoda K. U listovima *wt Arabidopsis*, količina transkripata svih enzima biosinteze flavonoida, sem cinamat 4-hidroksilaze, je bila povišena, dok je kod mutanata ova povišena ekspresija izostala. Dodatna istraživanja sa mutantima *Arabidopsis* koji imaju samo 7% od normalne katalazne aktivnosti, pokazuju smanjenu sintezu antocijana i smanjenu ekspresiju enzima koji učestvuju u biosintezi flavonoida, što ukazuje da je H₂O₂ regulatorni molekul, koji dovodi do sinteze

antocijana (*Vanderauwera et al.* 2005). Rezultati pomenutih istraživanja se mogu povezati sa metabolizmom belog tkiva listova *P. zonale* (izostanak CAT i snižena količina Asc), u kojima nije nađeno prisusvo glikozida Cy i Pe pri izalaganju visokom intenzitetu PAR-a i u kojima nije bilo razlike u sadržaju K u odnosu na zeleno tkivo. S druge strane, pokazano je i da mutanti Arabidopsisa koji ne ekspimiraju citosolnu APX (APX1) i tAPX pokazuju pojačanu sintezu Cy nakon izlaganja HL (*Miller et al.* 2007). Imajući sve to u vidu, izgleda da povišena koncentracija H₂O₂ u ćelijama nije neophodna za indukciju biosinteze Cy glikozida, što je u saglasnosti sa pomenutim zapaženjem da ona zavisi od povećanog odnosa [PQH₂]/[PQ] (*Akthar et al.* 2010). Iako je potrebna detaljnija i opsežnija studija da bi se opisalo različita akumulacija Cy u tamjanici (izazvana isključivo UV-B zračenjem u oba tkiva, čak više u belom) i u muškatli (izazvana isključivo visokim PAR-om i to samo u zelenom tkivu), jasno je da se radi o kompleksnoj interakciji flavonoidnog metabolizma i fotosintetskog aparata i ROS. Problem dodatno komplikuje i činjenica da je kod *P. zonale* biljaka, akumulacija Cy glikozida indukovana lokalno (samo na onim zelenim delovima koji su bili direktno izoženi svetlosti, u odnosu na one u senci), dok je kod *P. coleoides* biljaka ona indukovana sistemski, jednako u svim listovima, nezavisno od njihove osvetljenosti/zasenčenosti. Primećeno je da u belim segmentima potpuno ili polovično belih listova tamjanike, nije bilo akumulacije Cy (ovo se može uočiti i na slici 4.23), što je opet, indirektno vezano za fotosintetsku aktivnost. Tako u listovima tamjanike, UV-B-indukovana akumulacija Cy i Ap glikozida predstavlja ventil za oslobađanje viška energije, kroz potrošnju TP, ATP, NADPH i malonata (*Hernández & Van Breusegem* 2010). Posebno treba imati u vidu da su antocijani različito glikozilovani, pa je to dodatni značajni „uvir” TP-a i heksoza iz Kalvinovog ciklusa. Ovome u prilog ide i pojačana ekspresija 19 enzima potrebnih za sintezu aglikona flavonoida nakon izlaganja Arabidopsisa uslovima koji dovode do pojačane asimilacije CO₂ (kao npr. visok PAR, dodavanje Glc, nedostatak azota i fosfata), dok tokom noći i u uslovima snižene koncentracije CO₂ dolazi do njihove supresije (*Vanderauwera et al.* 2005). Kako se belo, „uvir”, tkivo listova muškatle smatra dominantnim u metabolizmu azota (*Tcherkez et al.* 2012), to može biti u vezi sa odsustvom antocijana u ovim segmentima listova.

Konkretan podatak vezan za sintezu antocijanidina u fotosintetski neaktivnom tkivu listova je pokazan kod *im* mutanta Arabidopsisa. Naime, u belom tkivu listova biljaka *im* detektovano je prisustvo antocijanidin sintaze, dok je nivo ovih transkripta bio 200× veći u

zelenom tkivu. Na dalje, transkripti koji kodiraju transkripcione faktore PAP1 i PAP2 (*'production of anthocyanin pigment 1/2'*) odgovorne za sintezu antocijanina pri povišenom intenzitetu PAR-a su bili suprimirani u belom, dok je u zelenom tkivu nivo ekspresije PAP1 bio oko 9, a PAP2 oko 125 puta veći u odnosu na nepanaširane, potpuno zelene listove *Arabidopsis* (*Aluru et al. 2009*).

6. ZAKLJUČCI

Na osnovu rezultata optimizacije metoda za određivanje sadržaja Asc i fenolnih jedinjenja u listovima izvedeni su sledeći zaključci:

1. Optimizovana je i modifikovana procedura za ekstrakciju Asc iz biljnog materijala pomoću 1.5% MPA sa 1 mM EDTA. Koncentracija redukovanoog Asc određivana je direktno, a DHA nakon derivatizacije sa *o*-PDA, pomoću razvijene HPLC metode.
2. U cilju preciznog određivanja sadržaja fenolnih jedinjenja, prisutnih pre svega u listovima biljaka *P. zonale*, *P. coleioides*, *A. altissima* i *T. Platyphyllos*, razvijena je metoda sa optimizovanim uslovima ekstrakcije, hidrolize i razdvajanja. Uspostavljena HPLC-PDA metoda je pouzdana i ekonomična i omogućava istovremeno razdvajanje 42 fenolna jedinjenja širokog spektra polarosti (primenjena kao standardi), kao i fenolnih jedinjenja prisutnih u ispitivanim biljnim vrstama.
3. Primenom razvijene HPLC-PDA metode na analizu fenolnih jedinjenja u listovima panaširanih biljaka utvrđeno je da je belo i zeleno tkivo u svim varijetetima panaširanih muškatali i panaširanih tamjanika imalo jednak profil fenolnih jedinjenja, što ukazuje da distribucija fenolnih jedinjenja ne zavisi od položaja dela lista (margina ili središte), već isključivo od tipa tkiva, tj. hlorofilnog i ahlorofilnog.

Na osnovu rezultata ispitivanja antioksidativnog sistema u belom i zelenom tkivu listova muškatala mogu se izvesti sledeći zaključci:

4. Pokazano je da su panaširani listovi odličan model-sistem za proučavanje uticaja fotosinteze na efekte visokog intenziteta bele svetlosti, UV-B zračenja i tretmana parakvatom u smislu praćenja razlika antioksidativnog i sekundarnog metabolizma i komunikacije između autotrofnog, izvor tkiva i heterotrofnog, uvir tkiva.
5. U zelenom tkivu listova dolazi do većeg stvaranja ROS, ali ne dolazi do povećane akumulacije H₂O₂ pri optimalnim uslovima za rast.
6. Iako je enzim GalLDH aktivniji u belom tkivu, Asc je dvostruko više zastupljen u zelenom tkivu (u peroksizomima, mitohondrijama i jedru), a glutation u belom (u mitohondrijama, jedru i citosolu). U plastidima i citosolu fotosintetski aktivnih ćelija koncentracija Asc je niža u odnosu na iste odeljke u belim ćelijama.
7. Aktivnost enzima Asc/GSH ciklusa, kao i enzima Cu/Zn SOD i ukupne MnSOD je veća u belom tkivu, što je kompenzovano povišenom aktivnosti CAT i tAPX u zelenom tkivu listova *P. zonale*.
8. U odgovoru na pojačanu produkciju ROS u Melerovoj reakciji, značajan je brzi odgovor (u prva četiri sata) GR, DHAR i APX u oba tkiva, što upućuje na međusobnu redoks-komunikaciju između ova dva tkiva.
9. Iako je zeleno tkivo izvor intenzivnog stvaranja ROS-a tokom tretmana listova parakvatom, odgovor antioksidativnog sistema belog tkiva je bio izraženiji, što implicira da je belo tkivo veoma dobro adaptirano na uslove oksidativnog stresa.

Na osnovu rezultata ispitivanja uticaja UV-B zračenja i visokog PAR-a u belom i zelenom tkivu listova muškate i tamjanike izvedeni su sledeći zaključci:

10. Ambijentalne doze UV-B zračenja stimulišu brzinu asimilacije CO₂ i provodljivosti stoma u listovima biljaka *P. coleoides*.
11. Stimulacija fotosinteze UV-B zračenjem je predstavljala preduslov za pojačanu biosintezu glikozida Ap i Cy u oba i CA i HBA u zelenom tkivu na HL.
12. U biljkama *P. zonale*, UV-B zračenje nije uticalo na fotosintezu, već je preko trehaloznog signalnog puta dovelo do degradacije skroba, stimulisalo transport ugljenih hidrata iz zelenog u belo tkivo, što je omogućilo akumulaciju glikozida K, Q i *p*-CA.

13. Suprotno UV-B zračenju, koje je u belom tkivu uzrokovalo akumulaciju fenolnih jedinjenja sa preferencijalnom zaštitnom ('*UV-B- screening*') ulogom, visok intenzitet PAR-a je stimulisao antioksidativni sistem u zelenom tkivu, kroz akumulaciju fenola sa *orto*-dihidroksi-supstituisanim B prstenom.
14. U sinergiji sa UV-B zračenjem, visok intenzitet PARa dovodi do porasta aktivnosti APX i CAT, i sadržaja Asc samo u zelenom tkivu listova biljaka *P. zonale*, što ukazuje da je zeleno tkivo bolje adaptirano na visok intenzitet PAR-a.
15. U zelenom tkivu listova tamjanike naglašenija je uloga Asc/fenoli/peroksidaznog i Asc/APX sistema u zaštiti od povećanog ekscitacionog pritiska na visokom intenzitetu PAR-a.
16. Obe biljne vrste su bile uspešno aklimatizovane na visok intenzitet PAR-a, s obzirom na to da nije izazvan pad fotosintetske aktivnosti u zelenom, ni oksidativni stres u oba tkiva listova.
17. Indukcija akumulacije fenolnih antioksidanata (CA, Cat, Q, K i Cy) zajedno sa APX, CAT i Asc, UV-B zračenjem, omogućava efikasnu zaštitu od oksidativnog stresa u fotosintetski aktivnom tkivu listova biljaka *P. zonale* izlaganih visokom intenzitetu PAR-a.

7. LITERATURA:

- Abdel-Mogib, M., Albar, H.A. & Batterjee, S.M. (2002) Chemistry of the genus *Plectranthus*. *Molecules* 7, 271–301.
- Adamiec, M., Drath, M. & Jackowski, G. (2008) Redox state of plastoquinone pool regulates expression of *Arabidopsis thaliana* genes in response to elevated irradiance. *Acta Biochimica Polonica* 55, 161–73.
- Agati, G., Matteini, P., Goti, A. & Tattini, M. (2007) Chloroplast-located flavonoids can scavenge singlet oxygen. *New Phytologist* 174, 77–89.
- Agati, G., Stefano, G., Biricolti, S. & Tattini, M. (2009) Mesophyll distribution of ‘antioxidant’ flavonoid glycosides in *Ligustrum vulgare* leaves under contrasting sunlight irradiance. *Annals of Botany*. 104, 853–861.
- Agati, G. & Tattini, M. (2010) Multiple functional roles of flavonoids in photoprotection. *New Phytologist* 186, 786–793.
- Agati, G., Cerović, Z. G., Pinelli, P. & Tattini, M. (2011) Light-induced accumulation of ortho-dihydroxylated flavonoids as non-destructively monitored by chlorophyll fluorescence excitation techniques. *Environmental and Experimental Botany* 73, 3–9.
- Agati, G., Azzarello, E., Pollastri, S., & Tattini, M. (2012). Flavonoids as antioxidants in plants: location and functional significance. *Plant Science* 196, 67–76.
- Agati, G., Brunetti, C., Di Ferdinando, M., Ferrini, F., Pollastri, S. & Tattini, M. (2013) Functional roles of flavonoids in photoprotection: new evidence, lessons from the past. *Plant Physiology and Biochemistry* 72, 35–45.
- Akhtar, T.A., Lees, H.A., Lampi, M.A., Enstone, D., Brain, R.A. & Greenberg, B.M. (2010) Photosynthetic redox imbalance influences flavonoid biosynthesis in *Lemna gibba*. *Plant, Cell & Environment* 33, 1205–1219.
- Albert, K. R., Mikkelsen, T. N. & Ro-Poulsen, H. (2008) Ambient UV-B radiation decreases photosynthesis in high arctic *Vaccinium uliginosum*. *Physiologia Plantarum* 133, 199–210.
- Albert, K.R., Mikkelsen, T.N., Ro-Poulsen, H., Arndal, M.F. & Michelsen, A. (2011) Ambient UV-B radiation reduces PSII performance and net photosynthesis in high Arctic *Salix arctica*. *Environmental and Experimental Botany* 72, 439–447.

- Alscher, R.G., Erturk, N. & Heath, L.S. (2002) Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *Journal of Experimental Botany* 53, 1331–1341.
- Aluru, M., Bae, H., Wu, D. & Rodermel, S. (2001) The *Arabidopsis immutans* mutation affects plastid differentiation and the morphogenesis of white and green sectors in variegated plants. *Plant Physiology* 127, 67–77.
- Aluru, M.R., Yu, F., Fu, A. & Rodermel, S. (2006) Arabidopsis variegation mutants: new insights into chloroplast biogenesis. *Journal of Experimental Botany* 57, 1871–1881.
- Aluru, M.R., Stessman, D., Spalding, M.H. & Rodermel, S.R. (2007) Alterations in photosynthesis in Arabidopsis lacking IMMUTANS, a chloroplast terminal oxidase. *Photosynthesis Research* 91, 11–23.
- Aluru, M.R., Zola, J., Foudree, A. & Rodermel, S.R. (2009) Chloroplast photooxidation-induced transcriptome reprogramming in Arabidopsis *immutans* white leaf sectors. *Plant Physiology* 150, 904–923.
- Amako, K., Ushimaru, T., Ishikawa, A., Ogishi, Y., Kishimoto, R. & Goda, K. (2006) Heterologous expression of dehydroascorbate reductase from rice and its application to determination of dehydroascorbate concentrations. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology* 52, 89–95.
- Antolovich, M., Prenzler, P., Robards, K. & Ryan, D. (2000) Sample preparation in the determination of phenolic compounds in fruits. *Analyst* 125, 989–1009.
- Apel, K. & Hirt, H. (2004) Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology* 55, 373–399.
- APG II (2003) An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. *Botanical Journal of the Linnean Society* 141, 399–436.
- Aphalo, P.J. & Sánchez, R.A. (1986) Stomatal responses to light and drought stress in variegated leaves of *Hedera helix*. *Plant Physiology* 81, 768–773.
- Aphalo, P.J., Albert, A., Björn, L.O., McLeod, A., Robson, T.M. & Rosenqvist, E. (2012) Beyond the visible: a handbook of best practice in plant UV photobiology (eds. Aphalo, P.J., Albert, A., Björn, L.O., McLeod, A., Robson, T.M. & Rosenqvist, E.), COST Action FA0906 UV4growth, University of Helsinki (Helsingin yliopisto), Finland.
- Apostol, I., Heinstein, P.F. & Low, P.S. (1989) Rapid stimulation of an oxidative burst during elicitation of cultured plant cells: role in defense and signal transduction. *Plant Physiology* 90, 109–116.
- Asada, K. (1992) Ascorbate peroxidase - a hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. *Physiologia Plantarum* 85, 235–241.
- Asada, K. (1999) The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 50, 601–639.
- Asada, K. (2000) The water–water cycle as alternative photon and electron sinks. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 355, 1419–1431.
- Asada, K. (2006) Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. *Plant Physiology* 141, 391–396.
- Ascensão, L., Mota, L., & Castro, M. D. M. (1999). Glandular trichomes on the leaves and flowers of *Plectranthus ornatus*: morphology, distribution and histochemistry. *Annals of Botany*, 84(4), 437–447.
- Austin, J.R., Frost, E., Vidi, P.A., Kessler, F. & Staehelin, L.A. (2006) Plastoglobules are lipoprotein subcompartments of the chloroplast that are permanently coupled to thylakoid membranes and contain biosynthetic enzymes. *The Plant Cell* 18, 1693–1703.
- Babbs, C.F., Pham, J. A. & Coolbaugh, R.C. (1989) Lethal hydroxyl radical production in paraquat-treated plants. *Plant Physiology* 90, 1267–1270.

- Badejo, A.A., Wada, K., Gao, Y., Maruta, T., Sawa, Y., Shigeoka, S. & Ishikawa, T. (2012) Translocation and the alternative D-galacturonate pathway contribute to increasing the ascorbate level in ripening tomato fruits together with the D-mannose/L-galactose pathway. *Journal of Experimental Botany* 63, 229–239.
- Baier, M. & Dietz, K.J. (2005) Chloroplasts as source and target of cellular redox regulation: a discussion on chloroplast redox signals in the context of plant physiology. *Journal of Experimental Botany* 56, 1449–1462.
- Baker, N.R., Harbinson, J. & Kramer, D.M. (2007) Determining the limitations and regulation of photosynthetic energy transduction in leaves. *Plant, Cell and Environment* 30, 1107–1125.
- Baker, N.R. (2008) Chlorophyll fluorescence: a probe of photosynthesis in vivo. *Annual Review of Plant Biology* 59, 89–113.
- Bakker, F.T., Culham, A., Pankhurst, C.E. & Gibby, M. (2000) Mitochondrial and chloroplast DNA-based phylogeny of Pelargonium (Geraniaceae). *American Journal of Botany* 87, 727–734.
- Ballaré, C.L., Caldwell, M.M., Flint, S.D., Robinson, S.A. & Bornman, J.F. (2011) Effects of solar ultraviolet radiation on terrestrial ecosystems. Patterns, mechanisms, and interactions with climate change. *Photochemical and Photobiological Sciences* 10, 226–241.
- Bartoli, C.G., Guamet, J.J., Kiddle, G.U. Y., Pastori, G.M., Di Cagno, R., Theodoulou, F.L. & Foyer, C.H. (2005) Ascorbate content of wheat leaves is not determined by maximal L-galactono-1, 4-lactone dehydrogenase (GalLDH) activity under drought stress. *Plant, Cell and Environment* 28, 1073–1081.
- Bartoli, C.G., Yu, J., Gómez, F., Fernández, L., McIntosh, L. & Foyer, C.H. (2006) Inter-relationships between light and respiration in the control of ascorbic acid synthesis and accumulation in *Arabidopsis thaliana* leaves. *Journal of Experimental Botany* 57, 1621–1631.
- Bartoli, C.G., Tambussi, E.A., Diego, F. & Foyer, C.H. (2009) Control of ascorbic acid synthesis and accumulation and glutathione by the incident light red/far red ratio in *Phaseolus vulgaris* leaves. *FEBS Letters* 583, 118–122.
- Barsig, M. & Malz, R. (2000) Fine structure, carbohydrates and photosynthetic pigments of sugar maize leaves under UV-B radiation. *Environmental and Experimental Botany* 43, 121–130.
- Beauchamp, C. & Fridovich, I. (1970) A mechanism for the production of ethylene from methional. *The Journal of Biological Chemistry* 245, 4641–4646.
- Beauchamp, C. & Fridovich, I. (1971) Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry* 44, 276–287.
- Berling, D.J. & Woodward, F.I. (1995) Stomatal responses of variegated leaves to CO₂ enrichment. *Annals of Botany* 75, 507–511.
- Behn, H., Albert, A., Marx, F., Noga, G. & Ulbrich, A. (2010) Ultraviolet-B and photosynthetically active radiation interactively affect yield and pattern of monoterpenes in leaves of peppermint (*Mentha × piperita* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58, 7361–7367.
- Bérczi, A. & Møller, I.M. (2000) Redox enzymes in the plant plasma membrane and their possible roles. *Plant, Cell and Environment* 23, 1287–1302.
- Berli, F.J., Alonso, R., Bressan-Smith, R. & Bottini, R. (2013) UV-B impairs growth and gas exchange in grapevines grown in high altitude. *Physiologia Plantarum* 149, 127–140.
- Bestwick, C.S., Brown, I.R. & Mansfield, J.W. (1998) Localized changes in peroxidases activity accompany hydrogen peroxide generation during the development of a nonhost hypersensitive reaction in lettuce. *Plant Physiology* 118, 1067–1078.
- Bienert, G.P., Moller, A.L.B., Kristiansen, K.A., Schulz, A., Moller, I.M., Schjoerring, J.K. & Jahn, T.P. (2007) Specific aquaporins facilitate the diffusion of hydrogen peroxide across membranes. *Journal of Biological Chemistry* 282, 1183–1192.
- Bilger, W. & Björkman, O. (1990) Role of the xanthophyll cycle in photoprotection elucidated by measurements of light-induced absorbance changes, fluorescence and photosynthesis in leaves of *Hedera canariensis*. *Photosynthesis Research* 25, 173–185.

- Bilger, W., Veit, M., Schreiber, L. & Schreiber, U. (1997) Measurement of leaf epidermal transmittance of UV radiation by chlorophyll fluorescence. *Physiologia Plantarum* 101, 754–763.
- Birky, C.W. (1976) The inheritance of genes in mitochondria and chloroplasts. *BioScience* 26, 26–33.
- Bogdanović, J., Prodanović, R., Milosavić, N., Prodanović, O. & Radotić, K. (2006) Multiple forms of superoxide dismutase in the apoplast and whole-needle extract of Serbian spruce [*Picea omorika* (Panč.) Purkyně]. *Archives of Biological Sciences* 58, 211–214.
- Bolink, E.M., Van Schalkwijk, I., Posthumus, F. & Van Hasselt, P.R. (2001) Growth under UV-B radiation increases tolerance to high-light stress in pea and bean plants. *Plant Ecology* 154, 147–156.
- Bolwell, G.P., Bindschedler, L.V., Blee, K.A., Butt, V.S., Davies, D.R., Gardner, S. L., ... & Minibayeva, F. (2002) The apoplastic oxidative burst in response to biotic stress in plants: a three-component system. *Journal of Experimental Botany* 53, 1367–1376.
- Bradford, M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248–254.
- Bréhélin, C. & Kessler, F. (2008) The plastoglobule: a bag full of lipid biochemistry tricks. *Photochemistry and Photobiology* 84, 1388–1394.
- Brosché, M., Schuler, M.A., Kalbina, I., Connor, L. & Strid, Å. (2002) Gene regulation by low level UV-B radiation: identification by DNA array analysis. *Photochemical & Photobiological Sciences* 1, 656–664.
- Brosché, M. & Strid, Å. (2003) Molecular events following perception of ultraviolet-B radiation by plants: UV-B induced signal transduction pathways and changes in gene expression. *Physiologia Plantarum* 117, 1–10.
- Brown, B.A., Cloix, C., Jiang, G.H., Kaiserli, E., Herzyk, P., Kliebenstein, D.J. & Jenkins, G.I. (2005) A UV-B-specific signaling component orchestrates plant UV protection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 18225–18230.
- Brown, B.A. & Jenkins, G.I. (2008) UV-B signaling pathways with different fluence-rate response profiles are distinguished in mature Arabidopsis leaf tissue by requirement for UVR8, HY5, and HYH. *Plant Physiology* 146, 576–588.
- Brunetti, C., Di Ferdinando, M., Fini, A., Pollastri, S. & Tattini, M. (2013) Flavonoids as antioxidants and developmental regulators: relative significance in plants and humans. *International Journal of Molecular Sciences* 14, 3540–3555.
- Buettner G.R. & Jurkiewicz B.A. (1996) Catalytic metals, ascorbate and free radicals: combinations to avoid. *Radiation Research* 145, 532–541.
- Buettner, G.R. (1993) The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, α -tocopherol, and ascorbate. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 300, 535–543.
- Burkhead J.L., Gogolin Reynolds K.A., Abdel-Ghany S.E., Cohu C.M. & Pilon M. (2009) Tansley review. Copper homeostasis. *New Phytologist* 182, 799–816.
- Caldwell, M.M. (1971) Solar ultraviolet radiation and the growth and development of higher plants. In: *Photophysiology: current topics in photobiology and photochemistry, Volume 6* (ed. Giese, A.C.), Academic Press, New York, USA. pp. 131–177.
- Caldwell, M.M. & Flint, S.D. (1994) Stratospheric ozone reduction, solar UV-B radiation and terrestrial ecosystems. *Climatic Change* 28, 375–394.
- Caldwell, M.M., Bornman, J.F., Ballaré, C.L., Flint, S.D. & Kulandaivelu, G. (2007) Terrestrial ecosystems, increased solar ultraviolet radiation, and interactions with other climate change factors. *Photochemical and Photobiological Sciences* 6, 252–266.
- Cao, G., Sofic, E. & Prior, R.L. (1997) Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. *Free Radical Biology and Medicine* 22, 749–760.
- Cerović, Z.G., Ounis, A., Cartelat, A., Latouche, G., Goulas, Y., Meyer, S. & Moya, I. (2002) The use of chlorophyll fluorescence excitation spectra for the non-destructive *in situ* assessment of UV-absorbing compounds in leaves. *Plant, Cell and Environment* 25, 1663–1676.

- Chan, T., Galati, G. & O'Brien, P.J. (1999) Oxygen activation during peroxidase catalysed metabolism of flavones or flavanones. *Chemico-Biological Interactions* 122, 15–25.
- Chapman, A.G. & Camp, W.H. (1932) Starch synthesis in the variegated leaves of pelargonium. *The Ohio Journal of Science* 32, 197–217.
- Charuvi, D., Kiss, V., Nevo, R., Shimoni, E., Adam, Z. & Reich, Z. (2012) Gain and loss of photosynthetic membranes during plastid differentiation in the shoot apex of Arabidopsis. *The Plant Cell* 24, 1143–1157.
- Cheeseman, J.M. (2006) Hydrogen peroxide concentrations in leaves under natural conditions. *Journal of Experimental Botany* 57, 2435–2444
- Cheeseman, J.M. (2007) Hydrogen peroxide and plant stress: a challenging relationship. *Plant Stress* 1, 4–15.
- Chen, M., Jensen, M. & Rodermel, S. (1999) The yellow variegated mutant of Arabidopsis is plastid autonomous and delayed in chloroplast biogenesis. *Journal of Heredity* 90, 207–214.
- Chen, S. & Schopfer, P. (1999) Hydroxyl-radical production in physiological reactions. A novel function of peroxidase. *European Journal of Biochemistry* 260, 726–773.
- Chen, X. & Ahn, D.U. (1998) Antioxidant activities of six natural phenolics against lipid oxidation induced by Fe²⁺ or ultraviolet light. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 75, 1717–1721.
- Chen, Z. & Gallie, D.R. (2004) The ascorbic acid redox state controls guard cell signaling and stomatal movement. *Plant Cell* 16, 1143–1162.
- Chen, Z. & Gallie, D.R. (2006) Dehydroascorbate reductase affects leaf growth, development, and function. *Plant Physiology* 142, 775–787.
- Cheng, Y-C. & Fleming, G.R. (2009) Dynamics of light harvesting in photosynthesis. *Annual Review of Physical Chemistry* 60, 241–262.
- Choi, S.M., Suh, K.H., Kim, J.S. & Park, Y.I. (2001) Inactivation of photosystem I in cucumber leaves exposed to paraquat-induced oxidative stress. *Journal of Photoscience* 8, 13–17.
- Chow, P.S. & Landhäusser, S.M. (2004) A method for routine measurements of total sugar and starch content in woody plant tissues. *Tree Physiology* 24, 1129–1136.
- Christie, J.M., Arvai, A.S., Baxter, K.J., Heilmann, M., Pratt, A.J., O'Hara, A., ... & Getzoff, E.D. (2012) Plant UVR8 photoreceptor senses UV-B by tryptophan-mediated disruption of cross-dimer salt bridges. *Science* 335, 1492–1496.
- Cloix, C., Kaiserli, E., Heilmann, M., Baxter, K.J., Brown, B.A., O'Hara, A., ... & Jenkins, G.I. (2012) C-terminal region of the UV-B photoreceptor UVR8 initiates signaling through interaction with the COP1 protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109, 16366–16370.
- Cobbett, C. & Goldsbrough, P. (2002) Phytochelatins and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annual Review of Plant Biology* 53, 159–182.
- Cochemé, H.M. & Murphy, M.P. (2008) Complex I is the major site of mitochondrial superoxide production by paraquat. *Journal of Biological Chemistry* 283, 1786–1798.
- Codd, L.E. (1975) *Plectranthus* (Labiatae) and allied genera in Southern Africa. *Bothalia* 11, 371–442.
- Colville, L., Sáez, C.M.B., Lewis, G. P. & Kranner, I. (2015) The distribution of glutathione and homoglutathione in leaf, root and seed tissue of 73 species across the three sub-families of the *Leguminosae*. *Phytochemistry* 115, 175–183.
- Comont, D., Martinez Abaigar, J., Albert, A., Aphalo, P., Causton, D. R., Figueroa, F. L., ... & Gwynn-Jones, D. (2012) UV responses of *Lolium perenne* raised along a latitudinal gradient across Europe: a filtration study. *Physiologia Plantarum* 145, 604–618.
- Craig, R. (1998) United States Patents and Trademark Office. Patent Genius: Alexandria. URL [<http://www.patentgenius.com/patent/PP6218.html>]; pristupljeno aprila 2015.
- Croft, K.D. (1998) The chemistry and biological effects of flavonoids and phenolic acids. *Annals of the New York Academy of Sciences* 854, 435–442.

- Crozier, A., Jensen, E., Lean, M.E. & McDonald, M. S. (1997) Quantitative analysis of flavonoids by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 761, 315–321.
- Cuypers, A., Vangronsveld, J. & Clijsters, H. (2001) The redox status of plant cells (AsA and GSH) is sensitive to zinc imposed oxidative stress in roots and primary leaves of *Phaseolus vulgaris*. *Plant Physiology and Biochemistry* 39, 657–664.
- Dąbrowska, G., Kata, A., Goc, A., Szechyńska-Hebda, M. & Skrzypek, E. (2007) Characteristics of the plant ascorbate peroxidase family. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica* 49, 7–17.
- Davey, M.P., Susanti, N.I., Wargent, J.J., Findlay, J.E., Quick, W.P., Paul, N.D. & Jenkins, G.I. (2012) The UV-B photoreceptor UVR8 promotes photosynthetic efficiency in *Arabidopsis thaliana* exposed to elevated levels of UV-B. *Photosynthesis Research* 114, 121–131.
- De Gara, L., de Pinto, M.C. & Arrigoni O. (1997) Ascorbate synthesis and ascorbate peroxidase activity during the early stage of wheat germination. *Physiologia Plantarum* 100, 894–900.
- De Gara, L., Paciollaa, C., De Tullioa, M.C., Mottoc, M. & Arrigonia, O. (2000) Ascorbate-dependent hydrogen peroxide detoxification and ascorbate regeneration during germination of a highly productive maize hybrid: Evidence of an improved detoxification mechanism against reactive oxygen species. *Physiologia Plantarum* 109, 7–13.
- De Lamotte, F., Vianey-Liaud, N., Duviau, M.P. & Kobrehel, K. (2000) Glutathione reductase in wheat grain. 1. Isolation and characterization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48, 4978–4983.
- Demiray, S., Pintado, M. E., & Castro, P. M. L. (2009). Evaluation of phenolic profiles and antioxidant activities of Turkish medicinal plants: *Tilia argentea*, *Crataegi folium* leaves and *Polygonum bistorta* roots. *World Academy of Science, Engineering and Technology* 54, 312–317.
- Demmig-Adams, B., Gilmore, A. M. & Adams, W. (1996)a Carotenoids 3: in vivo function of carotenoids in higher plants. *The FASEB Journal* 10, 403–412.
- Demmig-Adams, B. & Adams, W.W. (1996)b The role of xanthophyll cycle carotenoids in the protection of photosynthesis. *Trends in Plant Science* 1, 21–26.
- Dmitrović, S., Perišić, M., Stojić, A., Živković, S., Boljević, J., Živković, J. N., ... & Mišić, D. (2015). Essential oils of two *Nepeta* species inhibit growth and induce oxidative stress in ragweed (*Ambrosia artemisiifolia* L.) shoots in vitro. *Acta Physiologiae Plantarum* 37, 1–15.
- De Pinto, M.C., Francis, D. & De Gara, L. (1999) The redox state of the ascorbate-dehydroascorbate pair as a specific sensor of cell division in tobacco BY-2 cells. *Protoplasma* 209, 90–97.
- De Pinto, M.C. & De Gara, L. (2004) Changes in the ascorbate metabolism of apoplastic and symplastic spaces are associated with cell differentiation. *Journal of Experimental Botany* 55, 2559–2569.
- Debolt S., Melino V. & Ford C.M. (2007) Ascorbate as a biosynthetic precursor in plants. *Annals of Botany* 99, 3–8.
- Del Río, L.A., Corpas, F.J., Sandalio, L.M., Palma, J.M. & Barroso, J.B. (2003) Plant peroxisomes, reactive oxygen metabolism and nitric oxide. *IUBMB Life* 55, 71–81.
- Destro, T., Prasad, D., Martignago, D., Bernet, I. L., Trentin, A. R., Renu, I. K., ... & Masi, A. (2010) Compensatory expression and substrate inducibility of γ -glutamyl transferase GGT2 isoform in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany* 62, 808–814.
- Deutsch, J.C. (2000) Dehydroascorbic acid. *Journal of Chromatography A* 881, 299–307.
- Diaz-Vivancos, P., Dong, Y.-P., Ziegler, K., Marković, J., Pallardó, F., Pellny, T.K., Verrier, P. & Foyer, C.H. (2010) Recruitment of glutathione into the nucleus during cell proliferation adjusts whole cell redox homeostasis in *Arabidopsis thaliana* and lowers the oxidative defence shield. *The Plant Journal* 64, 825–838.
- Dietz, K.J. & Pfannschmidt, T. (2011) Novel regulators in photosynthetic redox control of plant metabolism and gene expression. *Plant Physiology* 155, 1477–1485.

- Dixon, R.A. & Paiva, N. (1995) Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell* 7, 1085–1097.
- Donahue, J.L., Okpodu, C.M., Cramer, C.L., Grabau, E.A. & Alscher R.G. (1997) Responses of antioxidant to paraquat in pea leaves. *Plant Physiology* 113, 249–257.
- Durst, R.W. & Wrolstad, R.E. (2001) Unit F.1.3: Separation and characterization of anthocyanins by HPLC. In: *Current Protocols in Food Analytical Chemistry* (ed. Wrolstad, R.E.), John Wiley & Sons Inc: New York. pp. F1.3.1.–F.1.3.13.
- Edwards, T.J., Paton, A. & Crouch, N.R. (2000) A new species of *Plectranthus* (*Lamiaceae*) from Zimbabwe. *Kew Bulletin* 55, 459–464.
- Ehlers, K. & van Bel, A.J.E. (2010) Dynamics of plasmodesmal connectivity in successive interfaces of the cambial zone. *Planta* 231, 371–385.
- Eitenmiller, R.R., Ye, L. & Landen, Jr W.O. (2008) Ascorbic acid: vitamin C. In: *Vitamin analysis for the health and food sciences* (eds. Eitenmiller, R.R., Ye, L. & Landen, Jr W.O.), CRC Press, Boca Raton, USA. pp. 231–289.
- Evenari, M. (1989) The history of research on white-green variegated plants. *The Botanical Review* 55, 106–139
- Facchinelli, F. & Weber, A.P. (2011) The metabolite transporters of the plastid envelope: an update. *Frontiers in Plant Science* 2, 1–18.
- Favory, J.-J., Stec, A., Gruber, H., Rizzini, L., Oravec, A., Funk, M., Albert, A., Cloix, C., Jenkins, G.I., Oakeley, E.J., Seidlitz, H.K., Nagy, F. & Ulm, R. (2009) Interaction of COP1 and UVR8 regulates UV-B-induced photomorphogenesis and stress acclimation in Arabidopsis. *EMBO Journal* 28, 591–601.
- Ferrerres, F., Figueiredo, R., Bettencourt, S., Carqueijeiro, I., Oliveira, J., Gil-Izquierdo, A., ... & Sottomayor, M. (2011) Identification of phenolic compounds in isolated vacuoles of the medicinal plant *Catharanthus roseus* and their interaction with vacuolar class III peroxidase: an H₂O₂ affair? *Journal of Experimental Botany* 62, 2841–2854.
- Ferretti, M., Destro, T., Tosatto, S.C., La Rocca, N., Rascio, N. & Masi, A. (2009) Gamma-glutamyl transferase in the cell wall participates in extracellular glutathione salvage from the root apoplast. *New Phytologist* 181, 115–126.
- Flexas, J. & Medrano, H. (2002) Drought-inhibition of photosynthesis in C3 plants: stomatal and non-stomatal limitations revisited. *Annals of Botany* 89, 183–189.
- Forkmann, G., Heller, W. & Grisebach, H. (1980) Anthocyanin biosynthesis in flowers of *Matthiola incana* Flavanone 3- and flavonoid 3'-hydroxylases. *Zeitschrift für Naturforschung Teil C* 35, 691–695.
- Foudree, A.A. (2012) A study of chloroplast biogenesis within variegated mutants of Arabidopsis. Graduate theses and dissertations, Iowa State University, USA. Paper 12858.
- Foudree, A., Putarjunan, A., Kambakam, S., Nolan, T., Fussell, J., Pogorelko, G. & Rodermel, S. (2012) The mechanism of variegation in *immotans* provides insight into chloroplast biogenesis. *Frontiers in Plant Science* 3, 1–10
- Foyer, C.H. & Halliwell, B. (1976) Presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplast; a proposed role in ascorbic acid metabolism. *Planta* 133, 21–25.
- Foyer, C.H., Rowell, J. & Walker, D. (1983) Measurement of the ascorbate content of spinach leaf protoplasts and chloroplasts during illumination. *Planta* 57, 239–244.
- Foyer, C.H. & Noctor, G. (2000) Tansley Review No. 112. Oxygen processing in photosynthesis: regulation and signalling. *New Phytologist* 146, 359–388.
- Foyer, C.H. & Noctor, G. (2003) Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. *Physiologia Plantarum* 119, 355–364.
- Foyer, C.H. & Noctor, G. (2005) Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. *Plant Cell* 17, 1866–1875.
- Foyer, C.H., Bloom, A.J., Queval, G. & Noctor, G. (2009) a Photorespiratory metabolism: genes, mutants, energetics, and redox signaling. *Annual Review of Plant Biology* 60, 455–484.

- Foyer, C.H. & Noctor, G. (2009)b Redox regulation in photosynthetic organisms: signaling, acclimation, and practical implications. *Antioxidants and Redox Signaling* 11, 861–905.
- Foyer, C.H. & Noctor, G. (2011) Ascorbate and glutathione: the heart of the redox hub. *Plant Physiology* 155, 2–18.
- Foyer, C.H. & Shigeoka, S. (2011) Understanding oxidative stress and antioxidant functions to enhance photosynthesis. *Plant Physiology* 155, 93–100.
- Foyer, C.H., Neukermans, J., Queval, G., Noctor, G. & Harbinson, J. (2012) Photosynthetic control of electron transport and the regulation of gene expression. *Journal of Experimental Botany* 63, 1637–1661.
- Fritz, C., Palacios-Rojas, N., Feil, R. & Stitt, M. (2006) Regulation of secondary metabolism by the carbon–nitrogen status in tobacco: nitrate inhibits large sectors of phenylpropanoid metabolism. *The Plant Journal* 46, 533–548.
- Frohnmeier, H. & Staiger, D. (2003) Ultraviolet-B radiation-mediated responses in plants. Balancing damage and protection. *Plant Physiology* 133, 1420–1428.
- Fryer, M.J., Andrews, J.R., Oxborough, K., Blowers, D. A. & Baker, N.R. (1998) Relationship between CO₂ assimilation, photosynthetic electron transport, and active O₂ metabolism in leaves of maize in the field during periods of low temperature. *Plant Physiology* 116, 571–580.
- Fryer, M.J., Ball, L., Oxborough, K., Karpinski, S., Mullineaux, P.M. & Baker, N.R. (2003) Control of ascorbate peroxidase 2 expression by hydrogen peroxide and leaf water status during excess light stress reveals a functional organization of *Arabidopsis* leaves. *The Plant Journal* 33, 691–705.
- Gallard, A. (2008) Etude de la cryoconservation d'apex en vue d'une conservation à long terme de collections de ressources génétiques végétales: compréhension des phénomènes mis en jeu et évaluation de la qualité du matériel régénéré sur le modèle *Pelargonium* (Doctoral dissertation, Université d'Angers). PhD Thesis, University of Angers, France.
- Gechev, T., Willekens, H., Van Montagu, M., Inzé, D., Van Camp, W., Toneva, V. & Minkov, I. (2003) Different responses of tobacco antioxidant enzymes to light and chilling stress. *Journal of Plant Physiology* 160, 509–515.
- Genty, B., Briantais, J.-M. & Baker, N.R. (1989) The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)* 990, 87–92.
- Gest, N., Gautier, H. & Stevens, R. (2012) Ascorbate as seen through plant evolution: the rise of a successful molecule? *Journal of Experimental Botany* 64, 33–53.
- Gilmore, A.M. (1997) Mechanistic aspects of xanthophyll cycle-dependent photoprotection in higher plant chloroplasts and leaves. *Physiologia Plantarum* 99, 197–209.
- Gitz, D.C., Britz, S.J. & Sullivan, J.H. (2013) Effect of ambient UV-B on stomatal density, conductance and isotope discrimination in four field grown soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] isolines. *American Journal of Plant Sciences* 4, 100–108.
- Götz, M., Albert, A., Stich, S., Heller, W., Scherb, H., Krins A.,..., Ernst, D. (2010) PAR modulation of the UV-dependent levels of flavonoid metabolites in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. leaf rosettes: cumulative effects after a whole vegetative growth period. *Protoplasma* 243, 95–103.
- Gould, K.S., Kuhn, D.N., Lee, D.W. & Oberbauer, S.F. (1995) Why leaves are sometimes red? *Nature* 378, 241–242.
- Gould, K.S., McKelvie, J. & Markham, K.R. (2002) Do anthocyanins function as antioxidants in leaves? Imaging of H₂O₂ in red and green leaves after mechanical injury. *Plant and Cell Environment* 25, 1261–1269.
- Gould, K.S. & Lister, C. (2005) Flavonoid functions in plants. In: *Flavonoids: chemistry, biochemistry and applications* (eds. Andersen, Ø.M. & Markham, K.R.), CRC Press Taylor & Francis, Boca Raton, USA. pp. 397–442.

- Grayer, R.J., Eckert, M.R., Lever, A., Veitch, N.C., Kite, G.C. & Paton, A.J. (2010) Distribution of exudate flavonoids in the genus *Plectranthus*. *Biochemical Systematics and Ecology* 38, 335–341.
- Green, A.E.S., Sawada, T. & Shettle, E.P. (1974) The middle ultraviolet reaching the ground. *Photochemistry and Photobiology* 19, 251–259.
- Green, M.A. & Fry, S.C. (2005) Apoplastic degradation of ascorbate: novel enzymes and metabolites permeating the plant cell wall. *Plant Biosystems* 139, 2–7.
- Grieger, P. (2007) Untersuchungen zur Züchtung variegater *Pelargonium x zonale*-Hybriden auf tetraploider Stufe. Doctoral dissertation, Agricultural-Horticultural Faculty, Humboldt University Berlin, Germany.
- Grieve, P. (1868) A history of ornamental foliated pelargoniums. British Pelargonium and Geranium Society, London, UK.
- Grimsrud, P.A., Xie, H., Griffin, T.J. & Bernlohr, D.A. (2008) Oxidative stress and covalent modification of protein with bioactive aldehydes. *Journal of Biological Chemistry* 283, 21837–21841.
- Hadži-Tašković Šukalović, V., Vuletić, M. & Vučinić, Ž. (2005) The role of *p*-coumaric acid in oxidative and peroxidative cycle of the ionically bound peroxidase of the maize root cell wall. *Plant Science* 168, 931–938.
- Häkkinen, S.H., Kärenlampi, S.O., Heinonen, I.M., Mykkanen, H.M. & Törrönen, A.R. (1998) HPLC method for screening of flavonoids and phenolic acids in berries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 77, 543–551.
- Halliwell, B. & Gutteridge, J.M.C. (2007) Free radicals in biology and medicine, 4th ed., Oxford Science Publications, Oxford, UK.
- Han, Y., Chaouch, S., Hamden, A., Queval, G., Zechmann, B. & Noctor, G. (2013) Functional analysis of Arabidopsis mutants points to novel roles for glutathione in coupling H₂O₂ to activation of salicylic acid accumulation and signaling. *Antioxidants and Redox Signaling* 18, 2106–2121.
- Hawkes, T.R. (2014) Mechanisms of resistance to paraquat in plants. *Pest Management Science* 70, 1316–1323.
- Heber, U. (2012) Conservation and dissipation of light energy in desiccation-tolerant photoautotrophs, two sides of the same coin. *Photosynthesis Research* 113, 5–13.
- Heijde, M., Ulm, R., 2012. UV-B photoreceptor-mediated signalling in plants. *Trends in Plant Science* 17, 230–237.
- Heldt, H.-W. (2005) Plant Biochemistry. Elsevier Academic Press Burlington, USA.
- Hernández, I., Alegre, L., Van Breusegem, F. & Munné-Bosch, S. (2009) How relevant are flavonoids as antioxidants in plants? *Trends in Plant Science* 141, 125–132.
- Hernández, I. & Van Breusegem, F. (2010) Opinion on the possible role of flavonoids as energy escape valves: novel tools for nature's Swiss army knife? *Plant Science* 179, 297–301.
- Hertog, M.G.L., Hollman, P.C.H. & Venema, D.P. (1992) Optimization of a quantitative HPLC determination of potentially anticarcinogenic flavonoids in vegetables and fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 40, 1591–1598.
- Heyneke, E., Luschin-Ebengreuth, N., Krajcer, I., Wolking, V., Müller, M. & Zechmann, B. (2013) Dynamic compartment specific changes in glutathione and ascorbate levels in Arabidopsis plants exposed to different light intensities. *BMC Plant Biology* 13, 104–123.
- Hibberd, S. (1870) Variegated pelargoniums. In: *New and rare beautiful-leaved plants: containing illustrations and descriptions of the most ornamental-foliaged plants* (ed. Hibberd, S.), Bell & Daldy, London, UK. pp. 136–138.
- Hideg, É., Spetea, C. & Vass, I. (1994) Singlet oxygen production in thylakoid membranes during photoinhibition as detected by EPR spectroscopy. *Photosynthesis Research* 39, 191–199.
- Hideg, É. & Vass, I. (1996) UV-B induced free radical production in plant leaves and isolated thylakoid membranes. *Plant Science* 115, 251–260.

- Hideg, É., Rosenqvist, E., Váradi, Gy., Bornman, J. & Vincze, É. (2006) A comparison of UV-B induced stress responses in three barley cultivars. *Functional Plant Biology* 33, 77–90.
- Hideg, É., Jansen, M.A.K. & Strid, Å. (2013) UV-B exposure, ROS, and stress: inseparable companions or loosely linked associates? *Trends in Plant Science* 18, 107–115.
- Hossain, M.A. & Asada, K. (1984a) Inactivation of ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts on dark addition of hydrogen peroxide: its protection by ascorbate. *Plant and Cell Physiology* 25, 1285–1295.
- Hossain, M.A. & Asada, K. (1984b) Purification of dehydroascorbate reductase from spinach and its characterization as a thiol enzyme. *Plant and Cell Physiology* 25, 85–92.
- Hossain, M.A. & Asada, K. (1985) Monodehydroascorbate reductase from cucumber is a flavin adenine dinucleotide enzyme. *Journal of Biological Chemistry* 260, 12920–12926.
- Hossain, M.B., Rai, D.K., Brunton, N.P., Martin-Diana, A.B. & Barry-Ryan, C. (2010) Characterization of phenolic composition in *Lamiaceae* spices by LC-ESI-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58, 10576–10581.
- Hu, Z., Li, H., Chen, S. & Yang, Y. (2013) Chlorophyll content and photosystem II efficiency in soybean exposed to supplemental ultraviolet-B radiation. *Photosynthetica* 51, 151–157.
- Huang, C., Yu, Q.B., Yuan, X.B., Li, Z.R., Wang, J., Ye, L.S., ... & Yang, Z.N. (2015) Rubisco accumulation is important for the greening of the fln2-4 mutant in Arabidopsis. *Plant Science* 236, 185–194.
- Hughes, N.M., Neufeld, H.S. & Burkey, K.O. (2005) Functional role of anthocyanins in high-light winter leaves of the evergreen herb *Galax urceolata*. *New Phytologist* 168, 575–587.
- Hughes, N.M. & Smith, W.K. (2007) Attenuation of incident light in *Galax urceolata* (*Diapensiaceae*): concerted influence of adaxial and abaxial anthocyanic layers on photoprotection. *American Journal of Botany* 94, 784–790.
- Hüner, N.P., Bode, R., Dahal, K., Hollis, L., Rosso, D., Krol, M. & Ivanov, A. G. (2012) Chloroplast redox imbalance governs phenotypic plasticity: the “grand design of photosynthesis” revisited. *Frontiers in Plant Science*, 3, 1–12.
- Huster, D., Hjelle, O.P., Haug, F.M., Nagelhus, E.A., Reichelt, W. & Ottersen, O.P. (1998) Subcellular compartmentation of glutathione and glutathione precursors. A high resolution immunogold analysis of the outer retina of guinea pig. *Anatomy and Journal* 17, 124–126.
- Ibdah, M., Krins, A., Seidlitz, H.K., Heller, W., Strack, D. & Vogt, T. (2002) Spectral dependence of flavonol and betacyanin accumulation in *Mesembryanthemum crystallinum* under enhanced ultraviolet radiation. *Plant and Cell Environment* 25, 1145–1154.
- Ignacimuthu, S., Ayyanar, M. & Sankara Sivaraman, K. (2006) Ethnobotanical investigations among tribes in Madurai District of Tamil Nadu (India). *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine* 2, 25.
- Inomata, Y., Terahara, N., Kitajima, J., Kokubugata, G. & Iwashina, T. (2013) Flavones and anthocyanins from the leaves and flowers of Japanese *Ajuga* species (*Lamiaceae*). *Biochemical Systematics and Ecology* 51, 123–129.
- Ishikawa, T & Shigeoka, S. (2008) Recent advances in ascorbate biosynthesis and the physiological significance of ascorbate peroxidase in photosynthesizing organisms. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 72, 1143–1154.
- Jansen, M.A.K., Gaba, V. & Greenberg, B.M. (1998) Higher plants and UV-B radiation: balancing damage, repair and acclimation. *Trends in Plant Science* 3, 131–135.
- Jansen, M.A.K. & van den Noort, R.E. (2000) Ultraviolet-B radiation induces complex alterations in stomatal behaviour. *Physiologia Plantarum* 110, 189–194.
- Jansen, M.A.K., Hideg, É. & Lidon, F.J.C. (2012) UV-B radiation: “When does the stressor cause stress?” *Emirates Journal of Food and Agriculture* 24 (6).
- Jenkins, G.I., Long, J.C., Wade, H.K., Shenton, M.R. & Bibikova, T.N. (2001) UV and blue light signalling: pathways regulating chalcone synthase gene expression in Arabidopsis. *New Phytologist* 151, 121–131.

- Jenkins, G.I. (2009) Signal transduction in responses to UV-B Radiation. *Annual Review of Plant Biology* 60, 407–431.
- Jensen, R.A. (1986) The shikimate/arogenate pathway: link between carbohydrate metabolism and secondary metabolism. *Physiologia Plantarum* 66, 164–168.
- Jiao, Y., Lau, O.S. & Deng, X.W. (2007) Light-regulated transcriptional networks in higher plants. *Nature Reviews Genetics* 8, 217–230.
- Jiménez, A., Hernández, J.A., del Río, L.A. & Sevilla, F. (1997) Evidence for the presence of the ascorbate-glutathione cycle in mitochondria and peroxisomes of pea leaves. *Plant Physiology* 114, 275–284.
- Johansson, E., Olsson, O. & Nyström, T. (2004) Progression and specificity of protein oxidation in the life cycle of *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry* 279, 22204–22208.
- Kaiser, W.M. (1979) Reversible inhibition of the Calvin cycle and activation of oxidative pentose phosphate cycle in isolated intact chloroplasts by hydrogen peroxide. *Planta* 145, 377–382.
- Kakani, V.G., Reddy, K.R., Zhao, D. & Sailaja, K. (2003) Field crop responses to ultraviolet-B radiation: a review. *Agricultural and Forest Meteorology* 120, 191–218.
- Kalbin, G., Ohlsson, A.B., Berglund, T., Rydström, J. & Strid, Å. (1997) Ultraviolet-B-radiation-induced changes in nicotinamide and glutathione metabolism and gene expression in plants. *European Journal of Biochemistry* 249, 465–472.
- Kampfenkel, K., Van Montagu, K. & Inzé, D. (1995) Extraction and determination of ascorbate and dehydroascorbate from plant tissue. *Analytical Biochemistry* 225, 165–167.
- Kangasjärvi, S., Lepistö, A., Hännikäinen, K., Piippo, M., Luomala, E., Aro, E. & Rintamäki E. (2008) Diverse roles for chloroplast stromal and thylakoid bound ascorbate peroxidases in plant stress responses. *Biochemical Journal* 412, 275–285.
- Kanner, J., Mendel, H. & Budowski, P. (1977) Prooxidant and antioxidant effects of ascorbic acid and metal salts in a β -carotene-linoleate model system. *Journal of Food Science* 42, 60–64.
- Kärkönen, A. & Fry, S.C. (2006) Effect of ascorbate and its oxidation products on H_2O_2 production in cell-suspension cultures of *Picea abies* and in the absence of cells. *Journal of Experimental Botany* 57, 1633–1644.
- Karpinski, S., Escobar, C., Karpinska, B., Creissen, G., & Mullineaux, P.M. (1997) Photosynthetic electron transport regulates the expression of cytosolic ascorbate peroxidase genes in *Arabidopsis* during excess light stress. *Plant Cell* 9, 627–640.
- Kato, Y., Miura, E., Ido, K., Ifuku, K. & Sakamoto, W. (2009) The variegated mutants lacking chloroplastic FtsHs are defective in D1 degradation and accumulate reactive oxygen species. *Plant Physiology* 151, 1790–1801.
- Klem, K., Ač, A., Holub, P., Kováč, D., Špunda, V., Robson, T. M. & Urban, O. (2012) Interactive effects of PAR and UV radiation on the physiology, morphology and leaf optical properties of two barley varieties. *Environmental and Experimental Botany* 75, 52–64.
- Kopriva, S. & Rennenberg, H. (2004) Control of sulphate assimilation and glutathione synthesis: interaction with N and C metabolism. *Journal of Experimental Botany* 55: 1831–1842.
- Koprivova, A., Mugford, S. T. & Kopriva, S. (2010) *Arabidopsis* root growth dependence on glutathione is linked to auxin transport. *Plant Cell Reports* 29, 1157–1167.
- Kostina, E., Wulff, A. & Julkunen-Tiitto, R. (2001) Growth, structure, stomatal responses and secondary metabolites of birch seedlings (*Betula pendula*) under elevated UV-B radiation in the field. *Trees* 15, 483–491.
- Kowarik, I. & Säumel, I. (2007) Biological flora of Central Europe: *Ailanthus altissima* (Mill.) Swingle. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* 8, 207–237.
- Kropczynska, D., Czajkowska, B., Tomczyk, A. & Kielkiewicz, M. (2002) Mite communities on linden trees (*Tilia* sp.) in an urban environment. In: *Acarid Phylogeny and Evolution: Adaptation in Mites and Ticks*. (eds. Bernini, F., Nannelli, R., Nuzzaci, G. & de Lillo, E.), Kluwer academic publishers: Dordrecht. pp. 303–313.

- Kranner, I., Birtic, S., Anderson, K.M. & Pritchard, H.W. (2006) Glutathione half-cell reduction potential: A universal stress marker and modulator of programmed cell death. *Free Radical Biology and Medicine* 40, 2155–2165.
- Krieger-Liszkay, A. (2005) Singlet oxygen production in photosynthesis. *Journal of Experimental Botany* 56, 337–346.
- Krieger-Liszkay, A., Fufezan, C. & Trebst, A. (2008) Singlet oxygen production in PS II and related protection mechanism. *Photosynthesis Research* 98, 551–564.
- Kubo, A., Aono, M., Nakajima, N., Saji, H., Tanaka, K. & Kondo, N. (1999) Differential responses in activity of antioxidant enzymes to different environmental stresses in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Plant Research* 112, 279–290.
- Kukavica, B. & Veljović Jovanović, S. (2004) Senescence-related changes in the antioxidant status of ginkgo and birch leaves during autumn yellowing. *Physiologia Plantarum* 122, 321–327.
- Kukavica, B., Mojović, M., Vučinić, Ž., Maksimović, V., Takahama, U. & Veljović Jovanović, S. (2009) Generation of hydroxyl radical in isolated pea root cell wall, and the role of cell wall-bound peroxidase, Mn-SOD and phenolics in their production. *Plant and Cell Physiology* 50, 304–317.
- Kukavica, B., Veljović Jovanović, S., Menckhoff, L. & Lühje, S. (2012) Cell wall-bound cationic and anionic class III isoperoxidases of pea root: biochemical characterization and function in root growth. *Journal of Experimental Botany* 63, 4631–4645.
- Kundu, P. & Laskar, S. (2010) A brief resume on the genus *Ailanthus*: chemical and pharmacological aspects. *Phytochemistry Reviews* 9, 379–412.
- Labrouche, F., Clark, A.C., Prenzler, P.D. & Scollary, G.R. (2005) Isomeric influence on the oxidative coloration of phenolic compounds in a model white wine: Comparison of (+)-catechin and (–)-epicatechin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 9993–9998.
- Ladygin, V.G. (2004) Photosystem damage and spatial architecture of thylakoids in chloroplasts of pea chlorophyll mutants. *Biology Bulletin of the Russian Academy of Sciences* 31, 268–276.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.
- Laing, W.A., Stitt, M. & Heldt, H.W. (1981) Control of CO₂ fixation. Changes in the activity of ribulosephosphate kinase and fructose-and sedoheptulose-bisphosphatase in chloroplasts. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* 637, 348–359.
- Lake, J.A., Field, K.J., Davey, M.P., Beerling, D.J. & Lomax, B.H. (2009) Metabolomic and physiological responses reveal multi-phasic acclimation of *Arabidopsis thaliana* to chronic UV radiation. *Plant, Cell and Environment* 32, 1377–1389.
- Lalli, J.Y.Y. (2005) *In vitro* pharmacological properties and composition of leaf essential oils and extracts of selected indigenous pelargonium (geraniaceae) species. Doctoral dissertation, Faculty of Health Sciences, University of the Witwatersrand, Johannesburg, South Africa.
- Lamb, C. & Dixon, R.A. (1997) The oxidative burst in plant disease resistance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 48, 251–275.
- Laposi, R., Veres, S. & Meszaros, I. (2008) Ecophysiological investigation of UV-B tolerance of beech saplings (*Fagus sylvatica* L.). *Acta Silvatica and Lingaria Hungarica* 4, 7–16.
- Lattanzio, V., Lattanzio, V.M. & Cardinali, A. (2006) Role of phenolics in the resistance mechanisms of plants against fungal pathogens and insects. In: *Phytochemistry: Advances in research*, (ed. Imperato, F.), Research Signpost, Trivandrum, Kerala, India. pp. 23–67.
- Latté, K.P. & Kolodziej, H. (2000) Pelargoniins, new ellagitannins from *Pelargonium reniforme*. *Phytochemistry* 54, 701–708.
- Latte, K.P. & Kolodziej, H. (2004) Antioxidant properties of phenolic compounds from *Pelargonium reniforme*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52, 4899–4902.
- Lee, Y.P., Kim, S.H., Bang, J.W., Lee, H.S., Kwak, S.S. & Kwon, S.Y. (2007) Enhanced tolerance to oxidative stress in transgenic tobacco plants expressing three antioxidant enzymes in chloroplasts. *Plant Cell Reports* 26, 591–598.

- Leferink, N.G., van Duijn, E., Barendregt, A., Heck, A. J. & van Berkel, W.J. (2009) Galactonolactone dehydrogenase requires a redox-sensitive thiol for optimal production of vitamin C. *Plant Physiology* 150, 596–605.
- León J., Rojo E. & Sánchez-Serrano J. (2001) Wound signalling in plants. *Journal of Experimental Botany* 52, 1–9.
- Leonardis, S.D., Dipierro, N. & Dipierro, S. (2000) Purification and characterization of an ascorbate peroxidase from potato tuber mitochondria. *Plant Physiology and Biochemistry* 38, 773–779.
- Lewis, N.G. & Yamamoto, E. (1990) Lignin: occurrence, biogenesis and biodegradation. *Annual Review of Plant Biology* 41, 455–496.
- Lichtenthaler, H.K., Kuhn, G., Prenzel, U., Buschmann, C. & Meier, D. (1982) Adaptation of chloroplast-ultrastructure and of chlorophyll-protein levels to high-light and low-light growth conditions. *Zeitschrift für Naturforschung C* 37, 464–475.
- Lichtenthaler, H.K. (2007) Biosynthesis, accumulation and emission of carotenoids, alpha-tocopherol, plastoquinone, and isoprene in leaves under high photosynthetic irradiance. *Photosynthesis Research* 92, 163–179.
- Lidon, F.J.C., Reboredo, F.H., Leitã, A.E., Silva, M.M.A., Duarte, P. & Ramalho, J.C. (2012) Impact of UV-B radiation on photosynthesis – an overview. *Emirates Journal of Food and Agriculture* 24, 546–556.
- Lis-Balchin M. (2003) Essential oils from different *Pelargonium* species and cultivars; their chemical composition (using GC, GC/MS) and appearance of trichomes (under EM). In: *Geranium and pelargonium: history of nomenclature, usage and cultivation* (ed. Lis-Balchin M.), CRC Press, Boca Raton, USA. pp. 147–165.
- Lis-Balchin, M. (2003) History of nomenclature, usage and cultivation of *Geranium* and *Pelargonium* species. In: *Geranium and Pelargonium: History of Nomenclature, Usage and Cultivation*(ed. Lis-Balchin M.), CRC Press, Boca Raton, USA. pp. 5–10.
- Liszkay, A., Kenk, B. & Schopfer, P. (2003) Evidence for involvement of cell wall peroxidase in the generation of hydroxyl radicals mediating extension growth. *Planta* 217, 658–667.
- Majer, P. & Hideg, É. (2012) Existing antioxidant levels are more important in acclimation to supplemental UV-B irradiation than inducible ones: studies with high light pretreated tobacco leaves. *Emirates Journal of Food and Agriculture* 24, 598–606.
- Majer, P., Neugart, S., Krumbein, A., Schreiner, M., & Hideg, É. (2014). Singlet oxygen scavenging by leaf flavonoids contributes to sunlight acclimation in *Tilia platyphyllos*. *Environmental and Experimental Botany* 100, 1–9.
- Marais, J.P.J., Deavours, B., Dixon, R.A. & Ferreira, D. (2006) Chapter 1: The stereochemistry of flavonoids. In: *The science of flavonoids* (ed. Grotewold E.), Springer Science, New York, USA. pp. 1–46.
- Marcotrigiano, M. & Bernatzky, R. (1995) Arrangement of cell layers in the shoot apical meristems of periclinal chimeras influences cell fate. *The Plant Journal* 7, 193–202.
- Marcotrigiano, M. (1997) Chimeras and variegation: patterns of deceit. *HortScience* 32, 773–784.
- Marwah, R.G., Fatope, M.O., Deadman, M.L., Ochei, J.E. & Al-Saidi, S.H. (2007) Antimicrobial activity and the major components of the essential oil of *Plectranthus cylindraceus*. *Journal of Applied Microbiology* 103, 1220–1226.
- Masi, A., Ghisi, R. & Ferretti, M. (2002) Measuring low-molecular-weight thiols by detecting the fluorescence of their SBD-derivatives: application to studies of diurnal and UV-B induced changes in *Zea mays* L. *Journal of Plant Physiology* 159, 499–507.
- Masi, A., Destro, T., Turetta, L., Varotto, S., Caporale, G. & Ferretti, M. (2007) Localization of gamma-glutamyl transferase activity and protein in *Zea mays* organs and tissues. *Journal of Plant Physiology* 164, 1527–1535.
- Maxwell, K. & Johnson, G.N. (2000) Chlorophyll fluorescence-a practical guide. *Journal of Experimental Botany* 51, 659–668.

- McCord, J.M. & Fridovich, I. (1969) Superoxide dismutase an enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). *Journal of Biological Chemistry* 244, 6049–6055.
- McDonald, A.E., Ivanov, A.G., Bode, R., Maxwell, D.P., Rodermel, S.R. & Hüner, N.P. (2011). Flexibility in photosynthetic electron transport: the physiological role of plastoquinol terminal oxidase (PTOX). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* 1807, 954–967.
- Merken, H.M. & Beecher, G.R. (2000) Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: a review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 4, 8577–599.
- Meyer, A.J. & Hell, R. (2005) Glutathione homeostasis and redox-regulation by sulfhydryl groups. *Photosynthesis Research* 86, 435–457.
- Mhamdi, A., Hager, J., Chaouch, S., Queval, G., Han, Y., Taconnat, L., ... & Noctor, G. (2010a) Arabidopsis GLUTATHIONE REDUCTASE1 plays a crucial role in leaf responses to intracellular hydrogen peroxide and in ensuring appropriate gene expression through both salicylic acid and jasmonic acid signaling pathways. *Plant Physiology* 153, 1144–1160.
- Mhamdi, A., Queval, G., Chaouch, S., Vanderauwera, S., Van Breusegem, F. & Noctor, G. (2010b) Catalase function in plants: a focus on Arabidopsis mutants as stress-mimic models. *Journal of Experimental Botany* 61, 4197–4220.
- Michalak, A. (2006) Phenolic compounds and their antioxidant activity in plants growing under heavy metal stress. *Polish Journal of Environmental Studies* 15, 523–530.
- Millar, A.H., Mittova, V., Kiddle, G., Heazlewood, J.L., Bartoli, C.G., Theodoulou, F.L. & Foyer, C.H. (2003) Control of ascorbate synthesis by respiration and its implications for stress responses. *Plant Physiology* 133, 443–447.
- Miller, G., Suzuki, N., Rizhsky, L., Hegie, A., Koussevitzky, S. & Mittler, R. (2007) Double mutants deficient in cytosolic and thylakoid ascorbate peroxidase reveal a complex mode of interaction between reactive oxygen species, plant development, and response to abiotic stresses. *Plant Physiology* 144, 1777–1785.
- Miller G., Schlauch K., Tam R., Cortes D., Torres M.A., Shulaev V., Dangl J.L. & Mittler R. (2009) The plant NADPH oxidase RBOHD mediates rapid systemic signaling in response to diverse stimuli. *Science Signaling* 2, ra45.
- Ming-Yin, L. (2005) Anatomical, cytological and histological investigation of somatic variability of the muted clone of *Pelargonium zonale* 'Kleiner Liebling'. Doctoral dissertation, Humboldt University of Berlin, Germany.
- Mitra, S.P. (2014) UV-Vis spectrophotometry plus HPLC to measure the level of catechin/polyphenolics and to understand its oxidized conditions in commercially available green and black teas. *Indian Journal of Chemistry Section B-Organic Chemistry Including Medicinal Chemistry* 53, 1255–1262.
- Mittler, R. & Zilinskas, B.A. (1991)a Purification and characterization of pea cytosolic ascorbate peroxidase. *Plant Physiology* 97, 962–968.
- Mittler, R. & Zilinskas, B.A. (1991)b Molecular cloning and nucleotide sequence analysis of a cDNA encoding pea cytosolic ascorbate peroxidase. *FEBS Letters* 289, 257–259.
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M. & Van Breusegem, F. (2004) Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in Plant Science* 9, 490–498.
- Miura, E., Kato, Y., Matsushima, R., Albrecht, V., Laalami, S. & Sakamoto, W. (2007) The balance between protein synthesis and degradation in chloroplasts determines leaf variegation in *Arabidopsis yellow variegated* mutants. *Plant Cell* 19, 1313–1328.
- Miura, E., Kato, Y. & Sakamoto, W. (2010) Comparative transcriptome analysis of green/white variegated sectors in *Arabidopsis yellow variegated2*: responses to oxidative and other stresses in white sectors. *Journal of Experimental Botany* 61, 2433–2445.
- Miyake, C. & Asada, K. (1992) Thylakoid-bound ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts and photoreduction of its primary oxidation product monodehydroascorbate radicals in thylakoids. *Plant and Cell Physiology* 33, 541–553.

- Miyake C., Cao W.H. & Asada, K. (1993) Purification and molecular properties of thylakoid-bound ascorbate peroxidase from spinach chloroplasts. *Plant and Cell Physiology* 34, 881–889.
- Miyake, C. & Asada, K. (1996) Inactivation mechanism of ascorbate peroxidase at low concentrations of ascorbate; hydrogen peroxide decomposes compound I of ascorbate peroxidase. *Plant and Cell Physiology* 37, 423–430.
- Møller, I.M. (2001) Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 52, 561–591.
- 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 Physiologiae Plantarum* 36, 2059–2066.
- Morales, L.O., Tegelberg R., Brosché, M., Keinänen, M., Lindfors, A. & Aphalo, P.J. (2010) Effects of solar UV-A and UV-B radiation on gene expression and phenolic accumulation in *Betula pendula* leaves. *Tree Physiology* 30, 923–934.
- Morina, F., Jovanović, Lj., Mojović, M., Vidović, M., Panković, D., Veljović Jovanović, S. (2010) Zinc-induced oxidative stress in *Verbascum thapsus* is caused by an accumulation of reactive oxygen species and quinhydrone in the cell wall. *Physiologia Plantarum* 140, 209–224.
- Morina, F., Jovanović, Lj., Vidović, M., Sužnjević, D., Tripković, D., Milić, S., Srećković, T. & Veljović Jovanović, S. (2013). Antioxidative status and acclimation capacity of bamboo-potential use for air quality improvement in urban areas. *Fresenius Environmental Bulletin* 22, 1763–1769.
- Mruk, D.D. & Cheng, C.Y. (2011) Enhanced chemiluminescence (ECL) for routine immunoblotting: An inexpensive alternative to commercially available kits. *Spermatogenesis* 1, 121–122.
- Müller, M., Zechmann, B. & Zellnig, G. (2004) Ultrastructural localization of glutathione in *Cucurbita pepo* plants. *Protoplasma* 223, 213–219.
- Müller, V., Albert, A., Winkler, J.B., Lankes, C., Noga, G. & Hunsche, M. (2013) Ecologically relevant UV-B dose combined with high PAR intensity distinctly affect plant growth and accumulation of secondary metabolites in leaves of *Centella asiatica* L. Urban. *Journal of Photochemistry and Photobiology B* 127, 161–169.
- Mullineaux, P. & Karpinski, S. (2002) Signal transduction in response to excess light: getting out of the chloroplast. *Current Opinion in Plant Biology* 5, 43–48.
- Munné-Bosch, S., Queval, G. & Foyer, C. H. (2013) The impact of global change factors on redox signaling underpinning stress tolerance. *Plant Physiology* 161, 5–19.
- Murgia, I., Tarantino, D., Vannini, C., Bracale, M., Carravieri, S. & Soave, C. (2004) *Arabidopsis thaliana* plants overexpressing thylakoidal ascorbate peroxidase show increased resistance to paraquat-induced photooxidative stress and to nitric oxide-induced cell death. *The Plant Journal* 38, 940–953.
- Murphy, M. (2009) How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochemical Journal* 417, 1–13.
- Nagy, N.E., Fossdal, C.G., Krokene, P., Krekling, T., Lönneborg, A. & Solheim, H. (2004) Induced responses to pathogen infection in Norway spruce phloem: changes in polyphenolic parenchyma cells, chalcone synthase transcript levels and peroxidase activity. *Tree Physiology* 24: 505–515.
- Nakano, Y. & Asada, K. (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant and Cell Physiology* 22, 867–880.
- Nakano, Y. & Asada, K. (1987) Purification of ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts; its inactivation in ascorbate-depleted medium and reactivation by monodehydroascorbate radical. *Plant and Cell Physiology* 28, 131–140.
- Neill, S., Desikan, R. & Hancock, J. (2002) Hydrogen peroxide signaling. *Current Opinion in Plant Biology* 5, 388–395.

- Neill, S.O. (2002) The functional role of anthocyanins in leaves. Doctoral Dissertation, School of Biological Sciences, University of Auckland, New Zealand.
- Neill, S.O., Gould, K.S., Kilmartin, P.A., Mitchell, K.A. & Markham, K.R. (2002) Antioxidant activity of red versus green leaves in *Elatostema rugosum*. *Plant, Cell and Environment* 25, 539–547.
- Neill, S.O. & Gould, K.S. (2003) Anthocyanins in leaves: light attenuators or antioxidants? *Functional Plant Biology* 30, 865–873.
- Nelson, D.L. & Cox, M.M. (2005) Photosynthesis: harvesting light energy. In: *Lehninger principles of biochemistry*, 4th ed. (eds. Nelson, D.L. & Cox M.M.), W.H. Freeman & Co., New York, USA. pp. 723–750.
- Nešković, M., Konjević, R., Čulafić, L. & Ivašković, S. (2003) *Fiziologija biljaka*. NNK International, Beograd, Srbija.
- Niewiadomska, E., Miszalski, Z. & Pilipowicz, M. (1997) The presence of FeSOD in the *Aceraceae* family. *PHYTON-HORN* 37, 215–218.
- Niyogi, K.K. (2000) Safety valves for photosynthesis. *Current Opinion in Plant Biology* 3, 455–460.
- Nobel, P.S. (2005) Photochemistry of photosynthesis. In: *Physicochemical and environmental plant physiology*, 3rd ed. (ed. Nobel, P.S.), Academic Press, Burlington, USA. pp. 219–266.
- Noctor, G. & Foyer, C.H. (1998a) Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annual Review of Plant Biology* 49, 249–279.
- Noctor, G. & Foyer, C.H. (1998b) Simultaneous measurement of foliar glutathione, γ -glutamylcysteine and amino acids by high-performance liquid chromatography: comparison with two other assay methods for glutathione. *Analytical Biochemistry* 264, 98–110.
- Noctor, G., Veljović Jovanović, S., Driscoll, S., Novitskaya, L. & Foyer, C.H. (2002a) Drought and oxidative load in the leaves of C3 plants: a predominant role for photorespiration? *Annals of Botany* 89, 841–850.
- Noctor, G., Gomez, L., Vanacker, H. & Foyer, C.H. (2002b) Interactions between biosynthesis, compartmentation and transport in the control of glutathione homeostasis and signalling. *Journal of Experimental Botany* 53, 1283–1304.
- Noctor, G. (2006) Metabolic signalling in defence and stress: the central roles of soluble redox couples. *Plant and Cell Environment* 29, 409–425.
- Noctor, G., Queval, G., Mhamdi, A., Chaouch, S. & Foyer, C.H. (2011) Glutathione. In: *The Arabidopsis book* (ed. Millar, H.), American Society of Plant Biologists. Rockville, USA. pp. 1–32.
- Nogues, S., Allen, D.J., Morison, J.I. & Baker, N.R. (1998) Ultraviolet-B radiation effects on water relations, leaf development, and photosynthesis in droughted pea plants. *Plant Physiology* 117, 173–181.
- Nogues, S., Allen, D.J., Morison, J.I. & Baker, N.R. (1999) Characterization of stomatal closure caused by ultraviolet-B radiation. *Plant Physiology* 121, 489–496.
- Nuutila, A.M., Kammiovirta, K. & Oksman-Caldentey, K.M. (2002) Comparison of methods for the hydrolysis of flavonoids and phenolic acids from onion and spinach for HPLC analysis. *Food Chemistry* 76, 519–525.
- Nyström, T. (2005) Role of oxidative carbonylation in protein quality control and senescence. *The EMBO journal* 24, 1311–1317.
- Oberhuber, W. & Edwards, C.E. (1993) Temperature dependence of the linkage of quantum yield of photosystem II to CO₂ Fixation in C₄ and C₃ Plants. *Plant Physiology* 101, 507–512.
- Ogawa, K., Kanematsu, S., Takabe, K. & Asada, K. (1995) Attachment of CuZn-superoxide dismutase to thylakoid membranes at the site of superoxide generation (PS I) in spinach chloroplasts: detection by immunogold labeling after rapid freezing and substitution method. *Plant and Cell Physiology* 36, 565–573.

- Oidaira, H., Sano, S., Koshihara, T. & Ushimaru, T. (2000) Enhancement of antioxidative enzyme activities in chilled rice seedlings. *Journal of Plant Physiology* 156, 811–813.
- Ort, D.R. (2001) When there is too much light. *Plant Physiology* 125, 29–32.
- Page, M., Sultana, N., Paszkiewicz, K., Florance, H. & Smirnoff, N. (2012) The influence of ascorbate on anthocyanin accumulation during high light acclimation in *Arabidopsis thaliana*: further evidence for redox control of anthocyanin synthesis. *Plant, Cell and Environment* 35, 388–404.
- Paul, M.J., Primavesi, L.F., Jhurrea, D. & Zhang, Y. (2008) Trehalose metabolism and signaling. *Annual Review of Plant Biology* 59, 417–441.
- Paul, N.D., Moore, J.P., McPherson, M., Lambourne, C., Croft, P., Heaton, J.C. & Wargent, J.J. (2012) Ecological responses to UV radiation: interactions between the biological effects of UV on plants and on associated organisms. *Physiologia Plantarum* 145, 565–581.
- Pavlović, A.V., Dabić, D.C., Momirović, N.M., Dojčinović, B.P., Milojković-Opsenica, D.M., Tešić, Z.L. & Natić, M.M. (2013) Chemical composition of two different extracts of berries harvested in Serbia. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61, 4188–4194.
- Peltzer, D., Dreyer, E. & Polle, A. (2002) Differential temperature dependencies of antioxidative enzymes in two contrasting species: *Fagus sylvatica* and *Coleus blumei*. *Plant Physiology and Biochemistry* 40, 141–150.
- Pereira, D.M., Valentão, P., Pereira J.A. & Andrade P.B. (2009) Phenolics: from chemistry to biology. *Molecules* 14, 2202–2211.
- Petrussa, E., Braidot, E., Zancani, M., Peresson, C., Bertolini, A., Patui, S. & Vianello, A. (2013) Plant flavonoids-biosynthesis, transport and involvement in stress responses. *International Journal of Molecular Sciences* 14, 14950–14973.
- Phippen, W.B. & Simon, J.E. (1998) Anthocyanins in basil (*Ocimum basilicum* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46, 1734–1738.
- Pignocchi, C., Fletcher, J.M., Wilkinson, J.E., Barnes, J.D. & Foyer C.H. (2003) The function of ascorbate oxidase in tobacco. *Plant Physiology* 132, 1631–1641.
- Piñas Fernández, A. & Strand, Å. (2008) Retrograde signaling and plant stress: plastid signals initiate cellular stress responses. *Current Opinion in Plant Biology* 11, 509–513.
- Poethig, S. (1989) Genetic mosaics and cell lineage in plants. *Trends in Genetics* 5, 273–277.
- Pogson, B.J., Woo, N.S., Forster, B. & Small, I.D. (2008) Plastid signalling to the nucleus and beyond. *Trends in Plant Sciences* 13, 602–609.
- Pollastri, S. & Tattini, M. (2011) Flavonols: old compounds for old roles. *Annals of Botany* 108, 1225–1233.
- Polle, A., Chakrabarti, K., Schurmann, W. & Rennenberg, H. (1990) Composition and properties of hydrogen peroxide decomposing systems in extracellular and total extracts from needles of Norway spruce (*Picea abies* L., Karst.). *Plant Physiology* 94, 312–319.
- Polle A., Kröniger W. & Rennenberg H. (1996) Seasonal fluctuations of ascorbate-related enzymes: acute and delayed effects of late frost in spring on antioxidative systems in needles of Norway spruce (*Picea abies* L.). *Plant and Cell Physiology* 37, 717–725.
- Polle, A. (2001) Dissecting the superoxide dismutase-ascorbate-glutathione pathway in chloroplasts by metabolic modeling: computer simulation as a step towards flux analysis. *Plant Physiology* 126, 445–462.
- Porfírio, S., Falé, P.L., Madeira, P.J.A., Florêncio, M.H., Ascensão, L. & Serralheiro, M. L.M. (2010) Antiacetylcholinesterase and antioxidant activities of *Plectranthus barbatus* tea, after in vitro gastrointestinal metabolism. *Food Chemistry* 122, 179–187.
- Procházková, D., Boušová, I. & Wilhelmová, N. (2011) Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia* 82:513–523.
- Qu, C.P., Xu, Z.R., Liu, G.J., Liu, C., Li, Y., Wei, Z.G. & Liu, G.F. (2010) Differential expression of copper-zinc superoxide dismutase gene of *Polygonum sibiricum* leaves, stems and

- underground stems, subjected to high-salt stress. *International Journal of Molecular Sciences* 11, 5234–5245.
- Queval, G. & Noctor, G. (2007) A plate-reader method for the measurement of NAD, NADP, glutathione and ascorbate in tissue extracts. Application to redox profiling during *Arabidopsis* rosette development. *Analytical Biochemistry* 363, 58–69.
- Queval, G., Hager, J., Gakière, B. & Noctor, G. (2008) Why are literature data for H₂O₂ contents so variable? A discussion of potential difficulties in the quantitative assay of leaf extracts. *Journal of Experimental Botany* 59, 135–146.
- Queval, G., Jaillard, D., Zechmann, B. & Noctor, G. (2011) Increased intracellular H₂O₂ availability preferentially drives glutathione accumulation in vacuoles and chloroplasts. *Plant and Cell Environment* 34, 21–32.
- Raghavendra, M.P., Kumar, P.R. & Prakash, V. (2007) Mechanism of inhibition of rice bran lipase by polyphenols: a case study with chlorogenic acid and caffeic acid. *Journal of Food Science* 72, E412–E419.
- Ramon, M., Rolland, F., Thevelein, J.M., Van Dijck, P., Leyman & B. (2007) ABI4 mediates the effects of exogenous trehalose on *Arabidopsis* growth and starch breakdown. *Plant Molecular Biology* 63, 195–206.
- Ranjbarfordoei, A., Samson, R. & Van Damme, P. (2011) Photosynthesis performance in sweet almond [*Prunus dulcis* (Mill) D.Webb] exposed to supplemental UV-B radiation. *Photosynthetica* 49, 107–111.
- Raven, E.L. (2003) Understanding functional diversity and substrate specificity in haem peroxidases: what can we learn from ascorbate peroxidase? *Natural Product Reports* 20, 367–381.
- Reuber, S., Bornman, J.F. & Weissenböck, G. (1996) Phenylpropanoid compounds in primary leaf tissues of rye (*Secale cereale*). Light response of their metabolism and the possible role in UV-B protection. *Physiologia Plantarum* 97, 160–168.
- Revilla, E., Ryan, J. M. & Martín-Ortega, G. (1998) Comparison of several procedures used for the extraction of anthocyanins from red grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46, 4592–4597.
- Rice-Evans, C.A., Miller, N.J. & Papanga, G. (1996) Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine* 20, 933–956.
- Rice-Evans, C.A., Miller, N.J. & Papanga, G. (1997) Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science* 2, 152–159.
- Richard-Forget, F.C. & Gauillard, F.A. (1997) Oxidation of chlorogenic acid, catechins, and 4-methylcatechol in model solutions by combinations of pear (*Pyrus communis* cv. Williams) polyphenol oxidase and peroxidase: a possible involvement of peroxidase in enzymatic browning. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45, 2472–2476.
- Rizzini, L., Favory, J.J., Cloix, C., Faggionato, D., O'Hara, A., Kaiserli, E., ... & Ulm, R. (2011) Perception of UV-B by the *Arabidopsis* UVR8 protein. *Science* 332, 103–106.
- Rockholm, D. C. & Yamamoto, H. Y. (1996) Violaxanthin de-epoxidase (purification of a 43-kilodalton luminal protein from lettuce by lipid-affinity precipitation with monogalactosyl diacylglyceride). *Plant Physiology* 110, 697–703.
- Rodermel S.R. (2001) Pathways of plastid-to-nucleus signaling. *Trends in Plant Science* 6, 471–478.
- Rojas, L.B., Cordero de Rojas, Y., Carmona Arzola, J. & Usubillaga, A. (2012) Componentes volátiles de *Plectranthus coleoides* Benth. (*Lamiaceae*). Volatile components of *Plectranthus coleoides* Benth. (*Lamiaceae*). *Revista Da Faculdade De Farmacia* 54, 17–20.
- Romero, D., Rivera, M.E., Cazorla, F.M., Codina, J. C., Fernández-Ortuño, D., Torés, J. A., ... & de Vicente, A. (2008) Comparative histochemical analyses of oxidative burst and cell wall reinforcement in compatible and incompatible melon–powdery mildew (*Podosphaera fusca*) interactions. *Journal of Plant Physiology* 165, 1895–1905.
- Rosso, D., Ivanov, A.G., Fu, A., Geisler-Lee, J., Hendrickson, L., Geisler, M., Stewart, G., Krol, M., Hurry, V., Rodermel, S.R., ... & Hüner N.P.A (2006) IMMUTANS does not act as a safety

- valve in the protection of the photosynthetic apparatus of *Arabidopsis* during steady-state photosynthesis. *Plant Physiology* 142, 574–585.
- Rubio-Piña, J.A. & Zapata-Pérez, O. (2011) Isolation of total RNA from tissues rich in polyphenols and polysaccharides of mangrove plants. *Electronic Journal of Biotechnology* 14, <http://dx.doi.org/10.2225/vol14-issue5-fulltext-10>
- Ruhland, C.T., Xiong, F.S., Clark, W. D. & Day, T.A. (2005) The influence of ultraviolet radiation on growth, hydroxycinnamic acids and flavonoids of *Deschampsia antarctica* during springtime ozone depletion in Antarctica. *Photochemistry and Photobiology* 81, 1086–1093.
- Rumeau, D., Peltier, G. & Cournac, L. (2007) Chlororespiration and cyclic electron flow around PSI during photosynthesis and plant stress response. *Plant, Cell and Environment* 30, 1041–1051.
- Said, A., Tundis, R., Hawas, U.W., El-Kousy, S.M., Rashed, K., Menichini, F., Bonesi, M., Huefner, A., Loizzo, M.R. & Menichini, F. (2010) In vitro antioxidant and antiproliferative activities of flavonoids from *Ailanthus excelsa* (Roxb.) (Simaroubaceae) leaves. *Zeitschrift für Naturforschung C* 65, 180–186.
- Sakakibara, H., Honda, Y., Nakagawa, S., Ashida, H. & Kanazawa, K. (2003) Simultaneous determination of all polyphenols in vegetables, fruits and teas. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51, 571–581.
- Sakamoto, W., Uno, Y., Zhang, Q., Miura, E., & Kato, Y. (2009) Arrested differentiation of proplastids into chloroplasts in variegated leaves characterized by plastid ultrastructure and nucleoid morphology. *Plant and Cell Physiology* 50, 2069–2083.
- Sakihama, Y., Mano, J. I., Sano, S., Asada, K. & Yamasaki, H. (2000) Reduction of phenoxyl radicals mediated by monodehydroascorbate reductase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 279, 949–954.
- Sanmartin, M., Drogoudi, P.D., Lyons, T., Pateraki, I, Barnes, J. & Kanellis, A.K. (2003) Over-expression of ascorbate oxidase in the apoplast of transgenic tobacco results in altered ascorbate and glutathione redox states and increased sensitivity to ozone. *Planta* 216, 918–928.
- Santos, I., Fidalgo, F., Almeida, J.M. & Salema, R. (2004) Biochemical and ultrastructural changes in leaves of potato plants grown under supplementary UV-B radiation. *Plant Science* 167, 925–935.
- Saraswathi, J., Venkatesh, K., Baburao, N., Hilal, M. H. & Rani, A.R. (2011) Phytopharmacological importance of Pelargonium species. *Journal of Medicinal Plants Research* 5, 2587–2598.
- Sarijeva, G., Knapp, M. & Lichtenthaler, H.K. (2007) Differences in photosynthetic activity, chlorophyll and carotenoid levels, and in chlorophyll fluorescence parameters in green sun and shade leaves of *Ginkgo* and *Fagus*. *Journal of Plant Physiology* 164, 950–955.
- SAS Institute, Inc. (2003) SAS/STAT User's Guide, Version 6., 4th edn. SAS Institute, Inc. Cary, NC, USA.
- Saslowsky, D. & Winkel-Shirley, B. (2001) Localization of flavonoid enzymes in *Arabidopsis* roots. *The Plant Journal* 27, 37–48.
- Saslowsky, D., Warek, U. & Winkel, B.S.J. (2005) Nuclear localization of flavonoid metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry* 280, 23735–23740.
- Scandalios, J.G., Guan, L. & Polidoros, A.N. (1997) Catalases in plants: gene structure, properties, regulation, and expression. In: *Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses* (ed. Scandalios, J.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA. pp. 343–406.
- Scarpeci, T.E., Zanor, M.I., Carrillo, N., Mueller-Roeber, B. & Valle, E.M. (2008) Generation of superoxide anion in chloroplasts of *Arabidopsis thaliana* during active photosynthesis: a focus on rapidly induced genes. *Plant Molecular Biology* 66, 361–378.
- Schertl, P., Sunderhaus, S., Klodmann, J., Grozeff, G.E.G., Bartoli, C.G. & Braun, H.P. (2012) L-galactono-1, 4-lactone dehydrogenase (GLDH) forms part of three subcomplexes of

- mitochondrial complex I in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry* 287, 14412–14419.
- Searles, P.S., Flint, S.D. & Caldwell, M.M. (2001) A meta-analysis of plant field studies simulating stratospheric ozone depletion. *Oecologia* 127, 1–10.
- Sears, B.B. (1980) Elimination of plastids during spermatogenesis and fertilization in the plant kingdom. *Plasmid* 4, 233–255.
- Shan, B., Cai, Y.Z., Sun, M. & Corke, H. (2005) Antioxidant capacity of 26 spice extracts and characterization of their phenolic constituents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 7749–7759.
- Sheue, C.R., Pao, S.H., Chien, L.F., Chesson, P. & Peng, C.I. (2012) Natural foliar variegation without costs? The case of *Begonia*. *Annals of Botany* 109, 1065–1074.
- Shigeoka, S., Ishikawa, T., Tamoi, M., Miyagawa, Y., Takeda, T., Yabuta, Y. & Yoshimura, K. (2002) Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. *Journal of Experimental Botany* 53, 1305–1319.
- Simpson, M.G. (2006) Evolution and diversity of vascular plants. In: *Plant systematics* (ed. Simpson, M.G.) Elsevier Academic Press, Burlington, USA. pp. 69–96.
- Smeeckens, S., Ma, J., Hanson, J. & Rolland, F. (2010) Sugar signals and molecular networks controlling plant growth. *Current Opinion in Plant Biology* 13, 274–279.
- Smirnoff, N. (2000) Ascorbic acid: metabolism and functions of a multifaceted molecule. *Current Opinion in Plant Biology* 3, 229–235.
- Smirnoff, N. (2008) Ascorbate, tocopherol and carotenoids. In: *Antioxidants and reactive oxygen species in plants* (ed. Smirnoff, N.), John Wiley & Sons Inc., USA. pp. 53–86.
- Söderdahl, T., Enoksson, M., Lundberg, M., Holmgren, A., Ottersen, O.P., Orrenius, S., Bolcsfoldi, G., Cotgreave, I.A. (2003) Visualization of the compartmentalization of glutathione and protein-glutathione mixed disulfides in cultured cells. *FASEB Embryology* 198, 277–287.
- Soldatini, G.F., Nali, C., Guidi, L. & Lorenzini, G. (1998) Photosynthesis of *Hedera canariensis* var. *azorica* variegated leaves as affected by ozone. *Photosynthetica* 35, 247–253.
- Springob, K., Nakajima, J. I., Yamazaki, M. & Saito, K. (2003) Recent advances in the biosynthesis and accumulation of anthocyanins. *Natural product reports* 20, 288–303.
- Stadtman, E.R., & Levine, R.L. (2003) Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino Acids* 25, 207–218.
- Staehelein, L.A. (1986) Chloroplast structure and supermolecular organization of photosynthetic membranes. In: *Photosynthesis III Encyclopedia of Plant Physiology New Series Vol. 19* (eds. Staehelein, L.A. & Arntzen, C.J.), Springer-Verlag, Berlin, Germany. pp. 1–84.
- Staehelein, L.A. (2003) Chloroplast structure: from chlorophyll granules to supra-molecular architecture of thylakoid membranes. *Photosynthesis Research* 76, 185–196.
- Stagnari, F., Di Bitetto, V. & Pisante, M. (2007) Effects of N fertilizers and rates on yield, safety and nutrients in processing spinach genotypes. *Scientia Horticulturae* 114, 225–233.
- Stahl, Y. & Simon, R. (2013) Gated communities: apoplastic and symplastic signals converge at plasmodesmata to control cell fates. *Journal of Experimental Botany* 64, 5237–5241.
- Stalikas, C.D. (2007) Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *Journal of Separation Science* 30, 3268–3295.
- Standfuss, J., Terwisscha van Scheltinga, A.C., Lamborghini, M. & Kühlbrandt, W. (2005) Mechanisms of photoprotection and nonphotochemical quenching in pea light-harvesting complex at 2.5 Å resolution. *The EMBO journal* 24, 919–928.
- Stitt, M. & Zeeman, S.C. (2012) Starch turnover: pathways, regulation and role in growth. *Current Opinion in Plant Biology* 15, 282–292.
- Stonebloom, S., Brunkard, J.O., Cheung, A.C., Jiang, K., Feldman, L. & Zambryski, P. (2012) Redox states of plastids and mitochondria differentially regulate intercellular transport via plasmodesmata. *Plant Physiology* 158, 190–199.

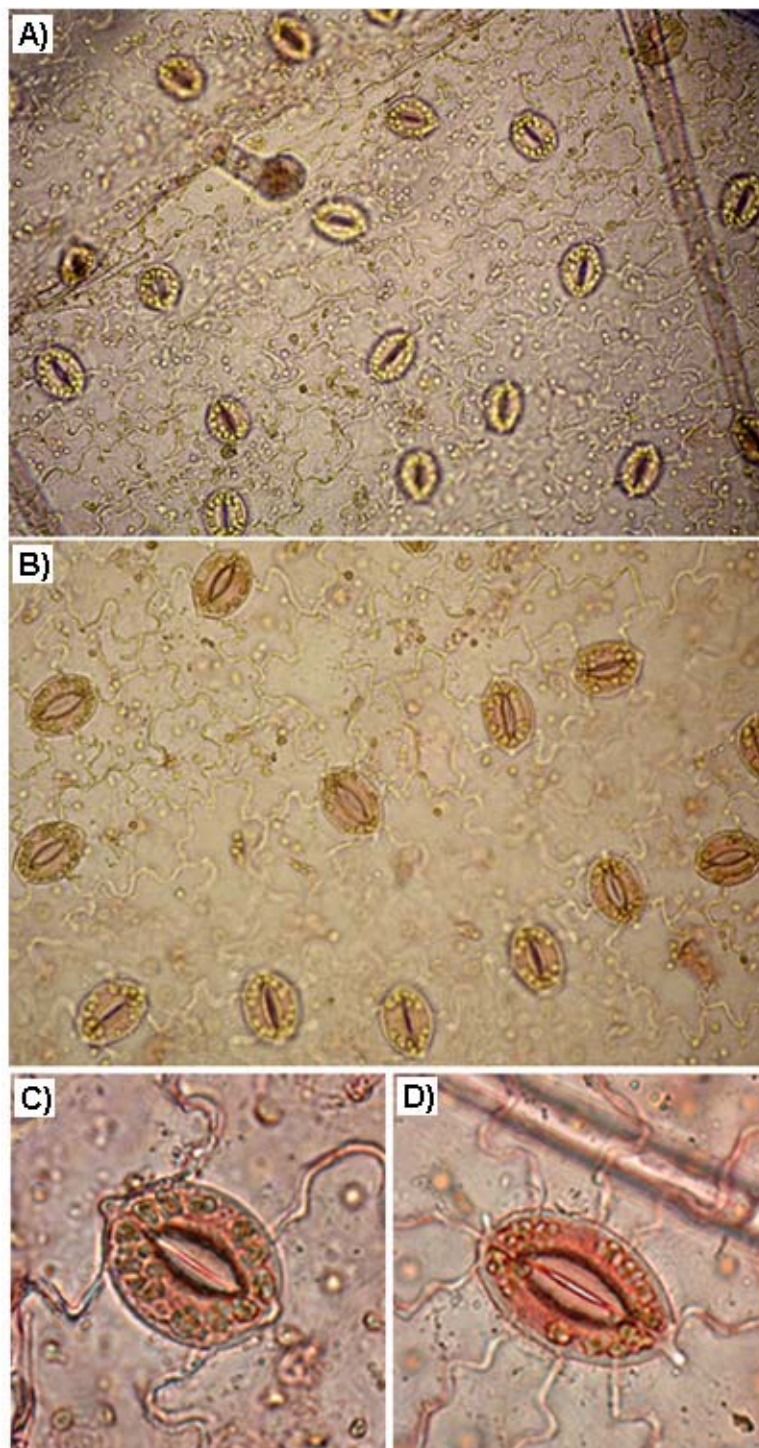
- Surabhi, G., Reddy, K. & Singh, S. (2009) Photosynthesis, fluorescence, shoot biomass and seed weight responses of three cowpea (*Vigna unguiculata* [L.] Walp) cultivars with contrasting sensitivity to UV-B radiation. *Environmental and Experimental Botany* 66, 160–171.
- Suzuki, N., Koussevitzky, S., Mittler, R.O.N. & Miller, G.A.D. (2012) ROS and redox signalling in the response of plants to abiotic stress. *Plant, Cell and Environment* 35, 259–270.
- Szechyńska-Hebda, M. & Karpiński, S. (2013) Light intensity-dependent retrograde signalling in higher plants. *Journal of Plant Physiology* 170, 1501–1516.
- Takahama, U. & Oniki, T. (1992) Regulation of peroxidase-dependent oxidation of phenolics in the apoplast of spinach leaves by ascorbate. *Plant and Cell Physiology* 33, 379–387.
- Takahama, U. & Oniki, T. (1997) A peroxidase/phenolics/ascorbate system can scavenge hydrogen peroxide in plant cells. *Physiologia Plantarum* 101, 845–852.
- Takahama, U. (2004) Oxidation of vacuolar and apoplastic phenolic substrates by peroxidase: physiological significance of the oxidation reactions. *Phytochemistry Reviews* 3, 207–219.
- Tattini, M., Guidi, L., Morassi-Bonzi, L., Pinelli, P., Remorini, D., Degl'Innocenti, E., Giordano, C., Massai, R. & Agati, G. (2005) On the role of flavonoids in the integrated mechanisms of response of *Ligustrum vulgare* and *Phillyrea latifolia* to high solar radiation. *New Phytologist* 167, 457–470.
- Tausz, M., Kranner, I. & Grill, D. (1996) Simultaneous determination of ascorbic acid and dehydroascorbic acid in plant materials by high performance liquid chromatography. *Phytochemical Analysis* 7, 69–72.
- Tcherkez, G., Mauve, C., Lamothe, M., Le Bras, C. & Grapin, A. (2011) The ¹³C/¹²C isotopic signal of day-respired CO₂ in variegated leaves of *Pelargonium × hortorum*. *Plant, Cell & Environment* 34, 270–283.
- Tcherkez, G., Guérard, F., Gilard, F., Lamothe, M., Mauve, C., Gout, E. & Bligny, R. (2012) Metabolomic characterisation of the functional division of nitrogen metabolism in variegated leaves. *Functional Plant Biology* 39, 959–967.
- Teramura, A.H. & Sullivan, J.H. (1994) Effects of UV-B radiation on photosynthesis and growth of terrestrial plants. *Photosynthesis Research* 39, 463–473.
- Thordal-Christensen, H., Zhang, Z., Wei, Y. & Collinge, D.B. (1997) Subcellular localization of H₂O₂ in plants. H₂O₂ accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley-powdery mildew interaction. *The Plant Journal* 11, 1187–1194.
- Tian, L., Wan, S.B., Pan, Q.H., Zheng, Y.J. & Huang, W.D. (2008) A novel plastid localization of chalcone synthase in developing grape berry. *Plant Science* 175, 431–436.
- Tilney-Bassett, R.A.E. (1963) The structure of periclinal chimeras. *Heredity* 18, 265–285.
- Tilney-Bassett, R.A.E. (1975) Genetics of variegated plants. In: *Genetics and biogenesis of mitochondria and chloroplasts* (Eds. Birky, C.W., Perlman, P.S. & Byers, T.J.), Columbus, Ohio State University Press, USA. pp. 268–308.
- Tilney-Bassett, R.A.E. (1986) *Plant Chimeras*. Cambridge University press, Cambridge, UK.
- Tilney-Bassett, R.A.E. & Almouslem, A.B. (1989) Variation in plastid inheritance between pelargonium cultivars and their hybrids. *Heredity* 63, 145–153.
- Tiwari, K.L., Jadhav, S.K. & Gupta, S. (2012) Modified CTAB Technique for Isolation of DNA from some medicinal plants. *Research Journal of Medicinal Plant* 6, 65–73.
- Toker, G., Aslan, M., Yeşilada, E., Memişoğlu, M. & Ito S (2001) Comparative evaluation of the flavonoid content in officinal *Tiliae flos* and Turkish lime species for quality assessment. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 26, 111–121.
- Tolbert, N.E. & Essner, E. (1981) Microbodies: peroxisomes and glyoxysomes. *The Journal of Cell Biology* 91, 271s–283s.
- Tolin, S., Arrigoni, G., Trentin, A.R., Veljović Jovanović, S., Pivato, M., Zechmann, B. & Masi, A. (2013) Biochemical investigations and proteomic profiling in *ggt1⁻* mutant leaves reveal a role for the gamma-glutamyl cycle in the plant's adaptation to the environment. *Proteomics* 13, 2031–2045.

- Toshoji, H., Katsumata, T., Takusagawa, M., Yusa, Y. & Sakai, A. (2011) Effects of chloroplast dysfunction on mitochondria: white sectors in variegated leaves have higher mitochondrial DNA levels and lower dark respiration rates than green sectors. *Protoplasma* 249, 805–817.
- Triantaphylidès, C., Krischke, M., Hoerberichts, F.A., Ksas, B., Gresser, G., Havaux, M., van Breusegem, F. & Mueller, M.J. (2008) Singlet oxygen is the major reactive oxygen species involved in photooxidative damage to plants. *Plant Physiology* 148, 960–968.
- Tucić, B., Manitašević Jovanović, S. & Vuleta A. (2011) Does environmentally contingent variation in the level of molecular chaperones mirror a biochemical adaptation to abiotic stress? In: *Abiotic stress response in plants - physiological, biochemical and genetic perspectives* (eds. Shanker A. & Venkateswarlu, B.), InTech, Rijeka, Croatia. pp. 323–346.
- Turnbull, J.J., Nakajima, J.I., Welford, R.W., Yamazaki, M., Saito, K. & Schofield, C. J. (2004) Mechanistic studies on three 2-oxoglutarate-dependent oxygenases of flavonoid biosynthesis anthocyanidin synthase, flavonol synthase, and flavanone 3 β -hydroxylase. *Journal of Biological Chemistry* 279, 1206–1216.
- Tzin, V. & Galili, G. (2011) New insights into the shikimate and aromatic amino acids biosynthesis pathways in plants. *Molecular Plant* 3, 956–972.
- Urano, J.I., Nakagawa, T., Maki, Y., Masumura, T., Tanaka, K., Murata, N. & Ushimaru, T. (2000) Molecular cloning and characterization of a rice dehydroascorbate reductase. *FEBS letters* 466, 107–111.
- Valkama, E., Kivimäenpää, M., Hartikainen, H., & Wulff, A. (2003). The combined effects of enhanced UV-B radiation and selenium on growth, chlorophyll fluorescence and ultrastructure in strawberry (*Fragaria* \times *ananassa*) and barley (*Hordeum vulgare*) treated in the field. *Agricultural and Forest Meteorology* 120, 267–278.
- Vanacker, H., Harbinson, J., Ruisch, J., Carver, T.L.W. & Foyer, C.H. (1998) Antioxidant defences of the apoplast. *Protoplasma* 205, 129–140.
- van Grondelle, R., Dekker, J.P., Gillbro, T. & Sundstrom, V. (1994) Energy transfer and trapping in photosynthesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* 1187, 1–65.
- Vanderauwera, S., Zimmermann, P., Rombauts, S., Vandenabeele, S., Langebartels, C., Gruijssem, W., ... & Van Breusegem, F. (2005) Genome-wide analysis of hydrogen peroxide-regulated gene expression in Arabidopsis reveals a high light-induced transcriptional cluster involved in anthocyanin biosynthesis. *Plant Physiology* 139, 806–821.
- Vaughn, K.C. (1987) Two immunological approaches to the detection of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase in guard cell chloroplasts. *Plant Physiology* 84, 188–196.
- Veljović Jovanović, S., Oniki, T & Takahama, U. (1998) Detection of monodehydroascorbic acid radical in sulfite-treated leaves and mechanism of its formation. *Plant and Cell Physiology* 39, 1203–1208.
- Veljović Jovanović, S., Pignocchi, C., Noctor, G. & Foyer, C.H. (2001) Low ascorbic acid in the vtc-1 mutant of Arabidopsis is associated with decreased growth and intracellular redistribution of the antioxidant system. *Plant Physiology* 127, 426–435.
- Veljović Jovanović, S., Noctor, G. & Foyer, C.H. (2002) Are leaf hydrogen peroxide concentrations commonly overestimated? The potential influence of artefactual interference by tissue phenols and ascorbate. *Plant Physiology and Biochemistry* 40, 501–507.
- Veljović Jovanović, S., Kukavica, B., Stevanović, B. & Navari-Izzo F. (2006) Senescence- and drought-related changes in peroxidase and superoxide dismutase isoforms in leaves of *Ramonda serbica*. *Journal of Experimental Botany* 57, 1759–1768.
- Vicente, J.A., Peixoto, F., Lopes, M.L. & Madeira, V. (2001) Differential sensitivities of plant and animal mitochondria to the herbicide paraquat. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology* 15, 322–330.
- Vogt, T (2010) Phenylpropanoid biosynthesis. *Molecular Plant* 3, 2–20.

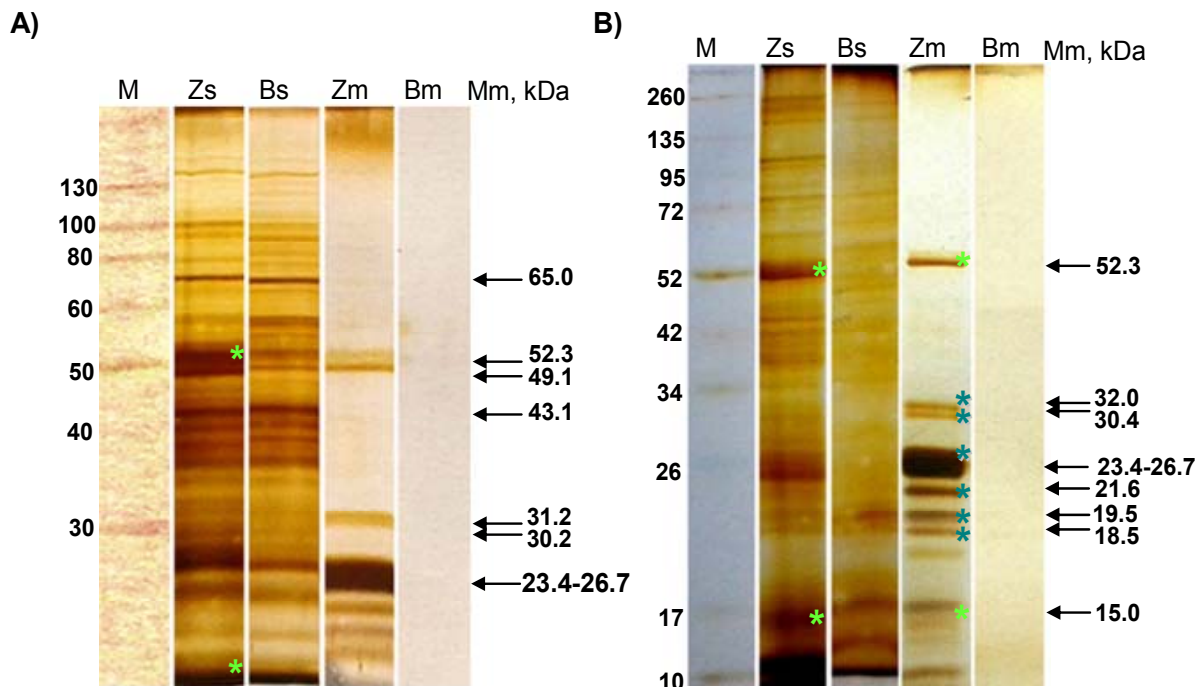
- Vothknecht, U.C. & Soll, J. (2007) Protein import into chloroplasts: who, when and how. In: *The structure and function of plastids* (eds. Wise, R.R. & Hooper, J.K.), Springer Netherlands. pp. 27–51.
- Wada, K., Tada, T., Nakamura, Y., Ishikawa, T., Yabuta, Y., Yoshimura, K., ... & Nishimura, K. (2003) Crystal structure of chloroplastic ascorbate peroxidase from tobacco plants and structural insights into its instability. *Journal of Biochemistry* 134, 239–244.
- Wang, Q., Sullivan, R. W., Kight, A., Henry, R. L., Huang, J., Jones, A. M. & Korth, K.L. (2004) Deletion of the chloroplast-localized Thylakoid formation1 gene product in Arabidopsis leads to deficient thylakoid formation and variegated leaves. *Plant Physiology* 136, 3594–3604.
- Wang, H.L., Wang, W., Li, H., Zhang, P., Zhan, J.C. & Huang, W.D. (2011) Expression and tissue and subcellular localization of anthocyanidin synthase (ANS) in grapevine. *Protoplasma* 248, 267–279.
- Weisiger, R. & Fridovich, I. (1973) Superoxide dismutase. *Journal of Biological Chemistry* 248, 3582–3592.
- Wetzel, C.M., Jiang, C.Z., Meehan, L. J., Voytas, D. F., & Rodermel, S. R. (1994). Nuclear-organelle interactions: the *immutans* variegation mutant of Arabidopsis is plastid autonomous and impaired in carotenoid biosynthesis. *The Plant Journal* 6, 161–175.
- Weydert, C.J. & Cullen, J.J. (2010) Measurement of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in cultured cells and tissue. *Nature protocols* 5, 51–66.
- Wildi, B. & Lütz, C. (1996) Antioxidant composition of selected high alpine plant species from different altitudes. *Plant, Cell and Environment* 19, 138–146.
- Willekens, H., Chamnongpol, S., Davey, M., Schraudner, M., Langebartels, C., Van Montagu, M., Inzé, D. & Van Camp, W. (1997) Catalase is a sink for H₂O₂ and is indispensable for stress defense in C3 plants. *EMBO Journal* 16, 4806–4816.
- Williams, C.A., Harborne, J.B., Newman, M., Greenham, J. & Eagles, J. (1997) Chrysin and other leaf exudate flavonoids in the genus *Pelargonium*. *Phytochemistry* 46, 1349–1353.
- Williams, C.A., Newman, M. & Gibby, M. (2000) The application of leaf phenolic evidence for systematic studies within the genus *Pelargonium* (*Geraniaceae*). *Biochemical Systematics and Ecology* 28, 119–132.
- Winkel, B.S.J. (2004) Metabolic channeling in plants. *Annual Review of Plant Biology* 55, 85–107.
- Wise, R.R. (2007) The diversity of plastid form and function. In: *The structure and function of plastids*, (eds. Wise, R.R. & Hooper, J.K.), Springer Netherlands. pp. 3–26.
- Wojtaszek, P. (1997) Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection. *Biochemical Journal* 322, 681–692.
- Wu, D., Hu, Q., Yan, Z., Chen, W., Yan, C., Huang, X., ... & Shi, Y. (2012) Structural basis of ultraviolet-B perception by UVR8. *Nature* 484, 214–219.
- Yamasaki, H., Sakihama, Y. & Ikehara, N. (1997) Flavonoid-peroxidase reaction as a detoxification mechanism of plant cells against H₂O₂. *Plant Physiology* 115, 1405–1412.
- Yamasaki, H., Takahashi, S. & Heshiki, R. (1999) The tropical fig. *Ficus microcarpa* L. f. cv. golden leaves lacks heatstable dehydroascorbate reductase activity. *Plant and Cell Physiology* 40, 640–649.
- Yi, C. & Deng, X.W. (2005) COP1—from plant photomorphogenesis to mammalian tumorigenesis. *Trends in Cell Biology* 15, 618–625.
- Yoshimura, K., Ishikawa, T., Nakamura, Y., Tamoi, M., Takeda, T., Tada, T., Nishimura, K. & Shigeoka, S. (1998) Comparative study on recombinant chloroplastic and cytosolic ascorbate peroxidase isozymes of spinach. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 353, 55–63.
- Yoshimura, K., Yabuta, Y., Ishikawa, T. & Shigeoka, S. (2000) Expression of spinach ascorbate peroxidase isoenzymes in response to oxidative stresses. *Plant Physiology* 123, 223–234.
- Yu, F., Fu, A., Aluru, M., Park, S., Xu, Y., Liu, H., ... & Rodermel, S. (2007) Variegation mutants and mechanisms of chloroplast biogenesis. *Plant, Cell and Environment*, 30, 350–365.

- Yu, G.H., Li, W., Yuan, Z.Y., Cui, H.Y., Lv, C.G, Gao, Z.P., Han, B., Gong, Y.Z. & Chen, G.X. (2013) The effects of enhanced UV-B radiation on photosynthetic and biochemical activities in super-high-yield hybrid rice Liangyoupeijiu at the reproductive stage. *Photosynthetica* 51, 33–44.
- Zechmann, B., Mauch, F., Sticher, L. & Müller, M. (2008) Subcellular immunocyto-chemical analysis detects the highest concentrations of glutathione in mitochondria and not in plastids. *Journal of Experimental Botany* 59, 4017–4027.
- Zechmann, B. & Zelling, G. (2009) Microwave-assisted rapid plant sample preparation for transmission electron microscopy. *Journal of Microscopy*. 233, 258–268.
- Zechmann, B. (2011) Subcellular distribution of ascorbate in plants. *Plant Signaling and Behavior* 6, 360–363.
- Zechmann, B., Stumpe, M. & Mauch, F. (2011) Immunocytochemical determination of the subcellular distribution of ascorbate in plants. *Planta* 233, 1–12.
- <http://www.uky.edu/Ag/Horticulture/Geneve/teaching/plantpropwebpages/geneticselection/geneticchimera.pdf>. poslednji put pristupljeno 16.04.2015.
- http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome.
- [http://openwetware.org/wiki/20.109\(F07\):_Transmission_electron_microscopy](http://openwetware.org/wiki/20.109(F07):_Transmission_electron_microscopy).

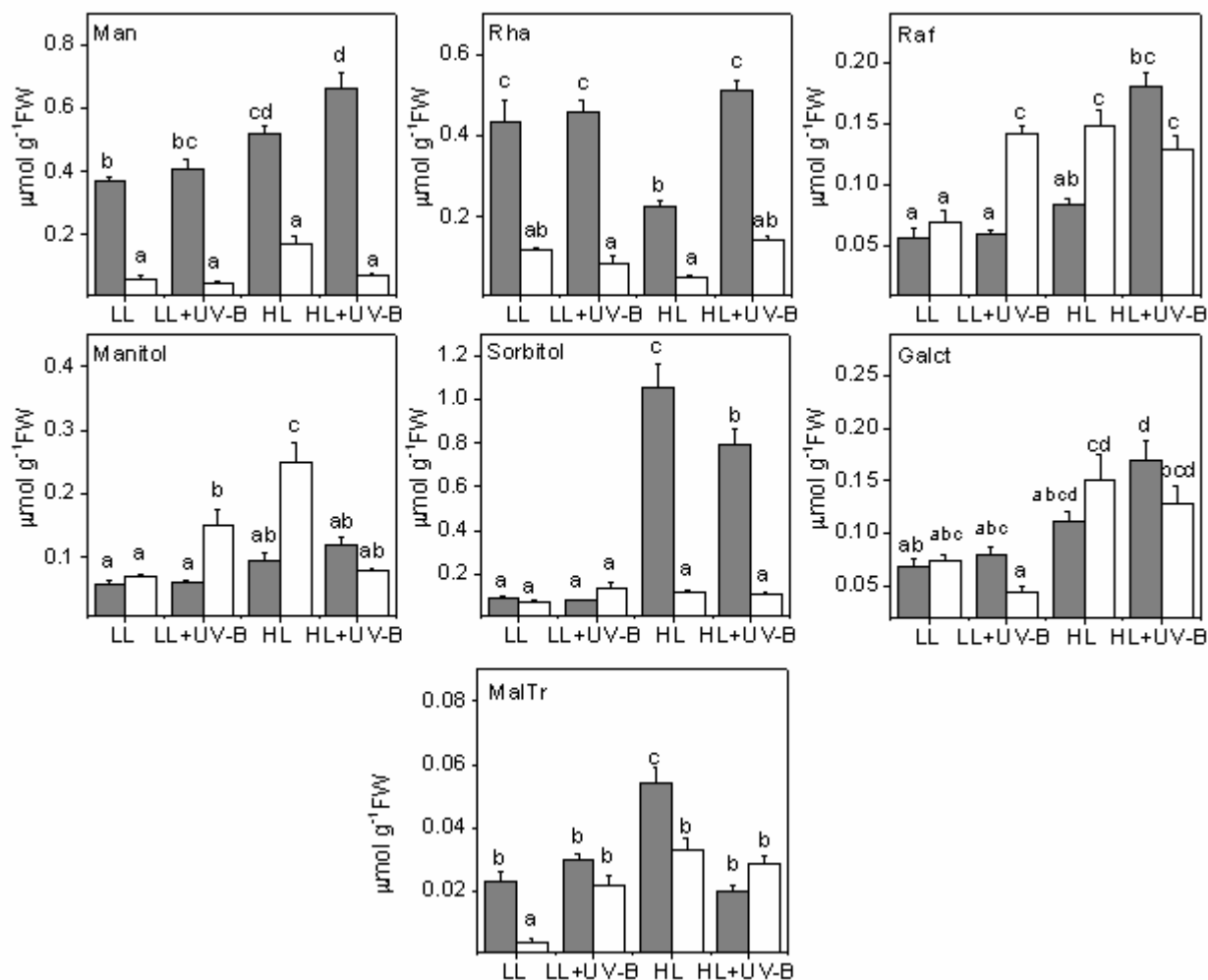
8. PRILOZI



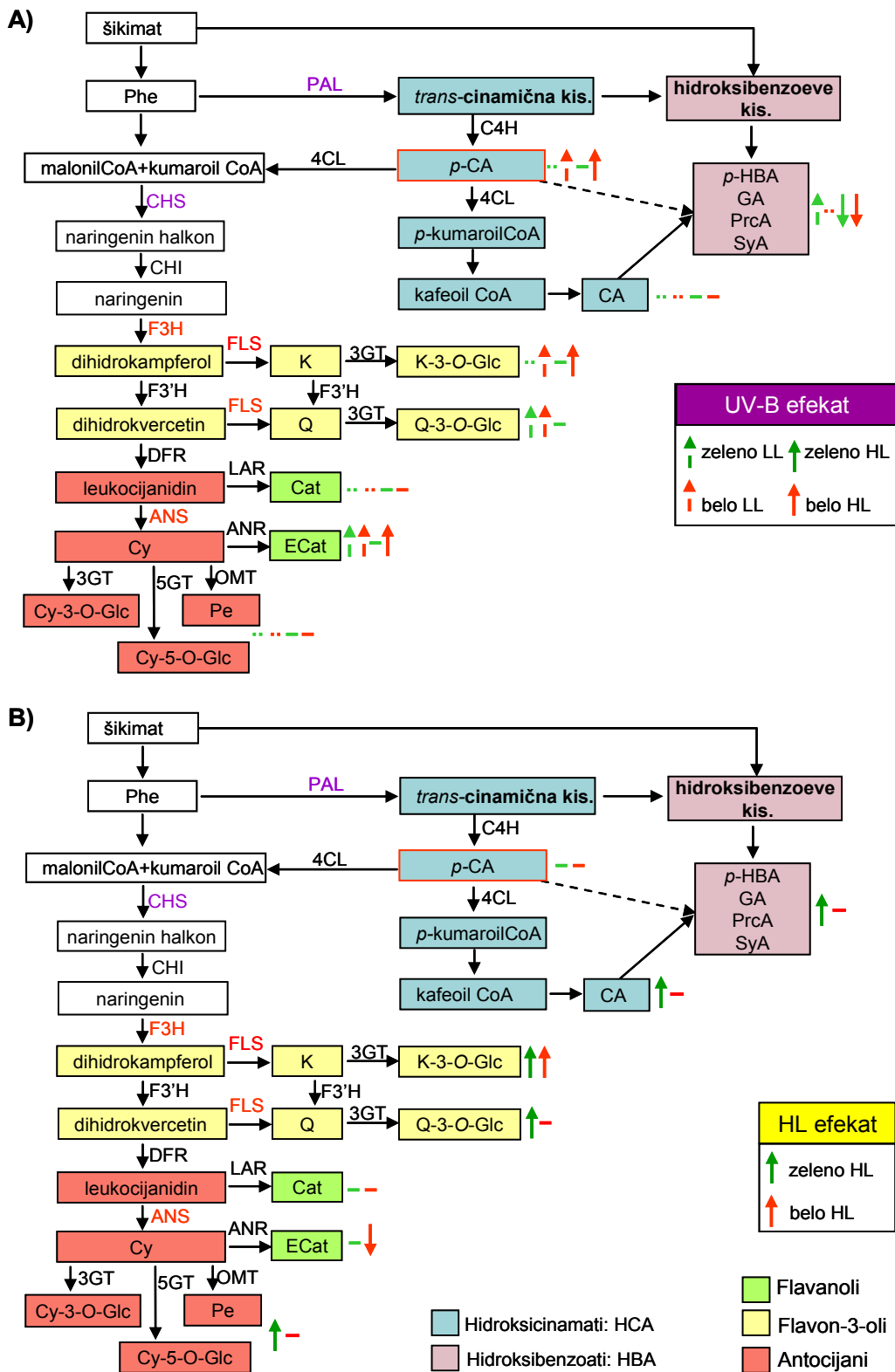
Slika P1. Fotografije stominih ćelija u trakama gornjeg epidermisa skinutih sa zelenih (A, C) i belih (B, D) segmenata listova *P. zonale*, bojenje 0.01% rastvorom neutralne crvene (3-amino-7-dimetilamino-2-metilfenazin hidrohlorid) na pH 5.6. A) i B) uvećanje 10×, C) i D) uvećanje 20×. Uočava se prisustvo hloroplasta u stominim ćelijama i u belim segmentima, koje su malo krupnije od onih iz zelenih segmenata.



Slika P2. Prikaz proteina solubilne i membranske frakcije belog i zelenog tkiva listova muškatele razdvojenih SDS-PAGE, 15% A) i 12% PAG B) U solubilnim frakcijama zelenog tkiva su najuočljivije trake kojima odgovaraju masama od 52 i 15 kDa (zeleno zvezdice) i koje predstavljaju veliku i malu subjedinicu Rubisco proteina. U membranskim (tilakoidnim) frakcijama zelenog tkiva uočavaju se trake oko 30 kDa koje odgovaraju proteinskim subjedinicama PSII, oko 20-27 kDa koje odgovaraju proteinskim komponentama LHC II i LHC I, kao i trake koje odgovaraju Rubisco subjedinicama. U tilakoidnoj frakciji belog tkiva gotovo da nema proteina. Zapremina nanetih solubilnih frakcija zelenog i belog tkiva je normirana na količinu proteina (20 μ g), dok je zapremina membranskih frakcija normirana na masu svežeg tkiva (na gelu od 15%), dok je na gelu od 12% zapremina svih ekstrakata normirana na masu svežeg tkiva. Broj uzoraka koji je analiziran je veći od tri, a svi su razdvajani bar u duplikatu.

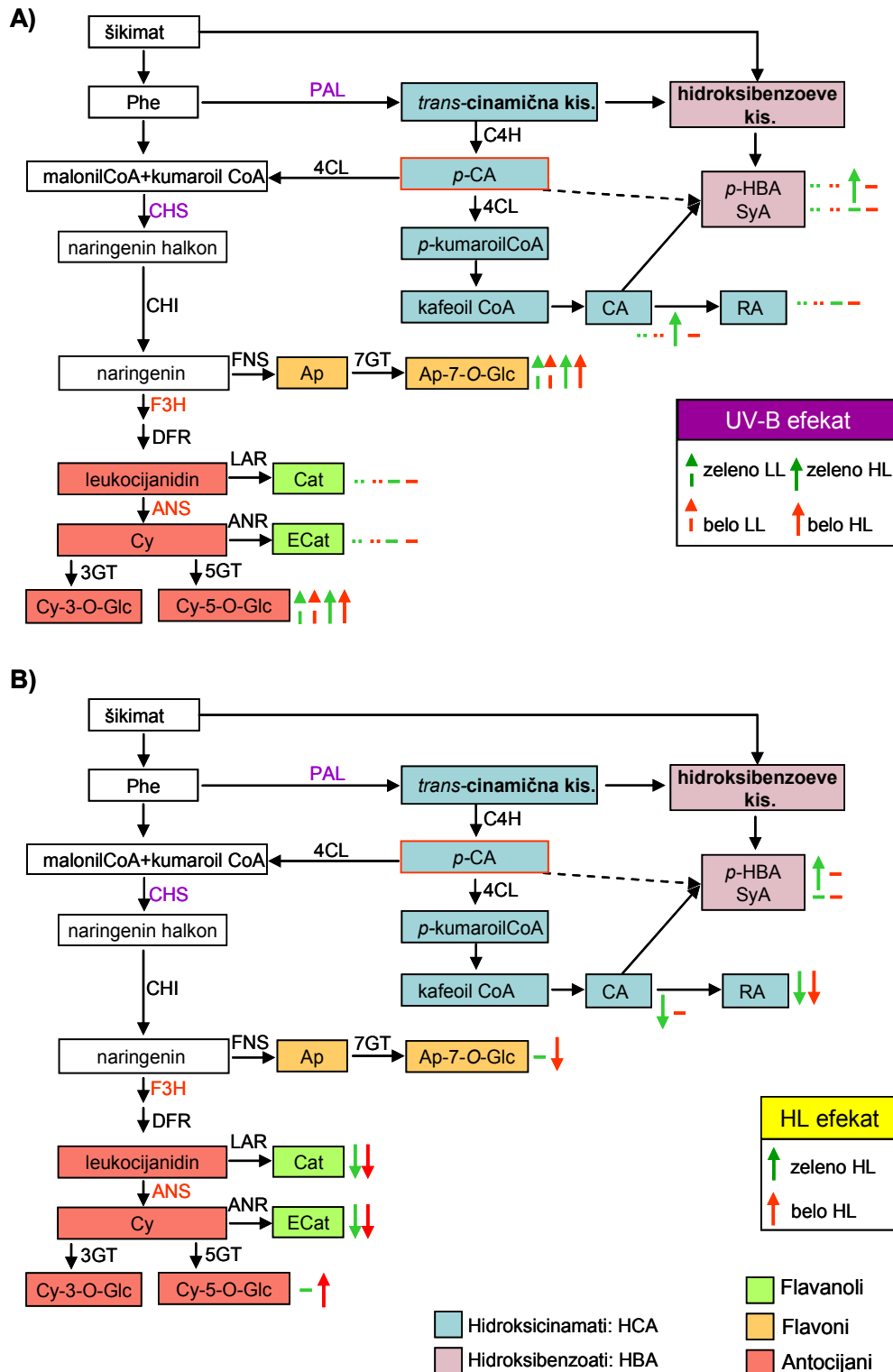


Slika P3. Sadržaj ostalih identifikovanih rastvornih ugljenih hidrata (u odnosu na glavne predstavljene na slici 4.30) u zelenom (sive kolone) i belom (bele kolone) tkivu listova biljaka *P. zonale* nakon desetodnevnog izlaganja LL, LL+UV-B, HL i HL+UV-B režimima. Prikazane su srednje vrednosti \pm SE ($n = 5-6$) izražene u $\mu\text{mol g}^{-1}\text{FW}$. Različita slova označavaju statistički značajne razlike ($P < 0.05$) u sadržaju ugljenih hidrata između različitih režima zračenja i različitih tipa tkiva. Galct, galaktitol; MalTr, maltotrioza; Man, manoz; Raf, rafinoza; Rha, ramnoza.



Slika P4. Shematski prikaz uticaja A) PAR-a visokog intenziteta (HL) i B) UV-B zračenja u kombinaciji sa HL na metabolizam fenolnih jedinjenja u zelenom i belom tkivu biljaka *P. zonale*. Smer obojenih strelica ukazuje na porast ili smanjenje, a ravna crta da nije bilo promena sadržaja datog jedinjenja. Ključni enzimi u ovom metabolizmu, fenilalanin-amonijum liaza, PAL i halkon-sintaza, CHS su naglašeni, a crvenom

bojom su obeležene dioksidogene zavisne od 2-oksoglutarata: F3H, flavanon-3-hidroksilaza; FLS, flavonol-sintaza i ANS, antocijanidin-sintaza. GT, glukozil-transferaze; MT, metil-transferaze; CHI, halkon-izomeraza; LAR, leukoantocijanidin-reduktaza; ANR, antocijanidin-reduktaza; 4CL, 4-kumarat-CoA ligaza; C4H, cinamat-4-hidroksilaza. Ostale skraćenice u legendama slika 4.31 i 4.32.



Slika P5. Shematski prikaz uticaja A) PAR-a visokog intenziteta (HL) i B) UV-B zračenja u kombinaciji sa HL na metabolizam fenolnih jedinjenja u zelenom i belom tkivu biljaka *P. coleoides*. Ostale skraćenice u legendama slika 4.22 i P3.

Tabela P1. Vrednosti fizičkih parametara tokom merenja parametara gasne izmene zelenih segmenata listova biljaka *P. coleoides* izlaganih različitim režima zračenja: 395 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PAR (LL); LL+UV-B (UV-B: 0.90 W m^{-2}); 1350 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PAR (HL) i HL+UV-B tokom deset dana. Predstavljene su srednje vrednosti \pm SE ($n \geq 4$). c_a , ambijentalna koncentracija CO_2 ; E, transpiracija; F' , trenutna fluorescencija *hl a* u listovima adaptiranim na svetlo; F_m' , maksimalna fluorescencija *hl a* listova adaptiranih na svetlo; RH, relativna vlažnost; t, temperatura; VPD, smanjenje pritisku pare vazduha; w_a , ambijentalna koncentracija H_2O .

Dani izlaganja	Fotosintetski parametri	Režimi zračenja			
		LL	LL+UV-B	HL	HL+UV-B
1. dan	t u kivetu ($^{\circ}\text{C}$)	25.00 \pm 0.01	24.99 \pm 0.01	8.6 \pm 0.2	10.5 \pm 1.0
	t lista ($^{\circ}\text{C}$)	25.25 \pm 0.12	24.58 \pm 0.11	133.7 \pm 10.0	184.8 \pm 10.1
	t ambijentalna ($^{\circ}\text{C}$)	24.64 \pm 0.06	24.65 \pm 0.09	0.16 \pm 0.01	0.17 \pm 0.01
	t min ($^{\circ}\text{C}$)	25.48 \pm 0.03	25.37 \pm 0.02	268.4 \pm 8.0	282.3 \pm 11.5
	c_a , ppm	383.0 \pm 0.2	381.1 \pm 0.2	88.0 \pm 4.6	94.5 \pm 4.4
	w_a , ppm	17673 \pm 40	18177 \pm 73	12.0 \pm 0.6	10.4 \pm 1.3
	VPD (Pa/kPA)	16.3 \pm 0.3	14.5 \pm 0.3	191.5 \pm 10.3	184.5 \pm 25.0
	E ($\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	0.68 \pm 0.09	1.95 \pm 0.19	0.17 \pm 0.01	0.17 \pm 0.01
	PAR odozgo ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	249.6 \pm 0.1	249.6 \pm 0.1	273.1 \pm 1.4	282.9 \pm 2.7
	RH (%)	53.5 \pm 0.1	55.0 \pm 0.2	91.2 \pm 6.4	93.9 \pm 1.4
	F' (mV)	162.3 \pm 6.2	135.4 \pm 2.7	11.8 \pm 0.7	13.6 \pm 1.5
	F_m' (mV)	390.0 \pm 21.0	439.0 \pm 8.2	169.2 \pm 7.1	243.5 \pm 26.8
4. dan	T u kivetu ($^{\circ}\text{C}$)	24.99 \pm 0.01	24.99 \pm 0.01	24.98 \pm 0.01	25.00 \pm 0.01
	T lista ($^{\circ}\text{C}$)	24.83 \pm 0.27	24.21 \pm 0.19	26.02 \pm 0.08	25.85 \pm 0.07
	T ambijentalna ($^{\circ}\text{C}$)	24.13 \pm 0.03	23.95 \pm 0.06	25.35 \pm 0.03	24.60 \pm 0.06
	T min ($^{\circ}\text{C}$)	25.41 \pm 0.02	25.42 \pm 0.05	26.16 \pm 0.03	25.97 \pm 0.06
	c_a , ppm	382.6 \pm 0.3	381.5 \pm 0.1	379.6 \pm 0.2	380.3 \pm 0.6
	w_a , ppm	17835 \pm 144	18342 \pm 135	18722 \pm 60	18633 \pm 152
	VPD (Pa/kPA)	15.6 \pm 0.7	13.6 \pm 0.5	17.5 \pm 0.2	16.9 \pm 0.2
	E ($\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	1.09 \pm 0.36	2.38 \pm 0.35	3.35 \pm 0.15	3.11 \pm 0.39
	PAR odozgo ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	249.6 \pm 0.1	249.6 \pm 0.1	1299.8 \pm 0.1	1299.8 \pm 0.2
	RH (%)	53.5 \pm 0.4	55.3 \pm 0.4	55.7 \pm 0.2	55.9 \pm 0.5
	F' (mV)	159.9 \pm 2.9	164.9 \pm 5.1	153.5 \pm 4.1	157.7 \pm 7.4
	F_m' (mV)	391.6 \pm 14.4	426.0 \pm 10.7	184.0 \pm 4.0	189.5 \pm 8.7

Tabela P1. (nastavak sa prethodne strane).

Dani izlaganja	Fotosintetski parametri	Režimi zračenja			
		LL	LL+UV-B	HL	HL+UV-B
10. dan	t u kivetu (°C)	24.99 ± 0.01	24.99 ± 0.01	25.00 ± 0.00	25.00 ± 0.02
	t lista (°C)	25.03 ± 0.07	23.80 ± 0.03	25.96 ± 0.18	25.66 ± 0.14
	t ambijentalna (°C)	23.95 ± 0.02	23.97 ± 0.06	25.32 ± 0.12	24.98 ± 0.26
	t min (°C)	25.35 ± 0.02	25.35 ± 0.03	26.19 ± 0.04	25.85 ± 0.06
	c_a , ppm	382.6 ± 0.3	381.1 ± 0.3	379.6 ± 0.2	378.9 ± 0.6
	w_a , ppm	17703 ± 38	18623 ± 88	18635 ± 35	18902 ± 148
	VPD (Pa/kPA)	15.8 ± 0.2	12.4 ± 0.1	16.7 ± 0.4	15.7 ± 0.3
	E (mmol m ⁻² s ⁻¹)	0.76 ± 0.10	3.10 ± 0.23	3.16 ± 0.09	3.81 ± 0.39
	PAR odozgo (μmol m ⁻² s ⁻¹)	249.6 ± 0.1	249.6 ± 0.1	1299.8 ± 0.1	1299.9 ± 0.1
	RH (%)	53.6 ± 0.1	56.4 ± 0.3	56.6 ± 0.1	57.5 ± 0.4
	F' (mV)	178.1 ± 3.6	181.8 ± 0.9	140.1 ± 2.9	133.5 ± 4.4
	F_m' (mV)	424.0 ± 14.5	464.0 ± 6.2	175.3 ± 3.7	168.3 ± 7.1

Tabela P2. Rezultati dvo-faktorske analize varijanse (ANOVA) sa ponavljanim merenjima prikazuju efekte UV-B zračenja, različitih intenziteta PAR-a (LL i HL) i trajanja eksperimenta (dan), kao i njihovih međusobnih uticaja na fotosintetske parametre određivane prvog i desetog dana eksperimenta u zelenim segmentima listova biljaka *P. coleoides*. Značajni efekti i međusobni uticaji ($P < 0.05$) su zadebljani. Brojevi stepeni slobode (*Df*) su prikazani u zagradama (prvi broj prikazuje *Df* glavnih efekata: „PAR”, „UV-B”, „dan” i njihovih interakcija, a drugi *Df* greške). Ostale skraćenice su objašnjene u tabeli 4.15.

Izvor varijacije	<i>A</i> (<i>Df</i> : 1; 12)		<i>g_s</i> (<i>Df</i> : 1; 12)		Φ_{PSII} (<i>Df</i> : 1; 12)		<i>c_i</i> (<i>Df</i> : 1; 12)		ETR (<i>Df</i> : 1; 12)	
	<i>F</i>	<i>P</i> > <i>F</i>	<i>F</i>	<i>P</i> > <i>F</i>	<i>F</i>	<i>P</i> > <i>F</i>	<i>F</i>	<i>P</i> > <i>F</i>	<i>F</i>	<i>P</i> > <i>F</i>
Između subjektivnih faktora										
PAR	51.37	< 0.0001	28.47	0.0002	1383.65	< 0.0001	10.02	0.0081	166.40	< 0.0001
UV-B	17.68	0.0012	36.55	< 0.0001	0.70	0.4185	6.77	0.0231	0.14	0.7100
PAR × UV-B	1.60	0.2302	3.36	0.0917	3.09	0.1040	2.08	0.1746	1.64	0.2239
Unutar subjektivnih faktora										
Dan	17.58	0.0012	5.87	0.0321	2.93	0.1124	0.12	0.7330	3.41	0.0898
Dan × PAR	12.52	0.0041	0.06	0.8175	2.84	0.1180	0.02	0.8982	3.38	0.0907
Dan × UV-B	0.90	0.3620	1.49	0.2460	0.24	0.6350	0.19	0.6698	0.17	0.6867
Dan × PAR × UV-B	1.01	0.3340	0.32	0.5819	2.76	0.1224	0.57	0.4655	0.74	0.4058

Tabela P3. Rezultati dvo-faktorske ANOVA-e prikazuju efekte UV-B zračenja i različitih intenziteta PAR (LL i HL) i njihovih interakcija na sadržaj i odnose fotosintetskih pigmenata u zelenim segmentima listova biljaka *P. coleoides*. Značajni efekti i interakcije ($P < 0.05$) su zadebljani. Brojevi stepeni slobode (*Df*) su prikazani u zagradama (prvi broj prikazuje *Df* glavnih efekata: „PAR”, „UV-B”, kao i njihovih interakcija, a drugi *Df* greške). Ostale skraćenice su objašnjene u tabeli 4.16.

Parametar	Izvor varijacije	<i>F</i>	<i>P</i> > <i>F</i>	Parametar	Izvor varijacije	<i>F</i>	<i>P</i> > <i>F</i>
Hlorofil a (<i>Df</i> =1;16)	UV-B	2.96	0.1108	β-Karoten (<i>Df</i> =1;16)	UV-B	1.77	0.2086
	PAR	20.84	0.0006		PAR	2.46	0.1427
	UV-B × PAR	0.03	0.8731		UV-B × PAR	0.04	0.8485
Hlorofil b (<i>Df</i> =1;16)	UV-B	4.58	0.0536	Neoksantin (<i>Df</i> =1;16)	UV-B	4.49	0.0557
	PAR	26.95	0.0002		PAR	17.91	0.0012
	UV-B × PAR	0.16	0.6918		UV-B × PAR	0.14	0.7160
Hlorofili (a+b) (<i>Df</i> =1;16)	UV-B	2.73	0.1244	Lutein (<i>Df</i> =1;16)	UV-B	6.84	0.0226
	PAR	1.81	0.2035		PAR	13.69	0.0030
	UV-B × PAR	0.02	0.8989		UV-B × PAR	0.12	0.7306
Hlorofil (a/b) (<i>Df</i> =1;16)	UV-B	3.12	0.1025	Violaksantin (<i>Df</i> =1;16)	UV-B	3.81	0.0745
	PAR	0.21	0.6572		PAR	4.28	0.0608
	UV-B × PAR	1.92	0.1901		UV-B × PAR	0.20	0.6609
hl (a+b)/Σkar	UV-B	0.31	0.5872				
	PAR	123.12	< 0.0001				
	UV-B × PAR	1.83	0.2014				

Tabela P4. Rezultati tro-faktorske ANOVA-e prikazuju efekte UV-B zračenja, različitih intenziteta PAR (LL i HL) i tipa tkiva (zeleno, belo) i njihovih interakcija na sadržaj fenolnih jedinjenja u listovima biljaka *P. coleoides*. Statistički značajni efekti i interakcije ($P < 0.05$) su zadebljani. Brojevi stepeni slobode (*Df*) su prikazani u zagradama (prvi broj prikazuje *Df* glavnih efekata: „PAR”, „UV-B”, „tip tkiva ”, kao i njihovih interakcija, a drugi *Df* greške). Ostale skraćenice su objašnjene u legendi slike 4.22.

Parametar	Izvor varijacije	<i>F</i>	<i>P</i> > <i>F</i>	Parametar	Izvor varijacije	<i>F</i>	<i>P</i> > <i>F</i>
SyA (<i>Df</i> : 1; 56)	tkivo	240.61	< 0.0001	Cat (<i>Df</i> : 1; 56)	tkivo	78.36	< 0.0001
	UV-B	0.02	0.8947		UV-B	1.59	0.2124
	PAR	5.86	0.0188		PAR	0.57	0.4535
	tkivo × UV-B	1.01	0.3192		tkivo × UV-B	0.07	0.7969
	tkivo × PAR	0.39	0.5367		tkivo × PAR	10.05	0.0025
	UV-B × PAR	1.50	0.2252		UV-B × PAR	0.08	0.7777
	tkivo × UV-B × PAR	0.33	0.5693		tkivo × UV-B × PAR	4.80	0.0327
HBA (<i>Df</i> : 1; 56)	tkivo	120.17	< 0.0001	ECat (<i>Df</i> : 1; 56)	tkivo	497.66	< 0.0001
	UV-B	3.19	0.0796		UV-B	5.26	0.0255
	PAR	44.48	< 0.0001		PAR	40.67	< 0.0001
	tkivo × UV-B	0.64	0.4281		tkivo × UV-B	11.70	0.0012
	tkivo × PAR	2.92	0.0929		tkivo × PAR	1.87	0.1774
	UV-B × PAR	12.10	0.0010		UV-B × PAR	3.28	0.0756
	tkivo × UV-B × PAR	0.76	0.3857		tkivo × UV-B × PAR	0.15	0.6991

Tabela P4. (nastavak sa prethodne strane)

Parametar	Izvor varijacije	<i>F</i>	<i>P</i> > <i>F</i>	Parametar	Izvor varijacije	<i>F</i>	<i>P</i> > <i>F</i>
CA (<i>Df</i> : 1; 56)	tkivo	329.13	< 0.0001	Ap (<i>Df</i> : 1; 56)	tkivo	7.64	0.0108
	UV-B	0.34	0.5616		UV-B	93.52	< 0.0001
	PAR	10.61	0.0019		PAR	101.85	< 0.0001
	tkivo × UV-B	1.19	0.2793		tkivo × UV-B	0.03	0.8549
	tkivo × PAR	5.84	0.0190		tkivo × PAR	7.00	0.0142
	UV-B × PAR	11.01	0.0016		UV-B × PAR	15.46	0.0006
	tkivo × UV-B × PAR	8.04	0.0064		tkivo × UV-B × PAR	0.07	0.7976
RA (<i>Df</i> : 1; 56)	tkivo	493.41	< 0.0001	Cy (<i>Df</i> : 1; 56)	tkivo	21.98	< 0.0001
	UV-B	15.62	0.0002		UV-B	36.63	< 0.0001
	PAR	55.17	< 0.0001		PAR	116.13	< 0.0001
	tkivo × UV-B	1.88	0.1761		tkivo × UV-B	13.80	0.0011
	tkivo × PAR	7.50	0.0083		tkivo × PAR	14.08	0.0010
	UV-B × PAR	10.08	0.0024		UV-B × PAR	16.38	0.0005
	tkivo × UV-B × PAR	0.85	0.3597		tkivo × UV-B × PAR	8.15	0.0087

Tabela P5. Rezultati tro-faktorske ANOVA-e prikazuju efekte UV-B zračenja, različitih intenziteta PAR (LL i HL) i tipa tkiva (zeleno, belo) i njihovih interakcija na sadržaj antioksidanata u listovima biljaka *P. coleoides*. Značajni efekti i interakcije ($P < 0.05$) su zadebljani. Brojevi stepeni slobode (*Df*) su prikazani u zagradama (prvi broj prikazuje *Df* glavnih efekata: „PAR”, „UV-B”, „tip tkiva”, kao i njihovih interakcija, a drugi *Df* greške).

Parametar	Izvor varijacije	<i>F</i>	<i>P</i> > <i>F</i>	Parametar	Izvor varijacije	<i>F</i>	<i>P</i> > <i>F</i>
Asc (<i>Df</i> = 1; 40)	tkivo	60.36	< 0.0001	POD (<i>Df</i> = 1; 52)	tkivo	33.75	< 0.0001
	UV-B	2.83	0.1004		UV-B	33.49	< 0.0001
	PAR	16.02	0.0003		PAR	23.13	< 0.0001
	tkivo × UV-B	1.05	0.3122		tkivo × UV-B	4.99	0.0326
	tkivo × PAR	24.43	< 0.0001		tkivo × PAR	10.10	0.0033
	UV-B × PAR	11.54	0.0016		UV-B × PAR	6.48	0.0159
	tkivo × UV-B × PAR	0.62	0.4369		tkivo × UV-B × PAR	0.01	0.9469
APX (<i>Df</i> = 1; 40)	tkivo	0.01	0.9875				
	UV-B	19.37	0.0001				
	PAR	4.87	0.0357				
	tkivo × UV-B	1.39	0.2483				
	tkivo × PAR	2.02	0.1659				
	UV-B × PAR	1.54	0.2248				
	tkivo × UV-B × PAR	11.68	0.0020				

Tabela P6. Vrednosti fizičkih parametara tokom merenja parametara gasne izmene zelenih segmenata listova biljaka *P. zonale* izlaganih različitim režima zračenja: 395 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PAR (LL); LL+UV-B (UV-B: 0.90 W m^{-2}); 1350 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PAR (HL) i HL+UV-B tokom deset dana. Predstavljene su srednje vrednosti \pm SE (n = 7-8). c_a , ambijentalna koncentracija CO_2 ; E, transpiracija; F' , trenutna fluorescencija *hl a* u listovima adaptiranim na svetlo; F'_m , maksimalna fluorescencija *hl a* listova adaptiranih na svetlo; RH, relativna vlažnost; t, temperatura; VPD, smanjenje pritisku pare vazduha; w_a , ambijentalna koncentracija H_2O .

Dani izlaganja	Fotosintetski parametri	Režimi zračenja			
		LL	LL+UV-B	HL	HL+UV-B
1. dan	t kivete ($^{\circ}\text{C}$)	24.98 \pm 0.01	24.99 \pm 0.01	25.00 \pm 0.01	25.00 \pm 0.01
	t lista ($^{\circ}\text{C}$)	24.18 \pm 0.11	24.34 \pm 0.13	25.21 \pm 0.17	25.27 \pm 0.10
	t ambijentalno ($^{\circ}\text{C}$)	24.77 \pm 0.05	25.03 \pm 0.07	24.62 \pm 0.09	24.77 \pm 0.10
	t min ($^{\circ}\text{C}$)	25.48 \pm 0.03	25.39 \pm 0.02	25.88 \pm 0.04	25.86 \pm 0.04
	c_a , ppm	381.4 \pm 0.2	381.3 \pm 0.1	380.2 \pm 0.3	379.9 \pm 0.4
	w_a , ppm	18641 \pm 97	18521 \pm 50	18059 \pm 489	19258 \pm 91
	VPD (Pa/kPA)	13.2 \pm 0.3	13.7 \pm 0.3	15.7 \pm 0.5	14.9 \pm 0.3
	E ($\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	3.13 \pm 0.24	2.83 \pm 0.13	4.77 \pm 0.41	4.91 \pm 0.29
	PAR odozgo ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	249.6 \pm 0.1	249.6 \pm 0.1	1299.8 \pm 0.1	1299.8 \pm 0.1
	RH (%)	56.5 \pm 0.3	56.0 \pm 0.2	54.7 \pm 1.7	57.9 \pm 0.3
	F' (mV)	159.3 \pm 9.8	180.8 \pm 3.7	108.3 \pm 2.9	101.9 \pm 4.1
	F'_m (mV)	380.9 \pm 13.5	433.0 \pm 7.0	126.4 \pm 2.8	120.5 \pm 4.1
	4. dan	t kivete ($^{\circ}\text{C}$)	24.99 \pm 0.01	24.98 \pm 0.01	24.99 \pm 0.01
t lista ($^{\circ}\text{C}$)		23.60 \pm 0.09	23.67 \pm 0.14	25.51 \pm 0.22	25.40 \pm 0.07
t ambijentalno ($^{\circ}\text{C}$)		24.49 \pm 0.05	24.01 \pm 0.03	25.29 \pm 0.05	24.23 \pm 0.08
t min ($^{\circ}\text{C}$)		25.53 \pm 0.02	25.49 \pm 0.02	25.93 \pm 0.04	25.88 \pm 0.02
c_a , ppm		381.4 \pm 0.2	381.4 \pm 0.2	380.2 \pm 0.3	380.3 \pm 0.4
w_a , ppm		18790 \pm 92	18865 \pm 96	18901 \pm 119	18839 \pm 84
VPD (Pa/kPA)		12.2 \pm 0.2	12.1 \pm 0.4	16.3 \pm 0.6	15.5 \pm 0.2
E ($\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)		3.61 \pm 0.25	3.79 \pm 0.30	3.78 \pm 0.29	3.56 \pm 0.23
PAR odozgo ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)		249.6 \pm 0.1	249.6 \pm 0.1	1299.8 \pm 0.1	1299.8 \pm 0.1
RH (%)		56.4 \pm 0.3	56.9 \pm 0.3	56.1 \pm 0.3	56.8 \pm 0.3
F' (mV)		158.7 \pm 6.5	151.9 \pm 5.1	102.5 \pm 2.4	90.5 \pm 2.7
F'_m (mV)		401.1 \pm 6.8	371.8 \pm 11.2	124.8 \pm 3.4	113.7 \pm 3.7

Tabela P6. (nastavak sa prethodne strane).

Dani izlaganja	Fotosintetski parametri	Režimi zračenja			
		LL	LL+UV-B	HL	HL+UV-B
10. dan	t kivete (°C)	24.99 ± 0.01	24.99 ± 0.01	25.00 ± 0.00	25.00 ± 0.01
	t lista (°C)	23.60 ± 0.08	23.68 ± 0.08	25.61 ± 0.11	25.60 ± 0.11
	t ambijentalno (°C)	24.23 ± 0.02	24.27 ± 0.04	25.19 ± 0.15	25.27 ± 0.08
	t min (°C)	25.46 ± 0.02	25.47 ± 0.02	25.96 ± 0.03	25.99 ± 0.04
	c_a , ppm	381.3 ± 0.2	381.4 ± 0.1	380.3 ± 0.4	380.1 ± 0.4
	w_a , ppm	18706 ± 101	18668 ± 70	18839 ± 85	18664 ± 125
	VPD (Pa/kPA)	12.2 ± 0.2	12.1 ± 0.2	15.7 ± 0.3	15.8 ± 0.3
	E (mmol m ⁻² s ⁻¹)	3.38 ± 0.24	3.29 ± 0.23	3.67 ± 0.21	3.19 ± 0.32
	PAR odozgo (μmol m ⁻² s ⁻¹)	249.6 ± 0.1	249.6 ± 0.1	1299.8 ± 0.1	1299.8 ± 0.1
	RH (%)	56.6 ± 0.3	56.6 ± 0.2	57.2 ± 0.3	56.8 ± 0.4
	F' (mV)	153.6 ± 5.2	152.5 ± 5.1	87.8 ± 1.8	89.9 ± 3.1
	F_m' (mV)	406.3 ± 4.6	405.0 ± 8.2	108.3 ± 2.8	114.3 ± 5.0

Tabela P7. Rezultati dvo-faktorske ANOVA-e sa ponavljanim merenjima prikazuju efekte UV-B zračenja, različitih intenziteta PAR-a (LL i HL) i trajanja eksperimenta (dan), kao i njihovih interakcija na fotosintetske parametre u zelenim segmentima listova biljaka *P. zonale*. Značajni efekti i interakcije ($P < 0.05$) su zadebljani. Brojevi stepeni slobode (*Df*) su prikazani u zagradama (prvi broj prikazuje *Df* glavnih efekata: „PAR”, „UV-B”, „dan” i njihovih interakcija, a drugi *Df* greške). Ostale skraćenice su objašnjene u tabeli 4.15.

Izvor varijacije	<i>F</i>	<i>P > F</i>	<i>F</i>	<i>P > F</i>	<i>F</i>	<i>P > F</i>	<i>F</i>	<i>P > F</i>	<i>F</i>	<i>P > F</i>
Između subjektivnih faktora	<i>A (Df: 1; 26)</i>		<i>g_s (Df: 1; 26)</i>		<i>Fq'/Fm' (Df: 1; 26)</i>		<i>ETR (Df: 1; 26)</i>		<i>c_i (Df: 1; 26)</i>	
PAR	34.77	<0.0001	1.77	0.1947	5490.32	<0.0001	223.42	<0.0001	90.91	<0.0001
UV-B	0.80	0.3790	0.04	0.8421	0.29	0.5943	3.35	0.0786	4.12	0.0526
PAR × UV-B	0.93	0.3434	0.34	0.5664	7.40	0.0115	5.66	0.0250	0.17	0.6849
Unutar subjektivnih faktora	<i>A (Df: 2; 52)</i>		<i>g_s (Df: 2; 52)</i>		<i>Fq'/Fm' (Df: 2; 52)</i>		<i>ETR (Df: 2; 52)</i>		<i>c_i (Df: 2; 52)</i>	
Dan	2.23	0.1176	2.20	0.1212	50.50	<0.0001	40.63	<0.0001	5.75	0.0055
Dan × PAR	0.19	0.8258	31.13	<0.0001	2.63	0.0818	23.99	<0.0001	64.87	<0.0001
Dan × UV-B	0.09	0.9145	0.45	0.6398	0.71	0.4943	0.92	0.4045	1.10	0.3395
Dan × PAR × UV-B	0.01	0.9876	2.80	0.0700	1.40	0.2566	1.17	0.3189	7.19	0.0018

Tabela P8. Rezultati dvo-faktorske ANOVA-e prikazuju efekte UV-B zračenja i različitih intenziteta PAR-a (LL i HL) i njihovih interakcija na sadržaj i odnose fotosintetskih pigmenta u zelenim segmentima listova biljaka *P. zonale*. Značajni efekti i interakcije ($P < 0.05$) su zadebljani. Brojevi stepeni slobode (*Df*) su prikazani u zagradama (prvi broj prikazuje *Df* glavnih efekata: „PAR”, „UV-B”, kao i njihovih interakcija, a drugi *Df* greške). Ostale skraćenice su objašnjene u tabeli 4.16.

Parametar	Izvor varijacije	<i>F</i>	<i>P</i> > <i>F</i>	Parametar	Izvor varijacije	<i>F</i>	<i>P</i> > <i>F</i>
Hlorofil a (<i>Df</i> =1;28)	UV-B	0.30	0.5866	β-Karoten (<i>Df</i> =1;28)	UV-B	0.02	0.8887
	PAR	28.11	<0.0001		PAR	41.52	<0.0001
	UV-B × PAR	0.19	0.6663		UV-B × PAR	0.33	0.5679
Hlorofil b (<i>Df</i> =1;28)	UV-B	0.02	0.8887	Neoksantin (<i>Df</i> =1;24)	UV-B	0.01	0.9109
	PAR	41.52	<0.0001		PAR	17.81	0.0003
	UV-B × PAR	0.33	0.5679		UV-B × PAR	0.10	0.7519
Hlorofili (a+b) (<i>Df</i> =1;28)	UV-B	0.02	0.8887	Lutein (<i>Df</i> =1;28)	UV-B	0.00	0.9594
	PAR	41.52	<0.0001		PAR	13.21	0.0011
	UV-B × PAR	0.33	0.5679		UV-B × PAR	0.02	0.8804
Hlorofil (a/b) (<i>Df</i> =1;28)	UV-B	0.02	0.8887	Violaksantin (<i>Df</i> =1;24)	UV-B	0.56	0.4627
	PAR	41.52	<0.0001		PAR	21.24	<0.0001
	UV-B × PAR	0.33	0.5679		UV-B × PAR	0.16	0.6923
hl (a+b)/Σkar (<i>Df</i> =1;28)	UV-B	0.18	0.6721	Anteraksantin (<i>Df</i> =1;24)	UV-B	2.30	0.1428
	PAR	337.61	<0.0001		PAR	220.81	<0.0001
	UV-B × PAR	12.39	0.0015		UV-B × PAR	3.92	0.0594

Tabela P9. Rezultati tro-faktorske ANOVA-e prikazuju efekte UV-B zračenja, različitih intenziteta PAR-a (LL i HL) i tipa tkiva (zeleno, belo) i njihovih interakcija na sadržaj rastvornih ugljenih hidrata u listovima biljaka *P. zonale*. Značajni efekti i interakcije ($P < 0.05$) su zadebljani. Brojevi stepeni slobode (*Df*) su prikazani u zagradama (prvi broj prikazuje *Df* glavnih efekata: „PAR”, „UV-B”, „tip tkiva ”, kao i njihovih interakcija, a drugi *Df* greške). Ostale skraćenice su objašnjene u legendi slike 4.30.

Parametar	Izvor varijacije	<i>F</i>	<i>P</i> > <i>F</i>	Parametar	Izvor varijacije	<i>F</i>	<i>P</i> > <i>F</i>
Glc (<i>Df</i> : 1; 33)	PAR	31.52	< 0.0001	Fru (<i>Df</i> : 1; 33)	PAR	90.12	< 0.0001
	UV-B	4.23	0.0478		UV-B	7.36	0.0105
	tkivo	109.36	< 0.0001		tkivo	339.18	< 0.0001
	PAR × UV-B	11.77	0.0016		PAR × UV-B	16.83	0.0003
	PAR × tkivo	0.60	0.4452		PAR × tkivo	24.14	< 0.0001
	UV-B × tkivo	7.03	0.0122		UV-B × tkivo	10.49	0.0027
	PAR × UV-B × tkivo	0.25	0.6202		PAR × UV-B × tkivo	1.80	0.1883
Suc (<i>Df</i> : 1; 33)	PAR	38.13	< 0.0001	Gal (<i>Df</i> : 1; 33)	PAR	9.24	0.0046
	UV-B	3.40	0.0743		UV-B	0.29	0.5961
	tkivo	59.05	< 0.0001		tkivo	28.66	< 0.0001
	PAR × UV-B	1.87	0.1805		PAR × UV-B	1.97	0.1693
	PAR × tkivo	31.73	< 0.0001		PAR × tkivo	2.62	0.1148
	UV-B × tkivo	3.77	0.0608		UV-B × tkivo	0.20	0.6602
PAR × UV-B × tkivo	1.36	0.2527	PAR × UV-B × tkivo	5.22	0.0289		
Tre (<i>Df</i> : 1; 33)	PAR	20.41	< 0.0001	Mal (<i>Df</i> : 1; 33)	PAR	63.53	< 0.0001
	UV-B	4.07	0.0519		UV-B	4.69	0.0377
	tkivo	22.54	< 0.0001		tkivo	71.24	< 0.0001
	PAR × UV-B	33.72	< 0.0001		PAR × UV-B	1.00	0.3238
	PAR × tkivo	7.95	0.0081		PAR × tkivo	19.77	< 0.0001
	UV-B × tkivo	18.17	< 0.0001		UV-B × tkivo	2.19	0.1486
PAR × UV-B × tkivo	6.02	0.0196	PAR × UV-B × tkivo	10.11	0.0032		

Tabela P10. Rezultati tro-faktorske ANOVA-e prikazuju efekte UV-B zračenja, različitih intenziteta PAR-a (LL i HL) i tipa tkiva (zeleno, belo) i njihovih interakcija na sadržaj hidroksibenzoevih kiselina u listovima biljaka *P. zonale*. Značajni efekti i interakcije ($P < 0.05$) su zadebljani. Brojevi stepeni slobode (*Df*) su prikazani u zagradama (prvi broj prikazuje *Df* glavnih efekata: „PAR”, „UV-B”, „tip tkiva”, kao i njihovih interakcija, a drugi *Df* greške). Ostale skraćenice su objašnjene u legendi slike 4.31.

Parametar	Izvor varijacije	<i>F</i>	$P > F$	Parametar	Izvor varijacije	<i>F</i>	$P > F$
<i>p</i>-HBA (<i>Df</i> : 1; 36)	PAR	5.17	0.0291	GA (<i>Df</i> : 1; 36)	PAR	0.89	0.3505
	UV-B	9.66	0.0037		UV-B	2.67	0.1109
	tkivo	376.75	< 0.0001		tkivo	487.6	< 0.0001
	PAR × UV-B	131.38	< 0.0001		PAR × UV-B	104.47	< 0.0001
	PAR × tkivo	0.05	0.8309		PAR × tkivo	18.77	0.0001
	UV-B × tkivo	1.48	0.2323		UV-B × tkivo	0.06	0.8113
	PAR × UV-B × tkivo	90.03	< 0.0001		PAR × UV-B × tkivo	43.77	< 0.0001
SyA (<i>Df</i> : 1; 36)	PAR	33.56	< 0.0001	PrcA (<i>Df</i> : 1; 36)	PAR	7.72	0.0086
	UV-B	53.37	< 0.0001		UV-B	4.72	0.0365
	tkivo	830.34	< 0.0001		tkivo	384.01	< 0.0001
	PAR × UV-B	34.78	< 0.0001		PAR × UV-B	100.58	< 0.0001
	PAR × tkivo	39.51	< 0.0001		PAR × tkivo	25.29	< 0.0001
	UV-B × tkivo	15.71	0.0003		UV-B × tkivo	0.18	0.6706
	PAR × UV-B × tkivo	8.72	0.0055		PAR × UV-B × tkivo	49.39	< 0.0001

Tabela P11. Rezultati tro-faktorske ANOVA-e prikazuju efekte UV-B zračenja, različitih intenziteta PAR-a (LL i HL) i tipa tkiva (zeleno, belo) i njihovih interakcija na sadržaj fenolnih jedinjenja u listovima biljaka *P. zonale*. Značajni efekti i interakcije ($P < 0.05$) su zadebljani. Brojevi stepeni slobode (*Df*) su prikazani u zagradama (prvi broj prikazuje *Df* glavnih efekata: „PAR”, „UV-B”, „tip tkiva”, kao i njihovih interakcija, a drugi *Df* greške). Ostale skraćenice su objašnjene u legendi slike 4.32.

Parametar	Izvor varijacije	<i>F</i>	$P > F$	Parametar	Izvor varijacije	<i>F</i>	$P > F$
<i>p</i>-CA	PAR	21.33	< 0.0001	CA	PAR	38.92	< 0.0001
(<i>Df</i> : 1; 52)	UV-B	69.86	< 0.0001	(<i>Df</i> : 1; 52)	UV-B	0.01	0.9192
	tkivo	73.48	< 0.0001		tkivo	40.03	< 0.0001
	PAR × UV-B	7.39	0.0089		PAR × UV-B	0.00	1.0000
	PAR × tkivo	17.08	0.0001		PAR × tkivo	32.53	< 0.0001
	UV-B × tkivo	32.27	< 0.0001		UV-B × tkivo	0.00	0.9863
	PAR × UV-B × tkivo	0.02	0.8759		PAR × UV-B × tkivo	0.99	< 0.0001
Cat	PAR	27.72	< 0.0001	ECat	PAR	24.79	< 0.0001
(<i>Df</i> : 1; 52)	UV-B	0.12	0.7283	(<i>Df</i> : 1; 52)	UV-B	6.10	0.0169
	tkivo	322.22	< 0.0001		tkivo	2.82	0.0989
	PAR × UV-B	0.11	0.7462		PAR × UV-B	0.21	0.6451
	PAR × tkivo	10.39	0.0022		PAR × tkivo	14.17	0.0004
	UV-B × tkivo	0.00	0.9688		UV-B × tkivo	22.73	< 0.0001
	PAR × UV-B × tkivo	0.22	0.6420		PAR × UV-B × tkivo	7.92	0.0069

Tabela P11. (nastavak tabele sa prethodne strane).

Parametar	Izvor varijacije	<i>F</i>	<i>P</i> > <i>F</i>	Parametar	Izvor varijacije	<i>F</i>	<i>P</i> > <i>F</i>
K (<i>Df</i> : 1; 52)	PAR	88.14	< 0.0001	Q (<i>Df</i> : 1; 52)	PAR	121.23	< 0.0001
	UV-B	44.88	< 0.0001		UV-B	30.31	< 0.0001
	tkivo	0.40	0.5292		tkivo	41.53	< 0.0001
	PAR × UV-B	0.12	0.7301		PAR × UV-B	2.42	0.1255
	PAR × tkivo	18.60	< 0.0001		PAR × tkivo	44.87	< 0.0001
	UV-B × tkivo	7.96	0.0067		UV-B × tkivo	1.96	0.1669
	PAR × UV-B × tkivo	0.86	0.3569		PAR × UV-B × tkivo	0.33	0.5667
TAK (<i>Df</i> : 1; 52)	PAR	88.67	< 0.0001				
	UV-B	16.65	0.0002				
	tkivo	255.09	< 0.0001				
	PAR × UV-B	0.47	0.4971				
	PAR × tkivo	45.95	< 0.0001				
	UV-B × tkivo	2.04	0.1592				
	PAR × UV-B × tkivo	0.86	0.3584				

Tabela P12. Rezultati tro-faktorske ANOVA-e prikazuju efekte UV-B zračenja, različitih intenziteta PAR-a (LL i HL) i tipa tkiva (zeleno, belo) i njihovih interakcija na nivo antioksidanata i karbonilovanih proteina u listovima biljaka *P. zonale*. Značajni efekti i interakcije ($P < 0.05$) su zadebljani. Brojevi stepeni slobode (*Df*) su prikazani u zagradama (prvi broj prikazuje *Df* glavnih efekata: „PAR”, „UV-B”, „tip tkiva ”, kao i njihovih interakcija, a drugi *Df* greške).

Parametar	Izvor varijacije	<i>F</i>	<i>P</i> > <i>F</i>	Parametar	Izvor varijacije	<i>F</i>	<i>P</i> > <i>F</i>
totAsc (<i>Df</i> : 1; 48)	PAR	176.33	< 0.0001	RkA (<i>Df</i> : 1; 48)	PAR	4.05	0.0498
	UV-B	15.44	0.0003		UV-B	0.01	0.9382
	tkivo	186.28	< 0.0001		tkivo	0.75	0.3922
	PAR × UV-B	4.24	0.0449		PAR × UV-B	1.39	0.2442
	PAR × tkivo	6.92	0.0114		PAR × tkivo	0.17	0.6825
	UV-B × tkivo	15.64	0.0003		UV-B × tkivo	2.77	0.1025
	PAR × UV-B × tkivo	6.81	0.0120		PAR × UV-B × tkivo	1.25	0.2685
Karb. pr. (<i>Df</i> : 1; 24)	PAR	10.58	0.0034	APX (<i>Df</i> : 1; 48)	PAR	135.72	< 0.0001
	UV-B	12.39	0.0018		UV-B	1.94	0.1700
	tkivo	31.04	< 0.0001		tkivo	100.86	< 0.0001
	PAR × UV-B	0.26	0.6119		PAR × UV-B	8.14	0.0064
	PAR × tkivo	2.96	0.0983		PAR × tkivo	6.48	0.0142
	UV-B × tkivo	1.56	0.2239		UV-B × tkivo	15.62	0.0003
	PAR × UV-B × tissue	0.04	0.8496		PAR × UV-B × tkivo	1.29	0.2619
POD (<i>Df</i> : 1; 48)	PAR	31.04	< 0.0001	CAT (<i>Df</i> : 1; 48)	PAR	24.69	< 0.0001
	UV-B	23.04	< 0.0001		UV-B	21	< 0.0001
	tkivo	0.21	0.6500		tkivo	484.36	< 0.0001
	PAR × UV-B	28.03	< 0.0001		PAR × UV-B	7.86	0.0073
	PAR × tkivo	5.58	0.0222		PAR × tkivo	47.33	< 0.0001
	UV-B × tkivo	2.44	0.1252		UV-B × tkivo	11.24	0.0016
	PAR × UV-B × tkivo	8.08	0.0065		PAR × UV-B × tkivo	8.7	0.0049

9. BIOGRAFIJA AUTORA

Marija S. Vidović rođena je u Beogradu, 20. januara 1981. godine. Osnovnu školu i Petu beogradsku gimnaziju završila je u Beogradu. Diplomirala je 2008. godine na Hemijskom fakultetu Univerziteta u Beogradu, odsek Biohemija sa prosečnom ocenom 9.21 u toku studija i ocenom 10 na diplomskom ispitu. Doktorske studije na Katedri za biohemiju Hemijskog fakulteta upisala je 2008. godine pod mentorstvom prof. dr Ljube Mandić i dr Sonje Veljović Jovanović. U zvanje istraživač-saradnik izabrana je septembra 2010. godine.

Od 2008. do 2010. godine bila je stipendista Ministarstva nauke Republike Srbije za doktorante. Od februara 2010. godine je zaposlena na Institutu za multidisciplinarna istraživanja Univerziteta u Beogradu, na odseku Nauka o živim sistemima. Od 2010. godine (bila) je angažovana na 5 nacionalnih naučno-istraživačkih projekata i na jednom evropskom.

Od početka posle diplomskih studija boravila je više puta na istraživačkom radu u inostranstvu. Godine 2008. tri meseca se stručno usavršavala na Poljoprivrednom fakultetu Univerziteta u Padovi, Italija. Tokom aprila 2011. g. i maja 2012. g. boravila je u "Helmholtz Zentrum München", Nemačka (kao dobitnik stipendije 'COST' Akcije FA0906: „UV4growth"). Tokom juna 2012. g. boravila na usavršavanju na Institutu za nauke o biljkama u okviru *Karl-Franzens* Univerziteta u Gracu, Austrija.

Pohađala je tri praktična kursa iz usavršavanja tehnika tečne hromatografije visokih performansi i jedan iz teorijskih i praktičnih osnova proteomike. Autor i koautor je četiri naučna rada u vrhunskim međunarodnim časopisima (kategorije M21), jednog rada u međunarodnom časopisu (M23), 16 saopštenja na međunarodnim skupovima štampanih u izvodu, i održala je četiri predavanja na međunarodnim skupovima.

Govori, čita i piše engleski i francuski jezik.

Изјава о ауторству

Потписани-а: Марија С. Видовић

број индекса: 01/2008

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом:

„Антиоксидативни метаболизам белог и зеленог ткива листова панаширане мушкатле (*Pelargonium zonale*) и тамјанике (*Plectranthus coleoides*) - утицај зрачења из видљиве и УВ-Б области“.

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

Потпис докторанда

У Београду, _____

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора: Марија С. Видовић

Број индекса: 01/2008

Студијски програм: Доктор биохемијских наука

Наслов рада: „**Антиоксидативни метаболизам белог и зеленог ткива листова панаширане мушкатле (*Pelargonium zonale*) и тамјанике (*Plectranthus coleoides*) - утицај зрачења из видљиве и УВ-Б области**“.

Ментори: проф. др Љуба М. Мандић

Потписана _____

и

др Соња Вељовић Јовановић

Потписана _____

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

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

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

Потпис докторанда

У Београду, _____

Изјава о коришћењу

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

„Антиоксидативни метаболизам белог и зеленог ткива листова панаширане мушкатле (*Pelargonium zonale*) и тамјанике (*Plectranthus coleoides*) - утицај зрачења из видљиве и УВ-Б области“, која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

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

1. Ауторство
2. Ауторство – некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

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

Потпис докторанда

У Београду, _____

1. Ауторство - Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. Ауторство – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.