

Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet

Klara Krmpotić i Iva Šutevski

**Učinak mehaničkog stresa na modelnu  
biljku *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.**

Zagreb, 2019.

Ovaj rad izrađen je u Botaničkom zavodu Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Željke Vidaković-Cifrek i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2018. /2019.

## SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>1.1. Značaj istraživanja odgovora biljaka na stresne uvjete</b> .....	1
<b>1.2. Biotički i abiotički stresni uvjeti</b> .....	1
<b>1.3. Mehanički stres</b> .....	2
<b>1.5. Sistemski odgovor u biljaka</b> .....	3
<b>1.6. Parametri stresa u biljkama</b> .....	4
1.6.1. Oksidacijski stres .....	5
1.6.2. Fotosintetski pigmenti.....	10
1.6.3. Fluorescencija klorofila.....	10
1.6.4. Oslobađanje elektrolita iz biljnog tkiva .....	11
<b>1.7. Vrsta <i>Arabidopsis thaliana</i> kao modelni organizam</b> .....	11
<b>2. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA</b> .....	13
<b>3. MATERIJAL I METODE</b> .....	15
<b>3.1. Biljni materijal</b> .....	15
<b>3.2. Korišteni uređaji</b> .....	15
<b>3.3. Izlaganje biljaka mehaničkom stresu</b> .....	16
<b>3.4. Ekstrakcija topivih proteina</b> .....	17
<b>3.5. Mjerenje koncentracije ukupnih topivih proteina metodom Bradforda</b> .....	17
<b>3.6. Određivanje aktivnosti katalaze</b> .....	18
<b>3.7. Određivanje aktivnosti gvajakol peroksidaze</b> .....	19
<b>3.8. Određivanje aktivnosti askorbat peroksidaze</b> .....	19
<b>3.9. Određivanje aktivnosti superoksid dismutaze</b> .....	20
<b>3.10. Priprema ekstrakta i određivanje stupnja lipidne peroksidacije</b> .....	21
<b>3.11. Priprema ekstrakta i određivanje količine vodikovog peroksida</b> .....	22
<b>3.12. Priprema ekstrakta i određivanje udjela ukupnih fenola</b> .....	22
<b>3.13. Određivanje stope oksidacije fenola</b> .....	23
<b>3.14. Određivanje udjela fotosintetskih pigmenata</b> .....	23
<b>3.15. Mjerenje razine fluorescencije klorofila <i>in vivo</i></b> .....	24
<b>3.16. Procjena propusnosti plazmatske membrane</b> .....	26
<b>3.17. Prikaz i statistička obrada podataka</b> .....	26

<b>4. REZULTATI</b> .....	27
<b>4.1. Udio ukupnih topivih proteina</b> .....	27
<b>4.2. Aktivnost katalaze</b> .....	28
<b>4.3. Aktivnost gvajakol peroksidaze</b> .....	29
<b>4.4. Aktivnost askorbat peroksidaze</b> .....	29
<b>4.5. Aktivnost superoksid dismutaze</b> .....	30
<b>4.6. Stupanj lipidne peroksidacije</b> .....	31
<b>4.7. Količina vodikovog peroksida</b> .....	32
<b>4.8. Koncentracija ukupnih fenola</b> .....	33
<b>4.9. Stopa oksidacije fenola</b> .....	34
<b>4.10. Udio pigmenata u tkivu</b> .....	35
<b>4.11. Fluorescencija klorofila <i>in vivo</i></b> .....	36
4.11.1. Maksimalni prinos fotosistema II .....	36
4.11.2. Efektivni prinos fotosistema II ( $\Phi_{PSII}$ ) .....	37
4.11.3. Fotokemijsko gašenje fluorescencije (qP).....	38
4.11.4. Nefotokemijsko gašenje fluorescencije (NPQ) .....	39
<b>4.12. Propusnost plazmatske membrane</b> .....	40
<b>5. RASPRAVA</b> .....	41
<b>6. ZAKLJUČAK</b> .....	48
<b>7. ZAHVALE</b> .....	49
<b>8. POPIS LITERATURE</b> .....	50
<b>9. SAŽETAK</b> .....	61
<b>10. SUMMARY</b> .....	62

## POPIS KRATICA

- APX – askorbat peroksidaza
- BSA – albumin iz goveđeg seruma
- CAT – katalaza
- CBB – boja Coomassie Brilliant Blue
- $\epsilon$  – molarni apsorpcijski koeficijent
- EDTA – etilendiamintetraoctena kiselina
- FCR – Folin–Ciocalteu reagens
- $F_v$  – varijabilna fluorescencija
- $F_0$  – minimalna vrijednost fluorescencije
- $F_m$  – maksimalna vrijednost fluorescencije
- $F'_m$  – vrijednost maksimalne fluorescencije na svjetlosti
- $F_s$  – fluorescencija ravnotežnog stanja
- $g$  – relativna centrifugalna sila
- GPOD – gvajakol peroksidaza
- JA – jasmonska kiselina
- K – kontrolna grupa biljaka
- $l$  – duljina optičkog puta (duljina kivete)
- LED – svjetleća dioda
- $L_0$  – električna provodljivost otopine nakon autoklaviranja
- $L_t$  – električna provodljivost otopine nakon 24 h inkubacije
- MDA – malondialdehid
- MS1h – tkivo listova biljaka 1 h nakon izlaganja mehaničkom stresu
- MS20h – tkivo listova biljaka 20 h nakon izlaganja mehaničkom stresu
- MSso – listovi biljaka koji su uzeti za analizu s ciljem određivanja sistemskog odgovora
- NBT – nitro-plavi tetrazolijski klorid
- PPO – polifenol oksidaza
- PSII – fotosistem II
- PVPP – polivinilpolipirolidon
- PVP-40 – polivinilpirolidon relativne molekularne mase 40 000
- RCF – relativna centrifugalna sila
- ROS – reaktivne kisikove vrste
- SOD – superoksid dismutaza

su.t. – suho tkivo

sv.t. – svježe tkivo

TBA – tiobarbituratna kiselina

TCA – trikloroctena kiselina

NPQ – nefotokemijsko gašenje fluorescencije

qP – fotokemijsko gašenje fluorescencije

XOD – ksantin oksidaza

$\Phi_{\text{PSII}}$  –efektivna učinkovitost PSII

## **1. UVOD**

### **1.1. Značaj istraživanja odgovora biljaka na stresne uvjete**

Ubrzani porast svjetske populacije, klimatske promjene te potrošnja prirodnih resursa predstavljaju ozbiljan globalni problem jer utječu na poljoprivrednu proizvodnju čija je uloga osigurati prehranu stanovništva. Zbog nedostatne proizvodnje u odnosu na potrošnju hrana postepeno postaje ograničavajućim resursom te prioritetnim izazovom za znanost. Prehrana sve većeg broja ljudi, potreba pravilnog i održivog raspolaganja dostupnim resursima te potraga za alternativnim načinima proizvodnje postat će središnja okosnica istraživanja na području agronomije, biljne biologije te biotehnologije. Razumijevanje mehanizama odgovora biljaka na različite stresne uvjete nužno je kako bismo osigurali opskrbu hranom i razvili visoko otporne biljne vrste (Freeman i Beattie, 2008).

### **1.2. Biotički i abiotički stresni uvjeti**

U prirodnim uvjetima, kao i pri uzgoju na poljoprivrednim površinama, biljke su tijekom svog životnog ciklusa izložene promjenjivim okolišnim uvjetima koji mogu na različite načine djelovati na njihov rast, razvoj i produktivnost. Posljedice takvih uvjeta su promjene u fiziološkim i biokemijskim procesima koje se često manifestiraju kao promjene morfologije te prinosa (Taiz i Zeiger, 2006).

Stresni uvjeti mogu se podijeliti na biotičke i abiotičke, ali i antropogene koji nastaju pod utjecajem čovjeka. Biotički stresni uvjeti obuhvaćaju kompeticiju s drugim organizmima, napad herbivora te infekcije patogenima poput bakterija, gljivica, virusa i oblića (Suzuki i sur., 2014). Abiotički stresni uvjeti obuhvaćaju neposredan ili posredan utjecaj neživog okoliša na organizam te uključuju sušu, povišenu temperaturu, hladnoću, suvišak ili manjak hranjivih tvari, nedostatak kisika (hipoksiju ili anoksiju) u području korijena, ultraljubičasto zračenje i onečišćenje tla i atmosfere (Taiz i Zeiger, 2006; Freeman i Beattie, 2008). Osim navedenih tzv. primarnih stresnih faktora postoje i sekundarni koji nastaju kao posljedica djelovanja primarnih. Primjerice, njima pripada oksidacijski stres, koji je rezultat djelovanja primarnih faktora poput ekstremnih temperatura, suše, napada patogena, te osmotski stres, koji je rezultat djelovanja suše, povećane koncentracije soli u tlu te visoke i niske temperature (Zhu, 2016).

Svaki od navedenih stresnih uvjeta u biljkama uzrokuje zapanjujući niz mehanizama odgovora i obrane koji su regulirani aktivacijom raznih signalnih puteva i fitohormona (Suzuki i sur., 2014; Fujita i sur., 2006). Stanični, molekularni i biokemijski odgovori, a ponekad i promjena morfologije koja prati percepciju stresnih signala, često dovode do indukcije sofisticiranih mehanizama prilagodbe na nepovoljne okolišne uvjete (Taiz i Zeiger, 2006; Benikhlef i sur., 2013). Otpornost na određeni stres biljke mogu steći na dva načina – adaptacijom ili aklimatizacijom. Za razliku od adaptacije, koja je genetski stupanj otpornosti na stres stečen selekcijom tijekom evolucijskog vremena, aklimatizacija predstavlja razvijanje tolerancije na stres, uslijed prethodnog izlaganja stresnom faktoru, tijekom životnog vijeka biljke (Taiz i Zeiger, 2006). Pritom se očituje kao niz različitih strukturnih, ali i molekularnih, biokemijskih i fizioloških promjena koje su specifične za pojedine tipove okolišnih faktora (Read i Stokes, 2006; Taiz i Zeiger, 2006; Benikhlef i sur., 2013).

### **1.3. Mehanički stres**

Mehanički stres pojavljuje se kao prirodna posljedica nepovoljnih okolišnih uvjeta, a može biti uzrokovan biotičkim i abiotičkim čimbenicima. Ekstremne vremenske pojave, poput mraza, tuče, poplava, jakih i olujnih vjetrova, u posljednje su vrijeme sve češća pojava koja uzrokuje znatne štete u poljoprivrednim kulturama. Osim mehaničkog stresa uzrokovanog klimatskim nepogodama bitno je spomenuti stres nastao djelovanjem ljudi i životinja. Širok raspon mehaničkih podražaja koji uključuje gaženje, savijanje, pomicanje pojedinih dijelova biljke, međusobni kontakt i trljanje može utjecati na rast i razvoj drveća i trava, ali i agronomski važnih usjeva (Read i Stokes, 2006; Iida, 2014).

Međutim, spomenuti biotički i abiotički čimbenici koji uzrokuju mehanički stres u nekim slučajevima mogu biti agronomski povoljni faktori, ukoliko se od posljedica njihova djelovanja biljka može oporaviti. Naime, Iida je 2014. godine preveo i objavio dostupna saznanja o dotad, ostatku svijeta, nepoznatoj metodi. Radi se o japanskoj praksi zvanoj „Mugifumi” pomoću koje je moguće ostvariti veći prinos usjeva pšenice i ječma izazivajući mehanički stres gaženjem i gnječenjem biljaka. Razlog zbog kojeg ova metoda nije široko poznata i primjenjivana leži u nedostatku dostupnih zapisa na engleskom jeziku. Praksu gaženja japanski poljoprivrednici provodili su stoljećima tijekom zimskih mjeseci na sadnicama pšenice i ječma posijanih u jesen. Prema sveobuhvatnom, narativnom vodiču napisanom u 17. stoljeću farmeri su, u Japanu, već tada imali empirijski stečena znanja o poželjnim karakteristikama biljaka koje nastaju kao odgovor na



ovakvu vrstu stresa. Neke od uočenih morfoloških prilagodba jesu ojačani korijen te njegov posljedični intenzivniji rast i širenje, smanjena duljina stabljike te veći prinos usjeva (Iida, 2014; Tomas-Grau i sur., 2017).

Postoje i druga istraživanja koja govore o učinku izlaganja biljaka mehaničkom stresu. Primjerice, u kasnijim su istraživanjima zamijećene još neke morfološke promjene, kao što je povećana fleksibilnost stabljike i drugih organa te manja visina stabljike, listova i peteljki, što rezultira biljkama nižeg rasta i kompaktnije građe (Biddington, 1986; Read i Stokes, 2006). Također, brojna istraživanja upućuju na povezanost mehaničkog stresa s razvojem otpornosti na brojne stresne uvjete uključujući i opetovano djelovanje mehaničkog stresa. Tako stabla izložena djelovanju vjetra postaju otpornija na daljnje izlaganje snažnim navalama vjetra u usporedbi sa zaklonjenim stablima, koja su u pravilu krhka i lako lomljiva. Laboratorijska istraživanja pokazala su da izlaganje mehaničkom stresu djeluje na biomehanička svojstva omogućujući elastičnost i čvrstoću prilikom istezanja i savijanja (Jaffe i Forbes, 1993). Štoviše, na grahu je prikazana povezanost mehaničkog stresa s razvojem otpornosti na sušu i mraz, dok je na soji ustanovljena povećana otpornost na mraz nakon mehaničkog stresa izazvanog trljanjem (Jaffe i Forbes, 1993). Biljke imaju sposobnost osjeta ne samo jakih mehaničkih podražaja, poput onih uzrokovanih vjetrom, već i podražaja niskog intenziteta, poput onih uzrokovanih međusobnim dodirivanjem, trljanjem te ostalim oblicima blagih kratkotrajnih podražaja (Tomas-Grau i sur., 2017). Odgovor na blage mehaničke podražaje također dovodi do pokretanja obrambenih odgovora biljaka spregom biokemijskih, fizioloških i morfoloških reakcija. Primjerice, istraživanjem na modelnoj biljci *Arabidopsis thaliana* izazvana je jaka i prolazna imunost na sivu plijesan (*Botrytis cinerea* Pers.) uslijed djelovanja blagog mehaničkog stresa (Benikhlef i sur., 2013).

## **1.5. Sistemski odgovor u biljaka**

Sposobnost preživljavanja nepovoljnih okolišnih uvjeta ovisi o učinkovitim obrambenim mehanizmima i signalnim putevima koji dovode do povećanja tolerancije na stres (Huber i Bauerle, 2016). Pojam sistemske signalizacije su uveli T. R. Green i C.A. Ryan (1972) s revolucionarnom otkrićem *de novo* sinteze obrambenih proteinaznih inhibitora u rajčice ne samo na mjestima ozljede već i na razini cijele biljke nakon lokaliziranog napada Colorado krumpirove zlatice (*Leptinotarsa decemlineata*). Kao zaštitu od nepovoljnog učinka opetovanog izlaganja sličnim biotičkim ili abiotičkim stresnim uvjetima biljke posjeduju sistemske signalne mreže koje omogućavaju da se

percepcija lokalnih stresnih signala razvije u otpornost na razini cijele biljke (Schilmiller i Howe, 2005; Hilleary i Gilroy, 2018). Takva sistemski stečena rezistencija najčešće nastaje uslijed izlaganja biljaka biotičkom stresu, odnosno mehaničkom stresu koji je posljedica napada štetnika i biljojeda (Heil i Bostock, 2002). U složenim signalnim procesima, koji dovode do promjene ekspresije gena, sudjeluju mnogi hormoni i sekundarni glasnici od kojih su najznačajniji abscizinska kiselina, jasmonska kiselina, salicilna kiselina i etilen te kalcij (Buchanan i sur., 2015). Mehanizam širenja signala u neoštećeno tkivo, kao i aktivacija sistemske rezistencije, jedna su od glavnih okosnica istraživanja u razumijevanju obrambenih odgovora na stres (Schilmiller i Howe, 2005).

## **1.6. Parametri stresa u biljkama**

Tijekom razvoja biljke su izložene raznim stresnim uvjetima koji utječu na osnovni metabolizam biljaka. (Bartwal i sur., 2012). Za smanjenje učinka stresnih uvjeta biljke posjeduju niz složenih mehanizama zaštite koji se temelje na promjeni ekspresije gena, dinamike odvijanja metaboličkih reakcija i fizioloških procesa. Fiziološke i molekularne promjene do kojih dolazi prilikom izlaganja stresu uključuju promjenu membranske fluidnosti i sastava membranskih lipida, koncentracije otopljenih tvari, metabolizma ugljikohidrata, fotosintetske aktivnosti i još brojne druge (Chaves i sur., 2003). Međutim, veoma je malo staničnih odgovora koji su specifični za pojedinu vrstu stresa. Većina stresnih uvjeta izaziva univerzalne odgovore kao što je proizvodnja prekomjerne količine reaktivnih kisikovih vrsta (ROS, engl. *reactive oxygen species*) te pojačana aktivnost enzimatskog i neenzimatskog antioksidativnog sustava (Bartwal i sur., 2012). Pritom se razina oksidacijskog stresa najčešće mjeri detekcijom pojedinih ROS-a poput vodikovog peroksida, dok se antioksidacijski status biljke određuje mjerenjem aktivnosti antioksidativnih enzima poput katalaze, peroksidaze, superoksid dismutaze te koncentracije neenzimatskih antioksidansa poput askorbata, glutationa, fenola i karotenoida. Međutim, složena mreža staničnih odgovora koja nastaje uslijed akumulacije ROS-a otežava detekciju odgovora na stres, odnosno razlikovanje uzročno-posljedičnih veza. Stoga se za procjenu stresa mjere i drugi parametri. Jedan od primarnih staničnih odgovora do kojeg dolazi uslijed izlaganja uvjetima manjka vode i povišenog saliniteta jest biosinteza niskomolekularnih organskih tvari – kompatibilnih osmolita poput prolina, glicin-betaina i šećernih alkohola (poliola). Koncentracija se ovih osmolita, kao i drugih metabolita poput pigmentata i fenola, koristi za procjenu antioksidacijskog potencijala biljke (Farooq i sur., 2009; Bartwal i sur., 2012). Razvijanje tolerancije na stres također je povezano i sa sintezom poliamina,

među kojima se nalaze spermidin i spermin kao bitni indikatori otpornosti na uvjete manjka vode, povišen salinitet i nižu temperaturu (Li i Chen, 2000). Fluorescencija klorofila *in vivo* predstavlja još jednu čestu tehniku za neinvazivno praćenje učinaka stresa proučavanjem promjene fotosintetske aktivnosti fotosistema II (PSII) (Lukaszuk i sur., 2016). Vrlo je pogodan alat za rano otkrivanje stresa u biljkama, kao i za proučavanje procesa oporavka nakon uklanjanja stresnog faktora (Lichtenthaler, 1988).

### 1.6.1. Oksidacijski stres

Oksidacijski stres pojava je pojačanog nakupljanja ROS-a kao odgovora na različite biotičke i abiotičke okolišne uvjete (Gill i Tuteja, 2010). U biološkim sustavima postoji veliki broj različitih vrsta ROS-a, među kojima najbitniju ulogu u oksidacijskom stresu imaju singletni kisik ( $^1\text{O}_2$ ), superoksidni radikal ( $\text{O}_2^-$ ), vodikov peroksid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) i hidroksilni radikal ( $^*\text{OH}$ ) (Choudhury i sur., 2017).

U biljnim stanicama ROS nastaju kontinuirano kao nusprodukti različitih metaboličkih puteva poput fotosinteze i staničnog disanja (Choudhury i sur., 2017). Glavna mjesta nastanka ROS-a u biljnoj stanici jesu kloroplasti, mitohondriji i peroksisomi. ROS se, u normalnim uvjetima, nalaze u niskim koncentracijama pri kojima imaju bitnu ulogu kao signalne molekule u aktiviranju daljnje biljne zaštite (Demidchik, 2015; Choudhury i sur., 2017), dok pri višim koncentracijama služe kao indikatori različitih stresnih čimbenika uključujući i mehanički stres (Mittler, 2002; Apel i Hirt, 2004; Choudhury i sur., 2017). Pretjerana akumulacija ROS-a može biti posljedica promjena u normalnoj biljnoj fiziologiji koje dovode do poremećaja normalnog oksidativno-redukcijskog stanja stanice (Demidchik, 2015; Choudhury i sur., 2017).

Kao što je ranije napomenuto, iako su ROS najpoznatije po oštećenjima koja uzrokuju u stanici, imaju i brojne pozitivne uloge (Mittler, 2002; Choudhury i sur., 2017; Foyer, Ruban i Noctor, 2017). Jedna od njih je uloga ROS-a u prijenosu signala koji se javlja kao odgovor na stresne uvjete i koji često dovodi do aklimatizacije biljke (Dowling i Simmons, 2009; Miller i sur., 2009; Foyer, Ruban i Noctor, 2017). Signalne ROS često mijenjaju redoks-status regulatornih proteina kao što su transkripcijski faktori, pa time i ekspresiju određenih gena, najčešće onih koji kodiraju za receptorske kinaze, aneksin i proteine vezane uz biogenezu peroksisoma (Apel i Hirt, 2004). Desikan i suradnici (2001) su analizom transkriptoma biljke *Arabidopsis thaliana* nakon tretmana vodikovim peroksidom dokazali promjenu ekspresije 175 gena od kojih je većina imala signalnu funkciju, a manji broj gena antioksidacijsku funkciju. Za aklimatizaciju je, uz opisanu ulogu ROS

u prijenosu signala, bitno da također stupaju u interakciju s hormonima stresa koji su izrazito bitni u aklimatizaciji biljke na abiotičke stresne faktore (Choudhury i sur., 2017; Foyer, Ruban i Noctor, 2017).

#### 1.6.1.1. Posljedice oksidacijskog stresa u biljnoj stanici

Zajedničko svojstvo svih ROS-a jest sposobnost stvaranja ireverzibilnih i reverzibilnih oksidacijskih oštećenja makromolekula, kao što su oštećenja nukleinskih kiselina, proteina i lipida, koja dovode do narušavanja njihove funkcije (Mittler, 2002; Choudhury i sur., 2017; Foyer i sur., 2017). Oksidacija proteina najčešće utječe na strukturu molekule, što posljedično dovodi do gubitka metaboličke, transportne i regulatorne funkcije (Demidchik, 2015). Tako oksidacijski stres uzrokuje promjene u metaboličkim reakcijama, ali i promjene na razini transkripcije i translacije (Choudhury i sur., 2017). Osim što su vrlo reaktivni, a samim time i toksični, za detoksikaciju ROS potrebno je utrošiti velike količine energije, što dovodi do smanjenja energetske zaliha organizma čineći ga manje otpornim na stres (Choudhury i sur., 2017). Krajnji učinak oksidativnog stresa ovisi o nizu faktora, među kojima su količina i kemijska priroda nastalih ROS-a (Dowling i Simmons, 2009; Foyer, Ruban i Noctor, 2017), vrsta biljke, vrsta i jačina stresa (Choudhury i sur., 2017), razvojni stadij te lokalizacija unutar stanice (Noctor, Lelarge-Trouverie i Mhamdi, 2015).

#### Vodikov peroksid

Vodikov peroksid jedan je od glavnih kisikovih spojeva koji nastaje u biljkama tijekom oksidativnog stresa. Relativne je stabilnosti i dugog životnog vijeka (Demidchik, 2015). Također je i prirodni produkt metabolizma biljaka koji nastaje u neenzimskim i enzimskim reakcijama u različitim staničnim odjeljcima (del Río i sur., 1992). Glavni štetni učinci vodikovog peroksida očituju se u poticanju lipidne peroksidacije i inaktivaciji enzima. Oksidacija tiolne (-SH) skupine, koja potječe od aminokiseline cisteina, uzrokuje promjenu rasporeda disulfidnih veza, što posljedično dovodi do modifikacije i promjene same funkcije proteina, poput vezanja na molekulu DNA (Apel i Hirt, 2004; Choudhury i sur., 2017). Također, dovodi do stvaranja visokoreaktivnog i toksičnog hidroksilnog radikala u prisutnosti prijelaznih metala, u tzv. Haber-Weiss i Fentonovim reakcijama (Hasanuzzaman i sur., 2013).

#### Lipidna peroksidacija

Lipidna peroksidacija, odnosno peroksidacija masnih kiselina kojom nastaju molekule poput malondialdehida (MDA), česti je marker oksidacijskog stresa (Demidchik, 2015; Noctor, Lelarge-

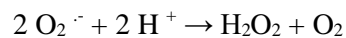
Trouverie i Mhamdi, 2015). Predstavlja sekundarnu reakciju na stres izazvanu primarnim proizvodima stresa, odnosno ROS (Blokina i sur. 2003). Proces lipidne peroksidacije odvija se u tri faze: inicijacija, propagacija i terminacija (Catalá, 2006). Započinje uklanjanjem vodikovog atoma iz lipidne molekule uz pomoć hidroksilnog, alkoksilnog ili peroksilnog radikala čime nastaje lipidni radikal koji može aktivirati molekulu kisika koja nastavlja proces oksidacije lipida. Posljedice lipidne peroksidacije jesu jaka oštećenja staničnih membrana, gubitak njihove funkcije kao barijere i dezintegracija organela (Demidchik, 2015).

#### 1.6.1.2. Antioksidacijski status biljke

Kao što je već spomenuto, ROS su neizbježni produkti aerobnog metabolizma (Choudhury i sur., 2017). Budući da su biljke evoluirale uz njihovu prisutnost, razvile su i brojne prilagodbe na njihove toksične učinke (Kliebenstein i sur., 1998; Demidchik, 2015). U obrani od oksidacijskog stresa sudjeluju različiti enzimatski i neenzimatski antioksidacijski mehanizmi (Dowling i Simmons, 2009; Caverzan i sur., 2012; Choudhury i sur., 2017) koji su često vezani uz pojedine stanične odjeljke (Apel i Hirt, 2004), a identificirani su u mitohondrijima, kloroplastima, peroksisomima i citosolu (Mittler, 2002). Bitni su antioksidacijski enzimi superoksid dismutaza, katalaza, i peroksidaze (Mittler, 2002; Apel i Hirt, 2004; Caverzan i sur., 2012; Demidchik, 2015). Glavna zadaća antioksidacijskog sustava jest održati ravnotežu nastajanja i razgradnje superoksidnog iona, vodikovog peroksida i hidroksilnog radikala (Apel i Hirt, 2004).

#### Superoksid dismutaza

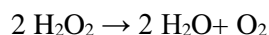
Superoksid dismutaza (SOD) glavni je antioksidacijski enzim za uklanjanje superoksidnog radikala u kloroplastima te se smatra prvom linijom obrane od oksidacijskog stresa (Alscher i sur., 2002; Mittler, 2002; Dowling i Simmons, 2009). SOD katalizira reakciju disproporcioniranja superoksidnog radikala na molekularni kisik i vodikov peroksid na sljedeći način (Kliebenstein i sur., 1998; Corpas i sur., 2017):



Superoksid dismutaze mogu kao metalni kofaktor koristiti ion željeza, mangana te bakra i cinka, pa se prema tome razlikuju i tri izoenzima SOD koji su locirani u različitim staničnim organelima (Kliebenstein i sur., 1998; Alscher i sur., 2002). Budući da su fosfolipidne membrane nepropusne za nabijene superoksidne molekule, važno je da se superoksid dismutaze nalaze u svim odjeljcima u kojima superoksid nastaje kako bi ga mogle razgraditi (Takahashi i Asada, 1983).

## Katalaza

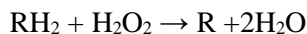
Katalaza (CAT) je široko rasprostranjen enzim koji predstavlja dio antioksidacijske zaštite stanice (Anjum i sur., 2016). Nalazi se u mitohondrijima, peroksisomima i citoplazmi viših biljaka, a služi za razlaganje vodikovog peroksida koji nastaje tijekom transporta elektrona u lancu prijenosa elektrona u mitohondriju,  $\beta$ -oksidacije masnih kiselina te tijekom fotorespiracije (Arora i sur., 2002; Mafakheri i sur., 2011). Katalizira razgradnju  $H_2O_2$  pri čemu nastaje voda i kisik (Willekens i sur., 1995) prema jednadžbi:



Mnoga su istraživanja pokazala da izlaganje biljaka stresnim uvjetima dovodi do porasta aktivnosti katalaze što posljedično sprečava narušavanje membranskog integriteta i oksidaciju nukleinskih kiselina, proteina i lipida (Arora i sur., 2002; Mafakheri i sur., 2011). Iako ima visoku katalitičku učinkovitost, ima izrazito nizak afinitet prema supstratu (Willekens i sur., 1995).

## Peroksidaza

Peroksidaze, u koje se ubrajaju askorbat (APX, *engl. ascorbate peroxidase*) i gvajakol peroksidaza (GPOD, *engl. guaiacol peroxidase*), su glikoproteini, koji poput katalaze imaju bitnu ulogu u detoksifikaciji vodikovog peroksida (Tayefi-Nasrabadi i sur., 2011; Erofeeva, 2015). Smatra se da su u kompeticiji s katalazom budući da koriste isti supstrat. Međutim, CAT je aktivna samo pri relativno visokim koncentracijama  $H_2O_2$ , dok se niže koncentracije  $H_2O_2$  uklanjaju pomoću gvajakol peroksidaze zbog većeg afiniteta za  $H_2O_2$  (Gadjev i sur, 2008). Također, zbog prisutnosti na različitim mjestima unutar stanice peroksidaze uklanjaju i onaj  $H_2O_2$  koji je CAT nedostupan (Van Breusegem i sur, 2001). Za redukciju  $H_2O_2$ , peroksidaze koriste organski supstrat, poput askorbata, kao donor elektrona prema jednadžbi (Asada, 1992):



Askorbat peroksidaza se primarno nalazi u kloroplastima, ali i u citosolu, mitohondrijima i peroksisomima (Caverzan i sur., 2012; Anjum i sur., 2016). Djelovanje APX-a temelji se na redukciji vodikova peroksida do vode oksidacijom dviju molekula askorbata do monodehidroaskorbata koji se mogu regenerirati preko monodehidroaskorbat reduktaze (Uarrotta i sur., 2016). Gvajakol peroksidaza kao reducirajuće sredstvo preferira aromatske donore elektrona

poput gvajakola (Tayefi-Nasrabadi i sur., 2011; Erofeeva, 2015). GPOD je smješten u apoplastima, citoplazmi, vakuoli i staničnoj stijenci (Tayefi-Nasrabadi i sur., 2011; Uarrota i sur., 2016).

## Fenoli

Fenoli su sekundarni biljni metaboliti koji obuhvaćaju veliki broj spojeva raznolikih funkcija. Postoji oko 8000 prirodno prisutnih biljnih fenola od kojih polovicu čine flavonoidi, a osim njih u fenole se ubrajaju i fenolne kiseline, tanini i drugi spojevi (Sulaiman i Balachandran, 2012). Zajednička karakteristika svih fenola je hidroksilna skupina na aromatskom prstenu (Budet, 2007). Neki fenolni spojevi djeluju u sklopu neenzimatskog antioksidativnog sustava, zajedno s askorbatom, glutationom, tokoferolom i karotenoidima (Apel i Hirt, 2004). Antocijanini, koji pripadaju klasi flavonoida, su jedna od glavnih skupina prirodnih pigmenta koja posjeduje antioksidacijsku aktivnost (Kim i sur., 2007). Antioksidacijska sposobnost fenola dolazi od visoke tendencije da vežu metalne ione u obliku helata i posljedično ih inaktiviraju, posebice željezo i bakar. Na taj način sprječavaju odvijanje Fentonovih reakcija kojima nastaje izrazito toksičan hidroksilni radikal. Osim toga, fenoli mogu smanjiti lipidnu peroksidaciju reakcijom s alkoksilnim lipidnim radikalom (Michalak, 2006) ili smanjenjem membranske fluidnosti čime ometaju prijenos slobodnih radikala (Arora i sur., 2000).

## Oksidacija fenola

U većini biljaka polifenol oksidaza (PPO, engl. *polyphenol oxidase*) je široko rasprostranjen metaloenzim koji katalizira oksidaciju fenola, odnosno monofenola i o-difenola u visoko reaktivne o-kinone. Budući da se reakcija odvija u prisutnosti kisika, polifenol oksidaza posredno utječe na razinu kisika i ROS-a u stanici (Boeckx i sur., 2015a; Tran i sur., 2012). Odgovor enzima na okolišne faktore i njegova ciljana lokalizacija upućuju na ulogu u aklimatizaciji ili kratkoročnom odgovoru na stres (Boeckx et al., 2015b). Budući da se enzimi PPO uglavnom nalaze u kloroplastima, a fenoli u vakuoli, njihova interakcija zahtjeva uništenje staničnih organela, do kojeg dolazi uslijed ranjavanja tkiva. Stoga je aktivnost enzima PPO najčešće povezana s obrambenim mehanizmima biljaka protiv patogena i insekata (Abdi i sur, 2017; Boeckx et al., 2015a). Međutim, njegova je uloga u većini biljaka još nepoznata te je predmetom mnogih istraživanja. Zanimljivo je da, unatoč opsežnim pretraživanjima, u genomima biljaka *Arabidopsis thaliana* i *A. lyrata* nisu otkriveni geni za PPO niti sekvence koje su slične genima za PPO (Tran i sur., 2012). Iako iznenađujući, ovaj rezultat je u skladu s ranijim istraživanjem genoma *A. thaliana*, u kojem se također nije uspio identificirati gen za PPO (Arabidopsis Genome Initiative, 2000). Nedostatak tog

gena u biljci *Arabidopsis* sugerira da vjerojatno nije potreban za primarnu već za ekološku ili sekundarnu metaboličku funkciju. Također, moguće je da nedostatak njegove funkciju u uročnjaku nadoknađuju drugi oksidativni enzimi kao što su lakaze. U genomu biljke *Arabidopsis* pronađeno je 17 gena za enzim lakazu, te je pokazano da usprkos različitim strukturama, lakaze i PPO provode sličnu funkciju (Tran i sur., 2012).

### 1.6.2. Fotosintetski pigmenti

Fotosintetski pigmenti u biljaka su klorofil *a*, klorofil *b* i karotenoidi koji se dijele na karotene i ksantofile. Klorofil su ključni pigmenti u procesu fotosinteze, čija je razina u nepovoljnim uvjetima dobar pokazatelj fotosintetske aktivnosti (Xu i sur., 2008). Pritom, najveće značenje ima klorofil *a* jer jedino on može sudjelovati u reakciji razdvajanja naboja u reakcijskom središtu fotosistema. No, za efektivno odvijanje fotosinteze značajni su i klorofil *b* i karotenoidi koje nazivamo pomoćnim pigmentima jer mogu apsorbirati svjetlost i prenositi energiju na klorofil *a* (Armstrong i Hearst, 1996). Karotenoidi su po svojoj građi terpeni koji sadrže konjugirane dvostruke veze što im omogućava apsorpciju svjetlosti u širokom rasponu valnih duljina od 450 do 570 nm, unutar plavog dijela spektra. Vidljivi su kao žuti, narančasti ili crveni lipofilni pigmenti u cvjetovima, plodovima i gomoljima biljaka te listovima tijekom razgradnje klorofila u jesen (Havaux, 2013). Osim uloge pomoćnih pigmenata u fotosintezi sudjeluju i u zaštiti od fotooksidacijskog stresa inaktivacijom ROS-a čime pružanju zaštitu od lipidne peroksidacije (Lim i sur., 1992; Johnson i sur., 2007) i stabiliziraju lipidnu membranu (Havaux, 1998). Aluru i suradnici (2009) su dokazali da su fotosintetski organizmi s nedostatkom karotenoida jako fotoosjetljivi, podložni oštećenju fotosustava te mutagenezi uslijed prekomjerne proizvodnje singletnog kisika ( $^1\text{O}_2$ ).

### 1.6.3. Fluorescencija klorofila

Mjerenje fluorescencije klorofila *in vivo* jedna je od najčešće korištenih metoda u istraživanju učinaka stresnih uvjeta na učinkovitost fotosinteze i na prilagodbu tijekom dužeg izlaganja stresnim uvjetima. U ovom je istraživanju korištena metoda saturacijskog pulsa koja omogućava mjerenje fluorescencije klorofila u intaktnim organima biljaka (Maxwell i Johnson, 2000). U optimalnim okolišnim uvjetima većina se apsorbirane svjetlosne energije koristi za proces fotosinteze, odnosno prijenos energije u antenama fotosistema i pokretanje lanca prijenosa elektrona. Mali dio energije se gubi u obliku topline i fluorescencije. U stresnim uvjetima povećava se udio energije koji se gubi u obliku topline i svjetlosti (fluorescencije). Stoga se mjerenjem fluorescencije može procijeniti učinkovitost fotosinteze. Budući da se spektar emitirane svjetlosti koja potječe od fluorescencije



klorofila razlikuje od spektra apsorbirane svjetlosti, moguće ju je detektirati pomoću fluorimetra. Naime, energija koja se oslobađa pri fluorescenciji u crvenom je dijelu spektra i veće je valne duljine od apsorbirane svjetlosti (Roger i Weiss 2001).

#### 1.6.4. Oslobađanje elektrolita iz biljnog tkiva

Cjelovitost i stabilnost stanične membrane presudni su za normalno funkcioniranje stanice, a često je upravo membrana prva „meta“ brojnih nepovoljnih stresnih uvjeta. Prilikom oštećenja stanica narušava se integritet staničnih membrana, što dovodi do propuštanja elektrolita iz stanica. Mjerenjem provodljivosti otopine u kojoj se inkubira biljno tkivo prethodno izloženo stresnim uvjetima, može se procijeniti količina propuštenih elektrolita (Bajji i sur, 2001; Lutts, 1996). Tako se na jednostavan način može procijeniti razina učinka biotičkog ili abiotičkog stresnog čimbenika (Hatsugai i Katagiri, 2018).

### 1.7. Vrsta *Arabidopsis thaliana* kao modelni organizam

Uročnjak *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. jednogodišnja je zeljasta biljka porijeklom iz centralne Azije, široke geografske rasprostranjenosti u Europi, Aziji te Sjevernoj Americi (Meinke, 1998; Weigel i Mott, 2009). Pripada porodici krstašica ili kupusnjača (Brassicaceae) koja obuhvaća mnoge ekonomski značajne vrste poput brokule, kupusa, kelja, cvjetače, korabice, rotkvice i brojne druge. Friedrich Laibach je davne 1943. godine prvi istaknuo potencijal biljke *Arabidopsis thaliana* kao modelne biljke za genetička istraživanja (Koornneef i Meinke, 2010). Jednostavan uzgoj, kratki životni ciklus, samooplodnja, jednostavna genetička manipulacija te relativno mali genom, samo su neke prednosti koje čine ovu biljnu vrstu idealnim te najpoznatijim biljnim modelnim organizmom u području genetike, molekularne te razvojne biologije (Mitchell-Olds, 2001). Haploidni genom veličine 125 do 150 Mb sadržan je u pet kromosoma, obuhvaća oko 28 000 gena i u potpunosti je sekvencioniran (Serino i Marzi, 2018). Postoje brojni ekotipovi iz prirodnih populacija koji služe za genetičke i molekularne analize, od kojih se ekotip Columbia (Col) općenito koristi kao referentni genotip (Meinke, 1998; Koornneef i Meinke, 2010). Većina ekotipova korištenih u istraživanju, procvjeta u kontroliranim uvjetima nakon 4-5 tjedana. Uzgajaju se u zemlji u uvjetima dugog dana (16 sati svjetla i 8 sati tame) pri temperaturi uzgoja od 23 °C. Optimalni intenzitet svjetlosti iznosi 120 – 150  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ , dok je optimalna vlažnost za rast biljke između 50 i 60% (Rivero i sur., 2013).

Za svoje smo istraživanje izabrale upravo ovu vrstu zbog dva osnovna razloga. Naime, iako nije agronomski značajna vrsta, predstavlja pogodan modelni organizam i referentni sustav zahvaljujući mogućoj ekstrapolaciji dobivenih rezultata na brojne srodne povrtne vrste visoke prehrambene vrijednosti. Također, budući da je temeljito opisana i široko korištena, istraživanjima na toj biljnoj vrsti u području genetike, fiziologije i metabolizma polažu se temelji za istraživanje biologije svih drugih biljnih vrsta.

## 2. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA

Istraživanja odgovora na biotičke i abiotičke stresne uvjete značajno pridonose ukupnom poznavanju fizioloških i biokemijskih procesa te mehanizama prilagodbe u biljaka. U odnosu na druge stresne uvjete koji su bili predmet opsežnih istraživanja, postojeći podaci o učincima mehaničkog stresa na biljke su malobrojni. Stoga je opća svrha ovog istraživanja bila doprinijeti boljem razumijevanju odgovora biljke *Arabidopsis thaliana* na mehanički stres, koji značajno utječu na poljoprivrednu proizvodnju.

Specifični ciljevi rada su sljedeći:

1. procijeniti učinak mehaničkog stresa na pojavu oksidacijskog stresa mjerenjem koncentracije vodikovog peroksida i određivanjem stupnja lipidne peroksidacije
2. odrediti učinak mehaničkog stresa na aktivaciju obrambenih antioksidacijskih mehanizama mjerenjem koncentracije fenola te određivanjem aktivnosti antioksidacijskih enzima katalaze, peroksidaze i superoksid dismutaze
3. odrediti učinak mehaničkog stresa na oksidaciju fenola
4. odrediti učinak mehaničkog stresa na količinu fotosintetskih pigmenta
5. odrediti učinak mehaničkog stresa na učinkovitost fotosinteze mjerenjem fluorescencije klorofila *in vivo*
6. procijeniti učinak mehaničkog stresa na integritet stanične membrane

U našem istraživanju koristile smo tri grupe biljaka: biljke koje nisu bile izlagane mehaničkom stresu te predstavljaju kontrolnu grupu (K), biljke čiji su listovi analizirani 1 h nakon izlaganja mehaničkom stresu (MS1h) i biljke čiji su listovi analizirani 20 h nakon izlaganja mehaničkom stresu (MS20h). Kod MS20h biljaka također je analizirano netretirano tkivo listova s ciljem procjene sistemskog odgovora biljaka. Cilj je istraživanja bila međusobna usporedba odgovora biljaka na stres u svrhu boljeg razumijevanja; (1) indukcije obrambenih mehanizama uslijed izlaganju kratkotrajnom mehaničkom podražaju slabe jakosti, (2) oporavka biljke 20 h nakon izlaganja stresnom faktoru te (3) efikasnosti sistemske signalizacije, odnosno indukcije sistemskog odgovora.



### 3. MATERIJAL I METODE

#### 3.1. Biljni materijal

U pokusu smo koristile biljke uročnjaka (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.), ekotip Columbia, koje su bile u fazi razvoja prije indukcije cvjetanja, tj. prije rasta cvjetne stapke (Slika 1). Biljke smo uzgajale u zemlji, u komori za uzgoj biljaka, u uvjetima kratkog dana (8 sati svjetla i 16 sati tame), pri temperaturi od 20 °C i relativnoj vlažnosti od 59%. Uzgoj biljaka u uvjetima kratkog dana te nižu temperaturu od optimalne (Rivero i sur., 2013) izabrale smo s ciljem odgode cvjetanja, kako bi biljke što dulji period bile pogodne za izvođenje pokusa. Za rasvjetu su korištene LED cijevi, snage 18 W. Intenzitet svjetlosti na razini biljaka bio je 60–65  $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Sjemenke smo prije sisanja stratificirale dva dana na 4 °C.



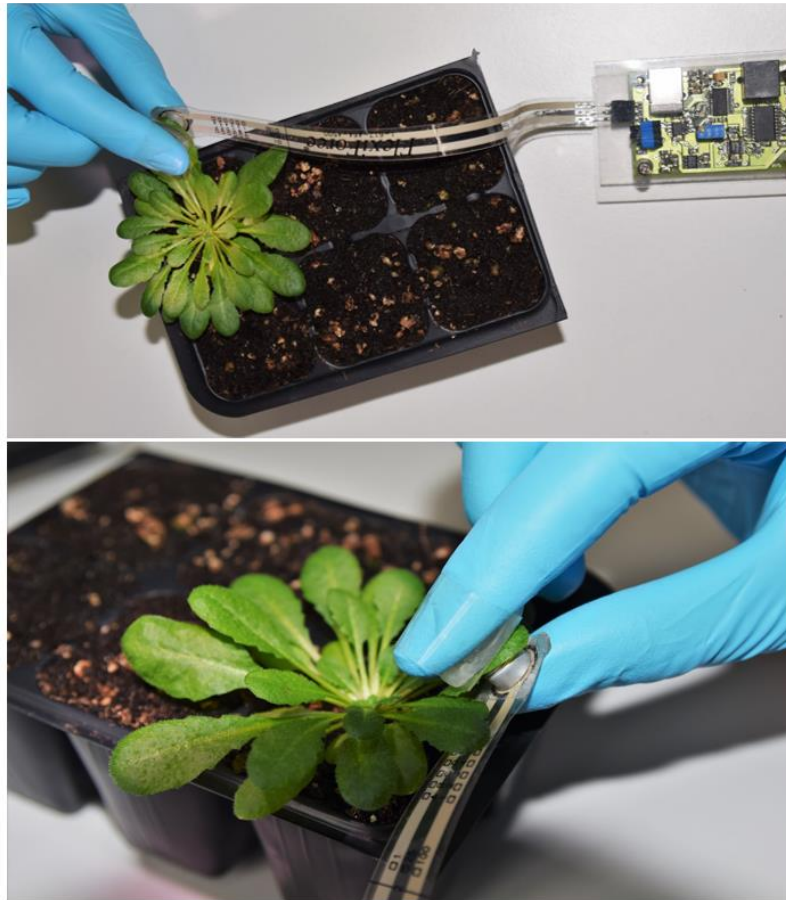
**Slika 1.** Biljka *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., ekotip Columbia, u fazi razvoja u kojoj je korištena za istraživanje.

#### 3.2. Korišteni uređaji

Korišteni uređaji su liofilizator Alfa 1-2, Christ; centrifuga Sigma 3K18; UV–VIS spektrofotometar Specord 40, Analytic Jena; ultrazvučna kupelj DLS 660 – T/H; miješalica Cole Parmer (Orbital Shaker); magnetna miješalica Tehnica Rotamix 550 MMH; inkubator Memmert; fluorimetar Quibit Systems; pH metar i konduktometar SevenCompact Duo, Mettler Toledo te uređaj za mjerenje primijenjene sile razvijen na Fakultetu elektrotehnike i računarstva Sveučilišta u Zagrebu.

### 3.3. Izlaganje biljaka mehaničkom stresu

Dva do tri lista svake biljke uročnjaka jednokratno smo izložile mehaničkom stresu. Pritom smo primijenile silu od 5 N u trajanju od 20 sekundi. Pojedini listić smo s jedne strane pritisnule senzorom sile, a s druge strane poklopcem Eppendorf epruvete zalijepljenim na prst (Slika 2). Uzevši u obzir površinu poklopca Eppendorf epruvete kojim smo primijenile silu na list biljke, ostvareni tlak iznosio je oko 30 kPa. Tretirale smo isključivo biljke koje nisu razvile tamno-zelene listove u rozeti, a na odgovarajućim biljkama izabrale smo listove približno iste starosti (Slika 1).



**Slika 2.** Prikaz primjene mehaničkog stresa na biljku *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. koristeći fleksibilan senzor sile – Flexi Force (model A201) proizvođača Tekscan. Pojedini listić je s jedne strane pritisnut senzorom sile, a s druge strane s poklopcem Eppendorf epruvete zalijepljenim na prst.

Za primjenu i mjerenje sile pritiska na list, koristile smo uređaj za mjerenje sile s fleksibilnim senzorom sile – FlexiForce (model A201) proizvođača Tekscan (Slika 2). Pritom smo primijenjenu silu promatrale grafički na osobnom računaru u stvarnom vremenu (Fancev, 2010). Navedeni

senzor smo prije korištenja baždarile upotrebom utega za tehničku vagu. Baždarna krivulja obuhvaćala je vrijednosti od 1 do 10 N. Tijekom tretiranja, silu pritiska smo koncentrirale na središnju os lista, odnosno na mjesto kojim prolazi glavna žila, što je otprilike na sredini lisne plojke.

Za svaki pokus koristile smo po 18 biljaka koje smo rasporedile u tri grupe: kontrolnu (odnosno netretirane biljke), biljke čiji su listovi analizirani 1 h nakon tretmana te one čiji su listovi analizirani 20 h nakon tretmana. Iz posljednje grupe biljaka smo za analizu također uzele dodatne listove s ciljem procjene sistemskog odgovora biljaka na kratkotrajno izlaganje mehaničkom stresu.

### **3.4. Ekstrakcija topivih proteina**

Za izradu jednog proteinskog ekstrakta koristile smo po 100 mg svježeg tkiva listova kontrolnih biljaka, odnosno listova izloženih mehaničkom podražaju. Listove smo homogenirale u hladnom tarioniku, uz dodatak oko 50 mg polivinilpolipirrolidona (PVPP, engl. *polivinilpolypirrolidone*) i 1,5 mL ekstrakcijskog pufera. Ekstrakcijski pufer sastojao se od 100 mM kalij–fosfatnog pufera (pH 7,0) te 0,1 mM EDTA (engl. *ethylenediaminetetraacetic acid*). Uzorci su centrifugirani 30 min na 20 000 g pri 4 °C. Nakon centrifugiranja odvojile smo supernatant koji smo u daljnjem radu koristile za mjerenje ukupne koncentracije topivih proteina, određivanje aktivnosti katalaze, gvajakol peroksidaze i superoksid dismutaze te određivanje stupnja oksidacije fenola.

### **3.5. Mjerenje koncentracije ukupnih topivih proteina metodom Bradforda**

Koncentraciju topivih proteina odredile smo prema metodi Bradford (1976). Za spektrofotometrijsko mjerenje, u 1 mL Bradfordovog reagensa dodale smo 50 µL proteinskog ekstrakta, razrijeđenog dva puta ekstrakcijskim puferom, kako bi izmjerene vrijednosti apsorbancija bile u rasponu vrijednosti baždarne krivulje. Za slijepu probu smo umjesto ekstrakta koristile 50 µL ekstrakcijskog pufera. Postupak pripreme proteinskog ekstrakta kao i sastav ekstrakcijskog pufera navedeni su u poglavlju 3.4. Dobivenu smjesu pomiješale smo na miješalici i inkubirale na sobnoj temperaturi 15 min. Apsorbanciju smo potom mjerile spektrofotometrom pri valnoj duljini od 595 nm. Za svaki uzorak napravile smo po dva mjerenja čiju smo srednju vrijednost koristile za daljnji izračun. Iz dobivene vrijednosti apsorbancije, uz pomoć baždarnog dijagrama, za svaki smo uzorak izračunale koncentraciju ukupnih topivih proteina u ekstraktu, pri

čemu smo uzele u obzir ranije spomenuto razrjeđenje ekstrakta. Baždarnu krivulju napravile smo koristeći otopine poznatih koncentracija albumina iz goveđeg seruma (BSA, engl. *bovine serum albumin*), u rasponu od 0,1 do 0,8 mg mL<sup>-1</sup>. Koncentraciju ukupnih topivih proteina prikazale smo kao mg proteina po mL ekstrakcijskog pufera [mg<sub>prot.</sub> mL<sup>-1</sup>] te kao mg proteina po g svježe tvari [mg<sub>prot.</sub> g<sub>sv.t.</sub><sup>-1</sup>].

### 3.6. Određivanje aktivnosti katalaze

Aktivnost enzima katalaze odredile smo prema metodi Aebi (1984), koja uključuje spektrofotometrijsko mjerenje enzimatske razgradnje vodikovog peroksida (Willekens, 1997). Reakcijska smjesa za mjerenje aktivnosti katalaze sastojala se od 50 mM kalij–fosfatnog pufera (pH 7,0) te 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. U kvarcnu kivetu od 2 mL dodale smo 950 μL reakcijske smjese i 50 μL proteinskog ekstrakta. Za slijepu probu smo umjesto ekstrakta dodale 50 μL ekstrakcijskog pufera. Postupak pripreme proteinskog ekstrakta kao i sastav ekstrakcijskog pufera navedeni su u poglavlju 3.4. Apsorbanciju smo mjerile pri valnoj duljini od 240 nm, 20 puta svakih 10 sekundi. Aktivnost katalaze izražena je kao nmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> po min po mg proteina [nmol min<sup>-1</sup> mg<sub>prot.</sub><sup>-1</sup>], prema jednadžbi:

$$\text{CAT} = \frac{\Delta A_{s.v.} \times 6 \times V_{r.s.} \times \text{F.R.} \times 1000}{V_{uz.} \times \varepsilon \times l \times \gamma} \text{ [nmol min}^{-1} \text{ mg}_{\text{prot.}}^{-1} \text{ ]}$$

$\Delta A_{s.v.}$  – srednja vrijednost promjene apsorbancije u 10 sekundi

6 – faktor korekcije, za izražavanje rezultata po minuti

$V_{r.s.}$  – volumen reakcijske smjese (1000 μL)

F.R. – faktor razrjeđenja uzorka

$V_{uz.}$  – volumen uzorka (0,05 mL)

$\varepsilon$  – molarni ekstinkcijski koeficijent (40 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>)

l – duljina optičkog puta (1 cm)

$\gamma$  – masena koncentracija proteina u ekstraktu [mg mL<sup>-1</sup>]

Dobivena vrijednost pomnožena je s 1000 kako bi rezultat bio u nmol min<sup>-1</sup> mg<sub>prot.</sub><sup>-1</sup>.



### 3.7. Određivanje aktivnosti gvajakol peroksidaze

Aktivnost enzima gvajakol peroksidaze odredile smo prema metodi Chance i Maehly (1995) koja uključuje spektrofotometrijsko mjerenje nastanka tetragvajakola u reakciji gvajakola i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Reakcijska smjesa za mjerenje aktivnosti gvajakol peroksidaze sastojala se od 50 mM kalij–fosfatnog pufera (pH 7,0), 18 mM gvajakola i 4,5 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. U plastičnu kivetu od 1 mL dodale smo 980 μL reakcijske smjese i 20 μL proteinskog ekstrakta razrijeđenog dva puta ekstrakcijskim puferom. Za slijepu probu smo umjesto ekstrakta koristile 20 μL ekstrakcijskog pufera. Postupak pripreme proteinskog ekstrakta kao i sastav ekstrakcijskog pufera navedeni su u poglavlju 3.4. Apsorbanciju smo mjerile pri valnoj duljini od 470 nm, 10 puta svakih 15 sekundi. Aktivnost gvajakol peroksidaze smo izrazile kao nmol gvajakola po min po mg proteina [ $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}_{\text{prot.}}^{-1}$ ], prema jednadžbi:

$$\text{GPOD} = \frac{\Delta A_{s,v.} \times 4 \times V_{r.s.} \times \text{F.R.}}{V_{uz.} \times \epsilon \times l \times \gamma} \quad [\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}_{\text{prot.}}^{-1}]$$

$\Delta A_{s,v.}$  – srednja vrijednost promjene apsorbancije u 15 sekundi

4 – faktor korekcije, za izražavanje rezultata po minuti

$V_{r.s.}$  – volumen reakcijske smjese (1000 μL)

F.R. – faktor razrjeđenja uzorka (2)

$V_{uz.}$  – volumen uzorka (0,02 μL)

$\epsilon$  – molarni ekstinkcijski koeficijent (26,6 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>)

l – duljina optičkog puta (1 cm)

$\gamma$  – masena koncentracija proteina u ekstraktu [mg mL<sup>-1</sup>]

### 3.8. Određivanje aktivnosti askorbat peroksidaze

Aktivnost enzima askorbat peroksidaze odredile smo prema metodi Nakano i Asada (1981) koja uključuje mjerenje pada koncentracije supstrata, tj. askorbinske kiseline. Ekstrakcijski pufer sastojao se od 50 mM kalij–fosfatnog pufera, 0,1%–tnog (w/v) TritonX i 1%–tnog (w/v) PVP–40 (pH 7,0) (Dražkiewicz i sur., 2004). Za početak smo oko 100 mg svježeg tkiva lista homogenirale u hladnom tarioniku, uz dodatak 1,5 mL ekstrakcijskog pufera. Dobiveni ekstrakt je potom centrifugiran 30 min na 20 000 g pri temperaturi od 4 °C te smo odvojile supernatant. Za

spektrofotometrijsko mjerenje aktivnosti askorbat peroksidaze smo u kvarcnu kivetu od 2 mL dodale 880  $\mu\text{L}$  50 mM kalij–fosfatnog pufera (pH 7,0) koji je sadržavao 0,1 mM EDTA, 5  $\mu\text{L}$  otopine askorbata, 180  $\mu\text{L}$  ekstrakta i 15  $\mu\text{L}$  12 mM otopine  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Za slijepu probu smo umjesto ekstrakta koristile 180  $\mu\text{L}$  ekstrakcijskog pufera. Apsorbanciju smo mjerile pri valnoj duljini od 290 nm, 10 puta svake sekunde. Aktivnost askorbat peroksidaze izražena je kao  $\mu\text{mol}$  askorbata po min po mg proteina [ $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}_{\text{prot.}}^{-1}$ ], prema jednadžbi:

$$\text{APX} = \frac{\Delta A_{s.v.} \times 6 \times V_{r.s.} \times \text{F.R.}}{V_{uz.} \times \varepsilon \times l \times \gamma} \quad [\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}_{\text{prot.}}^{-1}]$$

$\Delta A_{s.v.}$  – srednja vrijednost promjene apsorbancije svake sekunde

6 – faktor korakcije, za izražavanje rezultata po minuti

$V_{r.s.}$  – volumen reakcijske smjese (1000  $\mu\text{L}$ )

F.R. – faktor razrjeđenja uzorka

$V_{uz.}$  – volumen uzorka (0,180  $\mu\text{L}$ )

$\varepsilon$  – ekstinkcijski koeficijent (2,8  $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ )

l – duljina optičkog puta (1 cm)

$\gamma$  – masena koncentracija proteina u ekstraktu [ $\text{mg mL}^{-1}$ ]

### 3.9. Određivanje aktivnosti superoksid dismutaze

Aktivnost superoksid dismutaze odredile smo prema metodi Beauchamp i Fridovich (1971). Superoksidni ioni, koje generira sustav ksantin-ksantin oksidaza (XOD, engl. *xanthine oxidase*), reduciraju supstrat nitro-plavi tetrazolijski klorid (NBT, engl. *nitroblue tetrazolium chloride*) u NBT-diformazan koji apsorbira svjetlost valne duljine 560 nm. SOD smanjuje koncentraciju superoksidnih iona i tako smanjuje količinu nastalog NBT-diformazana. Postupak pripreme proteinskog ekstrakta kao i sastav ekstrakcijskog pufera navedeni su u poglavlju 3.4. Reakcijski pufer za mjerenje aktivnosti enzima SOD sastojao se od 50 mM kalij–fosfatnog pufera (pH 7,8), 75  $\mu\text{M}$  NBT i 0,1 mM EDTA. Prije mjerenja, uređaj smo kalibrirale pomoću slijepe probe koja se sastojala od 800  $\mu\text{L}$  reakcijskog pufera za SOD, 75  $\mu\text{L}$  10,8 mM ksantina, 50  $\mu\text{L}$  ekstrakcijskog pufera i 75  $\mu\text{L}$   $\text{dH}_2\text{O}$ . Potom smo odredile maksimalnu brzinu redukcije NBT–a u NBT–diformazan koja bi pri valnoj duljini od 560 nm trebala inicijalno odgovarati promjeni apsorbancije od 0,025 po min. Smjesa se sastojala od 800  $\mu\text{L}$  reakcijskog pufera za SOD, 75  $\mu\text{L}$  10,8 mM ksantina, 50  $\mu\text{L}$

ekstrakcijskog pufera i 75  $\mu\text{L}$  0,05  $\text{U mL}^{-1}$  ksantin oksidaze. Nakon uspješne provjere aktivnosti ksantin oksidaze, izmjerile smo aktivnost SOD u ekstraktima pri valnoj duljini od 560 nm, sedam puta svakih 30 sekundi. Za spektrofotometrijsko mjerenje aktivnosti SOD smo u plastičnu kivetu dodale 800  $\mu\text{L}$  reakcijskog pufera za SOD, 75  $\mu\text{L}$  10,8 mM ksantina (konačne koncentracije u reakciji 2,5 mM), 45  $\mu\text{L}$  ekstrakcijskog pufera, 50  $\mu\text{L}$  0,05  $\text{U mL}^{-1}$  ksantin oksidaze i 5  $\mu\text{L}$  proteinskog ekstrakta. Aktivnost SOD za svaki pojedini uzorak odredile smo korištenjem recipročne vrijednosti izmjerene promjene apsorbancije u minuti ( $\frac{1}{\Delta A_{\text{min}}^{-1}}$ ) i baždarne krivulje, dobivene uz pomoć različitih koncentracija govede SOD kao standarda, u rasponu od 0,005 do 0,5  $\text{U } \mu\text{L}^{-1}$ . Dobivene vrijednosti smo podijelile s koncentracijom proteina u ekstraktu te je u konačnici aktivnost SOD izražena u jedinicama (U, engl. *unit*) po mg proteina [ $\text{U mg}_{\text{prot.}}^{-1}$ ]. Jedinica aktivnosti SOD (1 U) definirana je kao količina enzima koja uzrokuje 50%-tnu inhibiciju redukcije NBT-a u NBT-diformazan (Drażkiewicz i sur., 2004).

### 3.10. Priprema ekstrakta i određivanje stupnja lipidne peroksidacije

Lipidnu peroksidaciju smo odredile mjerenjem koncentracije malondialdehida, prema metodi Health i Packer (1968). Za pripremu ekstrakta smo oko 100 mg tkiva lista homogenirale u hladnom tarioniku uz dodatak 1300  $\mu\text{L}$  reakcijske smjese za lipidnu peroksidaciju. Reakcijska smjesa sastojala se od 0,25% (w/v) tiobarbituaratne kiseline (TBA, engl. *thiobarbituric acid*) i 10% (w/v) trikloroetene kiseline (TCA, engl. *trichloroacetic acid*). Uzorke smo inkubirale u sušioniku 30 min na 60  $^{\circ}\text{C}$  u staklenim semimikropruветama, a potom naglo ohladile u ledu i centrifugirale 10 min na 15 000 g pri 4  $^{\circ}\text{C}$ . Supernatant smo odvojile te mjerile apsorbancije na valnim duljinama 532 i 600 nm. Za slijepu probu smo koristile čistu reakcijsku smjesu za lipidnu peroksidaciju. Stupanj lipidne peroksidacije smo izrazile kao koncentraciju MDA odnosno  $\mu\text{mol}$  malondialdehida po g svježeg tkiva [ $\text{nmol g}_{\text{sv.t.}}^{-1}$ ], prema jednadžbi:

$$\text{Sadržaj MDA} = \frac{(A_{532} - A_{600}) \times V_{\text{r.s.}}}{\epsilon \times l \times m} \quad [\text{nmol g}_{\text{sv.t.}}^{-1}]$$

$A_{532}$  – apsorbancija izmjerena na 532 nm

$A_{600}$  – apsorbancija izmjerena na 600 nm

$V_{\text{r.s.}}$  – volumen reakcijske smjese (1300  $\mu\text{L}$ )

$\epsilon$  – molarni ekstinkcijski koeficijent ( $155 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ )

$l$  – duljina optičkog puta (1 cm)

$m$  – masa tkiva [g]

### 3.11. Priprema ekstrakta i određivanje količine vodikovog peroksida

Količinu  $H_2O_2$  odredile smo prema metodi Sergijev i sur. (1997). Za pripremu ekstrakta izvagale smo po 100 mg tkiva lista i homogenirale ga u hladnom tarioniku uz dodatak 1 mL 0,1%–tne (w/v) trikloroctene kiseline (TCA). Dobiveni ekstrakt je potom centrifugiran 15 min na 12 000 g pri temperaturi od 4 °C te smo odvojile supernatant. Za spektrofotometrijsko mjerenje količine vodikovog peroksida smo u plastičnu kivetu dodale 500  $\mu$ L supernatanta, 500  $\mu$ L 10 mM kalij–fosfatnog pufera (pH 7,0) i 1 mL 1M kalij jodida (KI). Za slijepu probu smo umjesto ekstrakta koristile 500  $\mu$ L ekstrakcijskog pufera. Apsorbanciju smo mjerile spektrofotometrijski pri valnoj duljini 390 nm. Baždarni dijagram za određivanje količine  $H_2O_2$  napravile smo spektrofotometrijskim mjerenjem apsorbancija sljedećih koncentracija vodikovog peroksida: 1,86 ; 3,64 ; 5,46 ; 7,28 ; 9,1 ; 10,92 i 16,38  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>. Pomoću baždarnog dijagrama, izmjerenih apsorbancija uzoraka te mase svježeg tkiva izračunale smo udio vodikovog peroksida i izrazile kao ng  $H_2O_2$  po mg svježeg tkiva ekstrakta [ng mg<sup>-1</sup><sub>sv.t.</sub>].

### 3.12. Priprema ekstrakta i određivanje udjela ukupnih fenola

Koncentraciju fenola odredile smo prema metodi Humadi i Istudor (2009). Za pripremu ekstrakta, 10 mg liofiliziranog biljnog tkiva smo homogenirale u tarioniku uz dodatak 1 mL 80%–tnog (v/v) metanola. Uzorke smo inkubirale 45 min u vodenoj kupelji na 65 °C. Potom su centrifugirani 10 min na 15 000 g pri 4 °C. Reakcijska smjesa sastojala se od 1550  $\mu$ L dH<sub>2</sub>O, 50  $\mu$ L ekstrakta i 100  $\mu$ L Folin–Ciocalteu reagensa (FCR, engl. *Folin-Ciocalteu reagent*). Za nuliranje smo umjesto ekstrakta koristile 80%–tni (v/v) metanol. Sve uzorke smo pomiješale na miješalici te im dodale 300  $\mu$ L 1,88 M natrijevog karbonata. Uzorke smo opet kratko promiješale na miješalici i inkubirale 30 min na 45 °C. Apsorbanciju smo mjerile pri 765 nm. Ukupni udio fenola u uzorcima odredile smo uz pomoć baždarnog dijagrama dobivenog mjerenjem apsorbancija poznatih koncentracija galne kiseline u rasponu od 0,05 do 1,0 mg mL<sup>-1</sup> i izazile u  $\mu$ g ukupnih fenola po g suhog tkiva [ $\mu$ g g<sup>-1</sup><sub>su.t.</sub>].

### 3.13. Određivanje stope oksidacije fenola

Stopu oksidacije fenola odredile smo prema metodi Lavid i sur. (2001). Reakcijska smjesa sastojala se od 0,1 mM kalij–fosfatnog pufera (pH 7,0), 0,5 mM EDTA i 0,05 M katehola. U kivetu od 1 mL dodale smo 800  $\mu\text{L}$  reakcijske smjese za mjerenje oksidacije fenola i 200  $\mu\text{L}$  proteinskog ekstrakta. Postupak pripreme proteinskog ekstrakta kao i sastav ekstrakcijskog pufera navedeni su u poglavlju 3.4. Za slijepu probu smo umjesto ekstrakta koristile 200  $\mu\text{L}$  ekstrakcijskog pufera. Apsorbanciju smo mjerile pri valnoj duljini od 420 nm, 10 puta svakih 15 sekundi. Stopu oksidacije fenola smo izrazile kao promjenu apsorbancije ( $\Delta A$ ) po min po mg proteina [ $\text{min}^{-1} \text{mg}_{\text{prot.}}^{-1}$ ] prema jednadžbi:

$$\text{Stopa oksidacije fenola} = \frac{\Delta A_{s.v.} \times 4 \times V_{r.s.} \times F.R.}{V_{uz.} \times l \times \gamma} \quad [\text{min}^{-1} \text{mg}_{\text{prot.}}^{-1}]$$

$\Delta A_{s.v.}$  – srednja vrijednost promjene apsorbancije u 15 s

4 – faktor korekcije za izražavanje rezultata po minuti

$V_{r.s.}$  – volumen reakcijske smjese (1000  $\mu\text{L}$ )

F.R. – faktor razrjeđenja uzroka

$V_{uz.}$  – volumen uzorka (200  $\mu\text{L}$ )

l – duljina optičkog puta (1 cm)

$\gamma$  – masena koncentracija proteina u ekstraktu [ $\text{mg mL}^{-1}$ ]

### 3.14. Određivanje udjela fotosintetskih pigmenata

Količinu fotosintetskih pigmenata odredile smo prema metodi Wellburn (1994). Vagnule smo oko 30 mg liofiliziranog uzorka listova koje smo potom homogenirale u hladnom tarioniku, uz dodatak nekoliko mL tekućeg dušika. Nakon što je sav dušik ispario, dodale smo 1,5 mL hladnog 96%–tnog (v/v) acetona i oko 50 mg kalcijevog karbonata ( $\text{CaCO}_3$ ). Ekstrakte smo prebacile u Eppendorf epruvete, te su uzorci centrifugirani 10 min na 5000 g pri 4 °C. Nakon centrifugiranja, supernatant smo prebacile u graduirane staklene epruvete koje smo odmah začepile i stavile u posudu s ledom. Na preostali talog dodale smo 1 mL hladnog 96%–tnog (v/v) acetona te smo navedenu smjesu pomiješale na miješalici i stavile centrifugirati. Supernatant smo dodale odgovarajućoj graduiranoj epruveti koja je potom nadopunjena acetonom do 3 mL. Apsorbanciju dobivenog ekstrakta smo

mjerile pri 470 nm, 646 nm i 663 nm. Količine fotosintetskih pigmentata izrazile smo kao  $\mu\text{g}$  pigmenta po mg suhog tkiva [ $\mu\text{g mg}_{\text{su.t.}}^{-1}$ ], prema jednadžbama:

$$c_a = 12,21 A_{663} - 2,81 A_{646} \quad [\mu\text{g mL}^{-1}]$$

$$c_b = 20,13 A_{646} - 5,03 A_{663} \quad [\mu\text{g mL}^{-1}]$$

$$c_{x+c} = \frac{(1000 A_{470} - 3,27 c_a - 104 c_b)}{198} \quad [\mu\text{g mL}^{-1}]$$

Budući da smo radile sa suhim biljnim tkivom, dobivene koncentracije pigmentata smo uvrstile u sljedeću formulu da bi rezultate izrazile kao  $\mu\text{g}$  po mg suhe tvari [ $\mu\text{g mg}_{\text{su.t.}}^{-1}$ ]:

$$c = \frac{c_{\text{pig}} \times V_{\text{e.p.}}}{m} \quad [\mu\text{g mg}_{\text{su.t.}}^{-1}]$$

$c_a$  – količina klorofila *a* [ $\mu\text{g mL}^{-1}$ ]

$c_b$  – količina klorofila *b* [ $\mu\text{g mL}^{-1}$ ]

$c_{x+c}$  – količina karotenoida (ksantofila i karotena) [ $\mu\text{g mL}^{-1}$ ]

$c_{\text{pig}}$  – količina pojedinog pigmenta [ $\mu\text{g mL}^{-1}$ ]

$A_{470}$  – absorbancija mjerenja pri 470 nm

$A_{646}$  – absorbancija mjerenja pri 646 nm

$A_{663}$  – absorbancija mjerenja pri 663 nm

$m$  – masa suhog tkiva [mg]

$V_{\text{e.p.}}$  – volumen ekstrakcijskog pufera (3 mL)

### 3.15. Mjerenje razine fluorescencije klorofila *in vivo*

Fluorescenciju klorofila mjerile smo metodom saturacijskog pulsa (Maxwell i Johnson, 2000; Schreiber i sur., 1994). Mjerenje smo provele pomoću Qubit sustava za mjerenje fluorescencije i programa Logger Pro 3.2. Prije mjerenja, biljke smo 30 minuta ostavile u tami kako bi se zaustavio proces fotosinteze i pritom i oksidirale sve molekule plastokinona koji je jedan od spojeva koji sudjeluju u lancu prijenosa elektrona.

Pokus smo započele izlaganjem lista biljke uvjetima slabog osvjetljenja (svjetlosti intenziteta oko  $2-3 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). U tim uvjetima izmjerile smo minimalnu fluorescenciju ( $F_0$ ). Nakon toga, primijenile smo kratkotrajnu svjetlost visokog intenziteta ( $>5000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), tj. saturacijski puls. Pritom smo izmjerile maksimalnu fluorescenciju ( $F_m$ ). Razlika maksimalne i minimalne fluorescencije je definirana kao varijabilna fluorescencija ( $F_v$ ), a omjer varijabilne i maksimalne fluorescencije predstavlja maksimalni prinos fotosistema II (PSII). Listove smo nakon toga osvjetlile bijelim aktiničnim svjetlom (intenziteta  $\sim 150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) koje ostaje uključeno do kraja pokusa. Potom smo u određenim vremenskim razmacima (svakih 20 sekundi) primjenjivale saturacijske pulseve pri čemu smo zabilježile vrijednosti maksimalne fluorescencije ( $F'_m$ ) te fluorescencije ravnotežnog stanja ( $F_s$ ) u listu prilagođenom svjetlosnim uvjetima. Mjerenje smo završile gašenjem aktinične svjetlosti te očitavanjem  $F'_0$  vrijednosti koja predstavlja minimalnu vrijednost fluorescencije pri crvenom osvjetljenju u listu prilagođenom na uvjete svjetla. Prema spomenutim parametrima ( $F_0$ ,  $F_m$ ,  $F_s$ ,  $F'_m$ ,  $F'_0$ ) odredile smo vrijednosti fotokemijskog i nefotokemijskog gašenja, maksimalnog prinosa PSII i efektivnog prinosa PSII prema jednadžbama:

Efektivni prinos PSII ( $\Phi_{\text{PSII}}$ )

$$\Phi_{\text{PSII}} = \frac{F'_m - F_s}{F'_m} = \frac{\Delta F_v}{F'_m}$$

Maksimalni prinos PSII (maksimalni prinos PSII)

$$\text{Maksimalni prinos PSII} = \frac{F_m - F_0}{F_m} = \frac{F_v}{F_m}$$

Fotokemijsko gašenje fluorescencije (qP)

$$qP = \frac{F'_m - F_s}{F'_m - F'_0}$$

Nefotokemijsko gašenje fluorescencije (NPQ)

$$\text{NPQ} = \frac{F_m - F'_m}{F'_m}$$

### 3.16. Procjena propusnosti plazmatske membrane

Provodljivost, kao mjeru propusnosti plazmatske membrane, odredile smo prema metodi Lutts i sur. (1996). Na tri lista jedne biološke replike izrezale smo disk promjera sedam mm. Uzorke smo isprale deioniziranom vodom tri puta kako bi uklonile elektrolite vezane uz staničnu površinu. Diskove smo stavile u 10 mL deionizirane vode i potom inkubirale 24 h pri 24°C na rotacijskoj miješalici (100 rpm). Nakon inkubacije, izmjerile smo električnu provodljivost otopine u kojoj su inkubirani diskovi ( $L_t$ ). Uzorke smo potom autoklavirale na 120 °C 20 min i pri tlaku 0,15 MPa. Nakon što su se ohladili na 25 °C, ponovno smo im izmjerile električnu provodljivost ( $L_0$ ). Prije korištenja, mjerač električne provodljivosti kalibrirale smo standardnim otopinama vodljivosti 1,41 mS cm<sup>-1</sup> i 12,88 mS cm<sup>-1</sup>. Propuštanje elektrolita preko plazmatske membrane smo u konačnici izrazile prema jednadžbi:

$$\text{Električna provodljivost} = \frac{L_t \times 100}{L_0} [\%]$$

$L_t$  – električna provodljivost inkubiranih otopina nakon 24h

$L_0$  – električna provodljivost autoklaviranih otopina

100 – faktor korekcije, kako bi rezultat bio izražen kao postotak

### 3.17. Prikaz i statistička obrada podataka

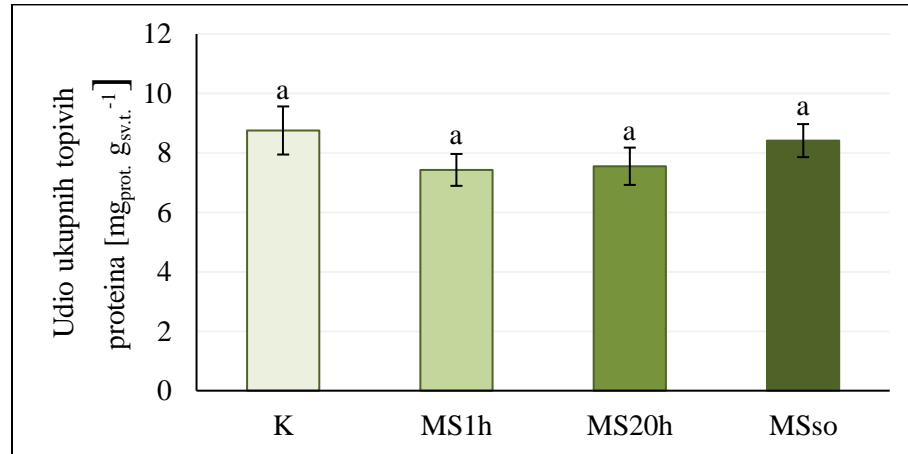
Sve izračune iz prikupljenih broječnih podataka provele smo u računalnom programu Microsoft Excel 2013. Dobiveni rezultati su srednja vrijednost pet ili šest bioloških replika. Odstupanje od srednje vrijednosti izrazile smo kao standardnu pogrešku. Podatke smo statistički obradile računalnim programom Statistica 10 (Statsoft Inc., SAD). Provele smo jednosmjernu analizu varijance (one-way ANOVA) nakon čega smo provele Newman–Keulsov test s ciljem određivanja značajnih razlika među tretmanima. Prilikom tumačenja obrađenih rezultata, za sve pokuse smo statistički značajnim smatrale razinu značajnosti manju ili jednaku 0,05 ( $p \leq 0,05$ ).



## 4. REZULTATI

### 4.1. Udio ukupnih topivih proteina

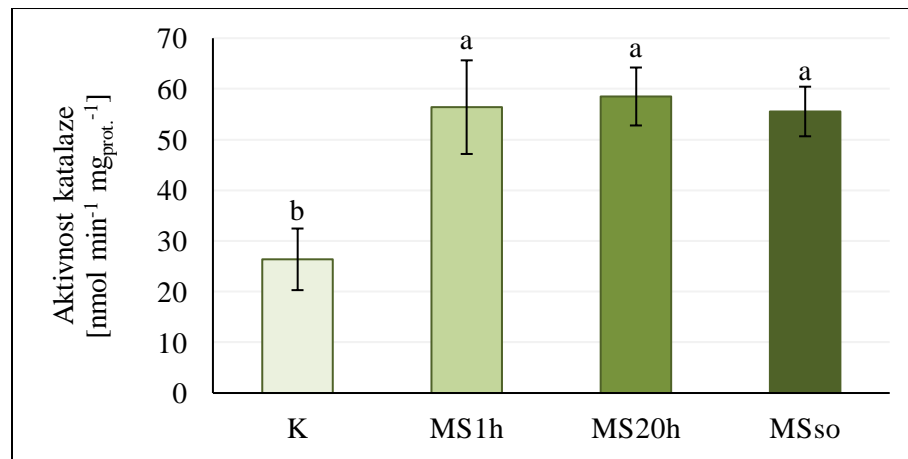
Mehanički podražaj od 5 N u trajanju od 20 sekundi u biljci *Arabidopsis thaliana* nije doveo do statistički značajne promjene udjela ukupnih topivih proteina u odnosu na kontrolu koja je iznosila  $8,76 \text{ mg}_{\text{prot.}} \text{ g}_{\text{sv.t.}}^{-1}$  (Slika 3).



**Slika 3.** Koncentracija ukupnih topivih proteina u biljaka *Arabidopsis thaliana* izloženih mehaničkom stresu od 5 N u trajanju od 20 sekundi prikazana kao  $\text{mg}_{\text{prot.}} \text{ g}_{\text{sv.t.}}^{-1}$ . Analizirano je tkivo listova biljaka (K - kontrola, MS1h - 1 h nakon izlaganja mehaničkom stresu, MS20h - 20 h nakon izlaganja mehaničkom stresu, MSso - netretirani listovi 20 h nakon izlaganja biljaka MS20h mehaničkom stresu). Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost od pet ili šest bioloških replika  $\pm$  standardna pogreška. Rezultati koji se međusobno značajno razlikuju prema Newman-Keulsovom testu na razini  $P \leq 0,05$ , označeni su različitim slovima.

## 4.2. Aktivnost katalaze

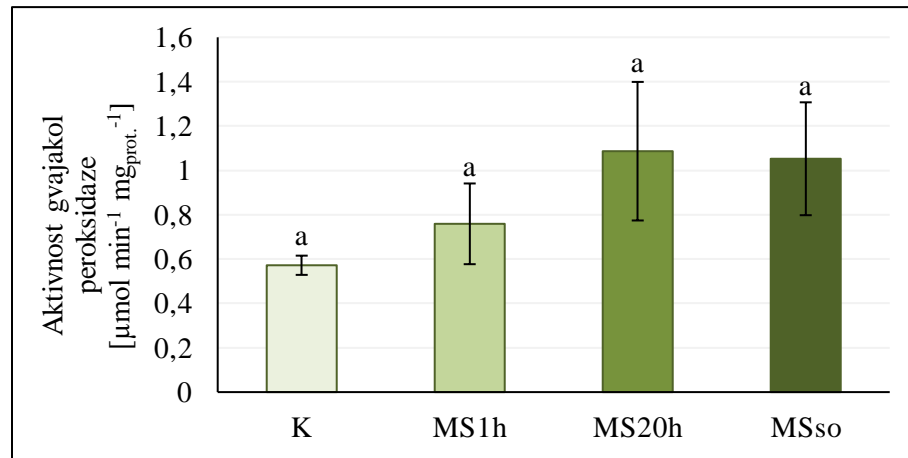
Aktivnost katalaze u ekstraktu biljnog tkiva nakon izlaganja listova mehaničkom podražaju od 5 N u trajanju od 20 sekundi doveo je do statistički značajne promjene aktivnosti enzima CAT u biljkama analiziranim 1 h i 20 h nakon tretmana, te kod sistemskog odgovora, u odnosu na vrijednost kontrole koja je iznosila  $26,38 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}_{\text{prot.}}^{-1}$  (Slika 4). Najveći porast aktivnosti CAT zabilježen je kod biljaka analiziranih 20 h nakon tretmana ( $58,51 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}_{\text{prot.}}^{-1}$ ).



**Slika 4.** Aktivnost enzima katalaze u biljaka *Arabidopsis thaliana* izloženih mehaničkom stresu od 5 N u trajanju od 20 sekundi prikazana kao  $\text{nmol min}^{-1} \text{ mg}_{\text{prot.}}^{-1}$ . Analizirano je tkivo listova biljaka (K - kontrola, MS1h - 1 h nakon izlaganja mehaničkom stresu, MS20h - 20 h nakon izlaganja mehaničkom stresu, MSso - netretirani listovi 20 h nakon izlaganja biljaka MS20h mehaničkom stresu). Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost od pet ili šest bioloških replika  $\pm$  standardna pogreška. Rezultati koji se međusobno značajno razlikuju prema Newman-Keulsovom testu na razini  $P \leq 0,05$ , označeni su različitim slovima.

### 4.3. Aktivnost gvajakol peroksidaze

Mehanički podražaj od 5 N u trajanju od 20 sekundi u biljci *Arabidopsis thaliana* nije doveo do statistički značajne promjene aktivnosti gvajakol peroksidaze. No, vidljiv je trend povišenja aktivnosti kod tretiranih biljaka u odnosu na vrijednost kontrole koja je iznosila  $0,572 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}_{\text{prot}}^{-1}$  (Slika 5).



**Slika 5.** Aktivnost enzima gvajakol peroksidaze u biljaka *Arabidopsis thaliana* izloženih mehaničkom stresu od 5 N u trajanju od 20 sekundi prikazana kao  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}_{\text{prot}}^{-1}$ . Analizirano je tkivo listova biljaka (K - kontrola, MS1h - 1 h nakon izlaganja mehaničkom stresu, MS20h - 20 h nakon izlaganja mehaničkom stresu, MSso - netretirani listovi 20 h nakon izlaganja biljaka MS20h mehaničkom stresu). Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost od pet ili šest bioloških replika  $\pm$  standardna pogreška. Rezultati koji se međusobno značajno razlikuju prema Newman-Keulsovom testu na razini  $P \leq 0,05$ , označeni su različitim slovima.

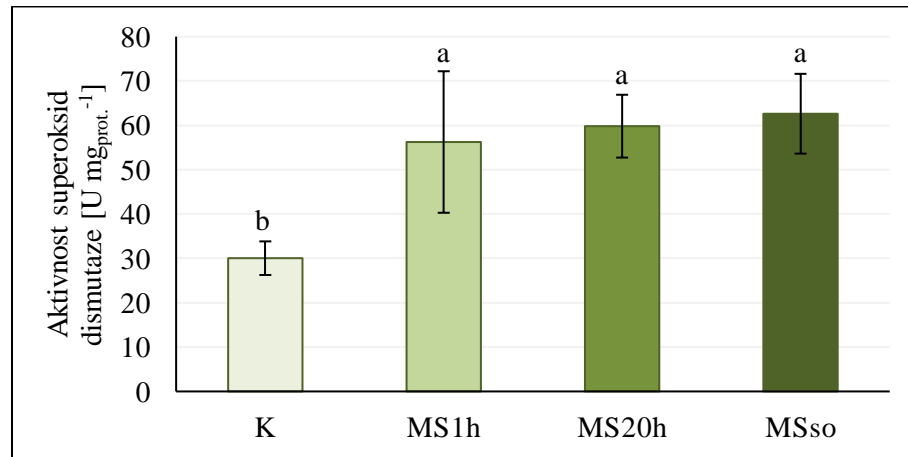
### 4.4. Aktivnost askorbat peroksidaze

Nakon nekoliko pokušaja mjerenja, nismo uspjele zabilježiti aktivnost enzima askorbat peroksidaze, odnosno promjenu apsorbancije u vremenu, ni u kontrolnoj skupini kao ni u jednom tretmanu. Rezultate stoga nismo grafički prikazale.

#### 4.5. Aktivnost superoksid dismutaze

Izlaganje uročnjaka mehaničkom stresu od 5 N u trajanju od 20 sekundi dovelo je do statistički značajne promjene aktivnosti superoksid dismutaze u biljkama analiziranim 1 h i 20 h nakon tretmana, te kod sistemskog odgovora, u odnosu na kontrolu koja je iznosila  $30,05 \text{ U mg}_{\text{prot.}}^{-1}$  (Slika

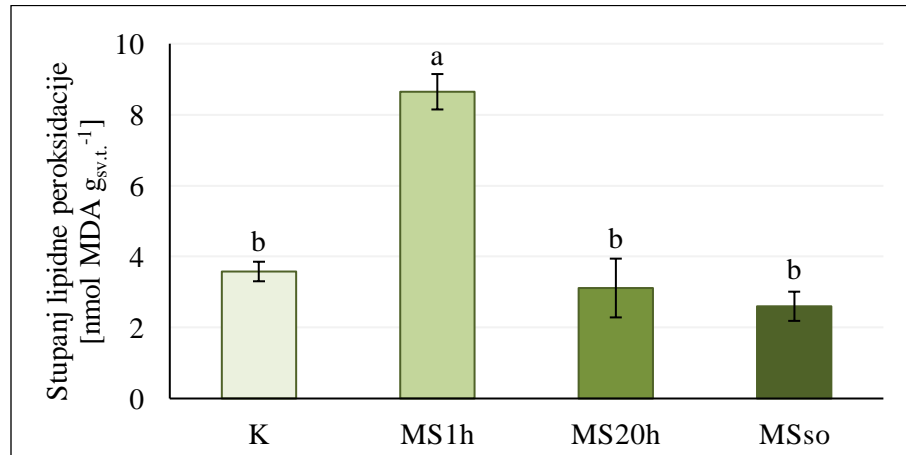
6). Između pojedinih tretmana nije bilo statistički značajne razlike.



**Slika 6.** Aktivnost enzima superoksid dismutaze u biljaka *Arabidopsis thaliana* izloženih mehaničkom stresu od 5 N u trajanju od 20 sekundi prikazana kao  $\text{U mg}_{\text{prot.}}^{-1}$ . Analizirano je tkivo listova biljaka (K - kontrola, MS1h - 1 h nakon izlaganja mehaničkom stresu, MS20h - 20 h nakon izlaganja mehaničkom stresu, MSso - netretirani listovi 20 h nakon izlaganja biljaka MS20h mehaničkom stresu). Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost od pet ili šest bioloških replika  $\pm$  standardna pogreška. Rezultati koji se međusobno značajno razlikuju prema Newman-Keulsovom testu na razini  $P \leq 0,05$ , označeni su različitim slovima. Pritom U predstavlja onu količinu SOD koja uzrokuje 50%-tnu inhibiciju redukcije NBT-a u NBT-diformazan (Drażkiewicz i sur., 2004).

#### 4.6. Stupanj lipidne peroksidacije

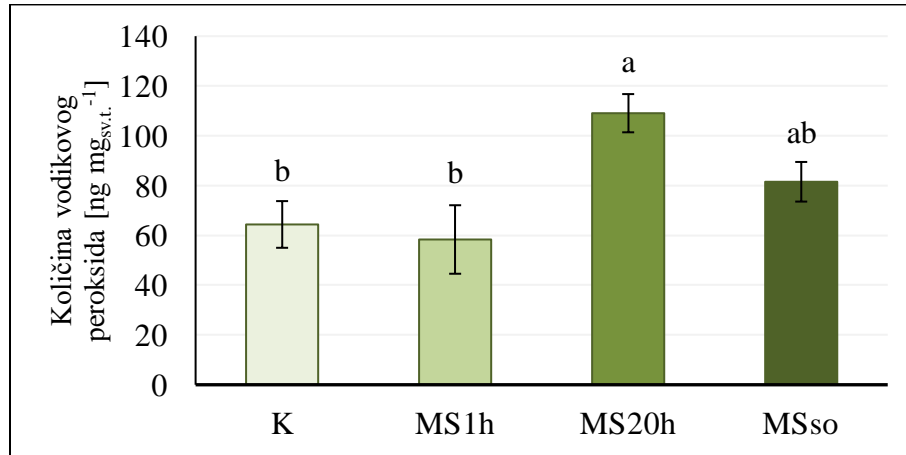
Mehanički stres izazvao je statistički značajno povećanje stupnja lipidne peroksidacije kod biljaka analiziranih 1 h nakon tretmana ( $8,65 \text{ nmol MDA g}_{\text{sv.t.}}^{-1}$ ) u odnosu na kontrolu koja je iznosila  $3,58 \text{ nmol MDA g}_{\text{sv.t.}}^{-1}$  (Slika 7).



**Slika 7.** Stupanj lipidne peroksidacije u biljaka *Arabidopsis thaliana* izloženih mehaničkom stresu od 5 N u trajanju od 20 sekundi prikazana kao nmol MDA  $\text{g}_{\text{sv.t.}}^{-1}$ . Analizirano je tkivo listova biljaka (K - kontrola, MS1h - 1 h nakon izlaganja mehaničkom stresu, MS20h - 20 h nakon izlaganja mehaničkom stresu, MSso - netretirani listovi 20 h nakon izlaganja biljaka MS20h mehaničkom stresu). Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost od pet ili šest bioloških replika  $\pm$  standardna pogreška. Rezultati koji se međusobno značajno razlikuju prema Newman-Keulsovom testu na razini  $P \leq 0,05$ , označeni su različitim slovima.

#### 4.7. Količina vodikovog peroksida

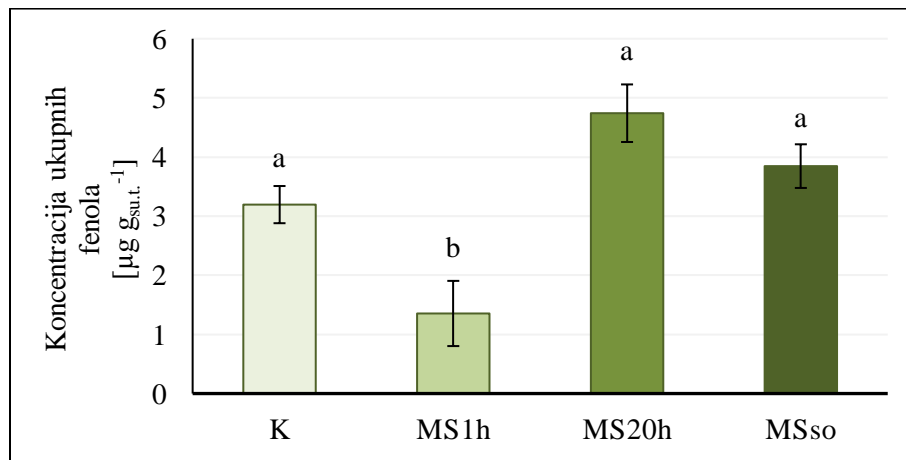
Izlaganje biljaka *Arabidopsis thaliana* mehaničkom stresu od 5 N u trajanju od 20 sekundi dovelo je do statistički značajnog porasta koncentracije vodikovog peroksida kod biljaka analiziranih 20 h nakon tretmana ( $109 \text{ ng mg}_{\text{sv.t.}}^{-1}$ ) u odnosu na kontrolu koja je iznosila  $64 \text{ ng mg}_{\text{sv.t.}}^{-1}$  (Slika 8). Pritom se rezultati sistemskog odgovora nisu značajno razlikovali ni od kontrolnih ni od tretiranih skupina biljaka.



**Slika 8.** Koncentracija  $\text{H}_2\text{O}_2$  u biljaka *Arabidopsis thaliana* izloženih mehaničkom stresu od 5 N u trajanju od 20 sekundi prikazana kao  $\text{ng mg}_{\text{sv.t.}}^{-1}$ . Analizirano je tkivo listova biljaka (K - kontrola, MS1h - 1 h nakon izlaganja mehaničkom stresu, MS20h - 20 h nakon izlaganja mehaničkom stresu, MSso - netretirani listovi 20 h nakon izlaganja biljaka MS20h mehaničkom stresu). Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost od pet ili šest bioloških replika  $\pm$  standardna pogreška. Rezultati koji se međusobno značajno razlikuju prema Newman-Keulsovom testu na razini  $P \leq 0,05$ , označeni su različitim slovima.

#### 4.8. Koncentracija ukupnih fenola

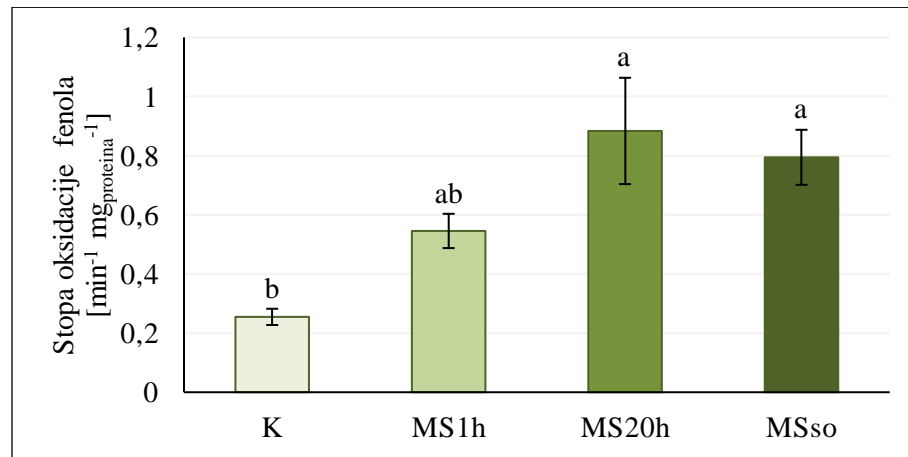
Koncentracija ukupnih fenola uslijed izlaganja mehaničkom stresu, u biljci *Arabidopsis thaliana*, dovela je do statistički značajnog smanjenja koncentracije ukupnih fenola kod biljaka analiziranih 1 h nakon tretmana ( $1,35 \mu\text{g g}_{\text{su.t.}}^{-1}$ ), u odnosu na kontrolu koja je iznosila  $3,20 \mu\text{g g}_{\text{su.t.}}^{-1}$  (Sika 9). Iako nije statistički značajan, može se zamijetiti trend blagog povećanja koncentracije ukupnih fenola u biljkama analiziranim 20 h nakon tretmana ( $4,74 \mu\text{g g}_{\text{su.t.}}^{-1}$ ) i kod sistemskog odgovora ( $3,85 \mu\text{g g}_{\text{su.t.}}^{-1}$ ) (Slika 9).



**Slika 9.** Koncentracija ukupnih fenola u biljaka *Arabidopsis thaliana* izloženih mehaničkom stresu od 5 N u trajanju od 20 sekundi prikazana kao  $\mu\text{g g}_{\text{su.t.}}^{-1}$ . Analizirano je tkivo listova biljaka (K - kontrola, MS1h - 1 h nakon izlaganja mehaničkom stresu, MS20h - 20 h nakon izlaganja mehaničkom stresu, MSso - netretirani listovi 20 h nakon izlaganja biljaka MS20h mehaničkom stresu). Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost od pet ili šest bioloških replika  $\pm$  standardna pogreška. Rezultati koji se međusobno značajno razlikuju prema Newman-Keulsovom testu na razini  $P \leq 0,05$ , označeni su različitim slovima.

#### 4.9. Stopa oksidacije fenola

Mehanički podražaj od 5 N u trajanju od 20 sekundi doveo je do statistički značajnog porasta stupnja oksidacije fenola kod biljaka analiziranih 20 h nakon tretmana ( $0,88 \text{ min}^{-1} \text{ mg}_{\text{prot.}}^{-1}$ ) i kod sistemskog odgovora ( $0,79 \text{ min}^{-1} \text{ mg}_{\text{prot.}}^{-1}$ ) u odnosu na kontrolu koja je iznosila  $0,26 \text{ min}^{-1} \text{ mg}_{\text{prot.}}^{-1}$ . (Slika 10). Pritom se rezultati stupnja oksidacije fenola kod biljaka analiziranih 1 h nakon tretmana nisu značajno razlikovali od rezultata kontrole, tretiranih biljaka i sistemskog odgovora.

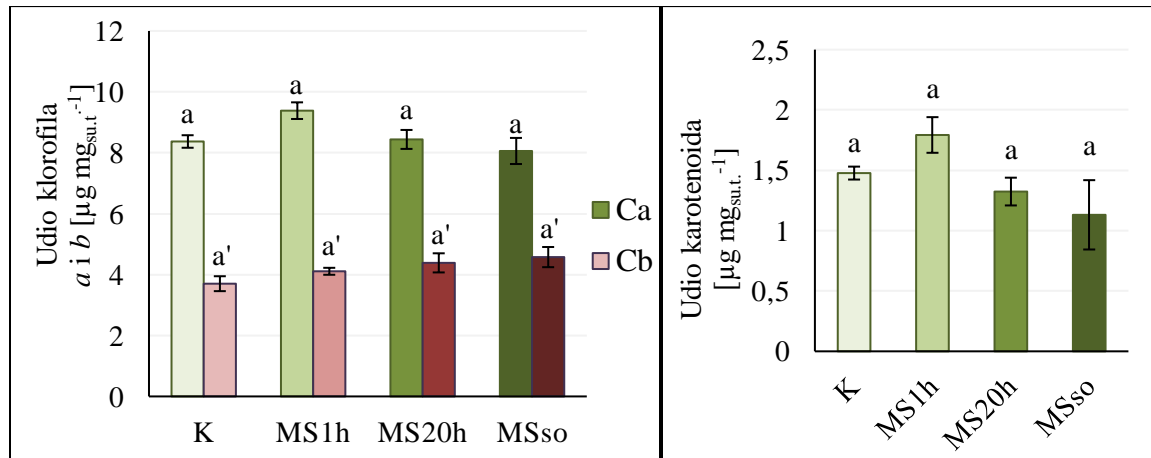


**Slika 10.** Stopa oksidacije fenola u biljaka *Arabidopsis thaliana* izloženih mehaničkom stresu od 5 N u trajanju od 20 sekundi prikazana kao  $\text{min}^{-1} \text{ mg}_{\text{prot.}}^{-1}$ . Analizirano je tkivo listova biljaka (K - kontrola, MS1h - 1 h nakon izlaganja mehaničkom stresu, MS20h - 20 h nakon izlaganja mehaničkom stresu, MSso - netretirani listovi 20 h nakon izlaganja biljaka MS20h mehaničkom stresu). Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost od pet ili šest bioloških replika  $\pm$  standardna pogreška. Rezultati koji se međusobno značajno razlikuju prema Newman-Keulsovom testu na razini  $P \leq 0,05$ , označeni su različitim slovima.



#### 4.10. Udio pigmenata u tkivu

Udio klorofila *a* i *b*, kao i udio karotenoida nije se značajno promijenio u odnosu na kontrolu prilikom izlaganja mehaničkom stresu (Slika 11). Međutim, može se primijetiti trend smanjenja udjela karotenoida kod biljaka analiziranih 20 h nakon tretmana ( $1,32 \mu\text{g mg}_{\text{su.t.}}^{-1}$ ) i kod sistemskog odgovora ( $0,94 \mu\text{g mg}_{\text{su.t.}}^{-1}$ ), u odnosu na kontrolu koja je iznosila  $1,48 \mu\text{g mg}_{\text{su.t.}}^{-1}$ .

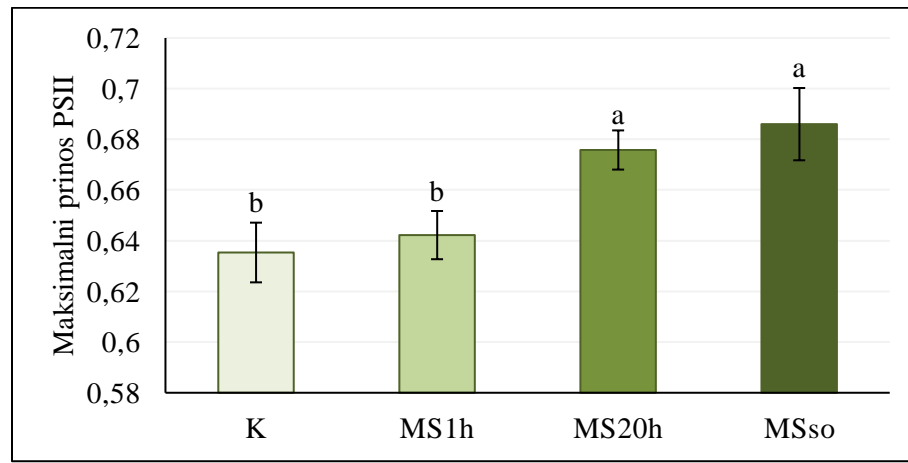


**Slika 11.** Udio klorofila *a* i *b* (lijevo) i udio karotenoida (desno) u biljaka *Arabidopsis thaliana* izloženih mehaničkom stresu od 5 N u trajanju od 20 sekundi prikazani kao  $\mu\text{g mg}_{\text{su.t.}}^{-1}$ . Analizirano je tkivo listova biljaka (K - kontrola, MS1h - 1 h nakon izlaganja mehaničkom stresu, MS20h - 20 h nakon izlaganja mehaničkom stresu, MSso - netretirani listovi 20 h nakon izlaganja biljaka MS20h mehaničkom stresu). Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost od pet ili šest bioloških replika  $\pm$  standardna pogreška. Rezultati koji se međusobno značajno razlikuju prema Newman-Keulsovom testu na razini  $P \leq 0,05$ , označeni su različitim slovima.

## 4.11. Fluorescencija klorofila *in vivo*

### 4.11.1. Maksimalni prinos fotosistema II

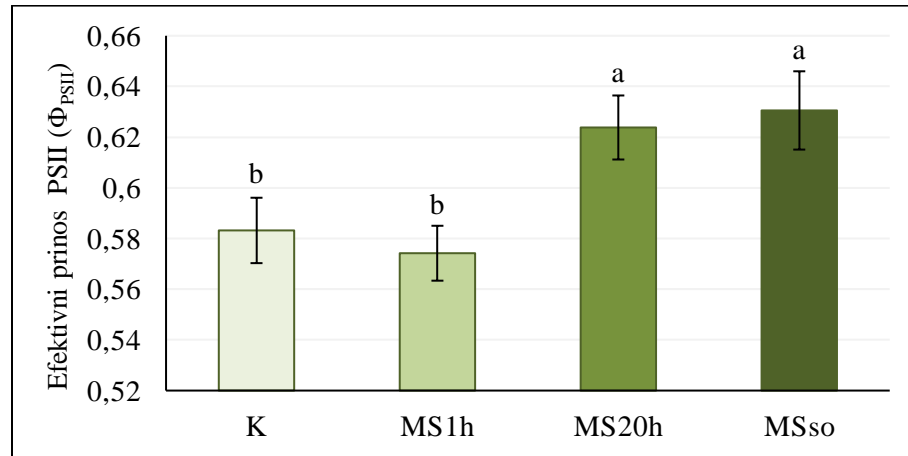
Mehanički podražaj od 5 N u trajanju od 20 sekundi u biljci *Arabidopsis thaliana* doveo je do statistički značajnog povećanja maksimalnog prinosa fotosistema II kod biljaka analiziranih 20 h nakon tretmana (0,68) i sistemskog odgovora analiziranog na istim biljkama (0,69), u odnosu na kontrolu koja je iznosila 0,64 (Slika 12).



**Slika 12.** Maksimalni prinos fotosistema II (PSII) u biljaka *Arabidopsis thaliana* izloženih mehaničkom stresu od 5 N u trajanju od 20 sekundi. Analizirano je tkivo listova biljaka (K - kontrola, MS1h - 1 h nakon izlaganja mehaničkom stresu, MS20h - 20 h nakon izlaganja mehaničkom stresu, MSso - netretirani listovi 20 h nakon izlaganja biljaka MS20h mehaničkom stresu). Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost od pet ili šest bioloških replika  $\pm$  standardna pogreška. Rezultati koji se međusobno značajno razlikuju prema Newman-Keulsovom testu na razini  $P \leq 0,05$ , označeni su različitim slovima.

#### 4.11.2. Efektivni prinos fotosistema II ( $\Phi_{PSII}$ )

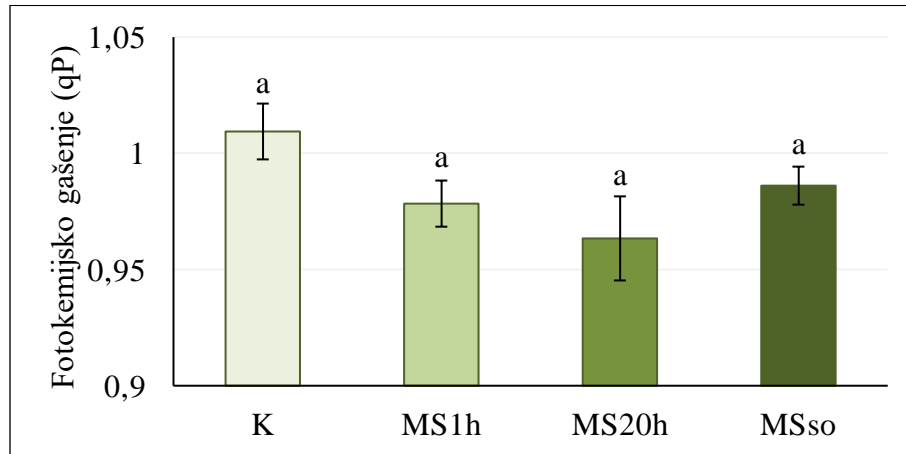
Mehanički stres doveo je do statistički značajnog povećanja efektivnog prinosa fotosistema II kod biljaka analiziranih 20 h nakon tretmana (0,62) i sistemskog odgovora analiziranog na istim biljkama (0,63), u odnosu na kontrolu koja je iznosila 0,58 (Slika 13).



**Slika 13.** Efektivni prinos fotosistema II ( $\Phi_{PSII}$ ) u biljaka *Arabidopsis thaliana* izloženih mehaničkom stresu od 5 N u trajanju od 20 sekundi. Analizirano je tkivo listova biljaka (K - kontrola, MS1h - 1 h nakon izlaganja mehaničkom stresu, MS20h - 20 h nakon izlaganja mehaničkom stresu, MSso - netretirani listovi 20 h nakon izlaganja biljaka MS20h mehaničkom stresu). Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost od pet ili šest bioloških replika  $\pm$  standardna pogreška. Rezultati koji se međusobno značajno razlikuju prema Newman-Keulsovom testu na razini  $P \leq 0,05$ , označeni su različitim slovima.

#### 4.11.3. Fotokemijsko gašenje fluorescencije (qP)

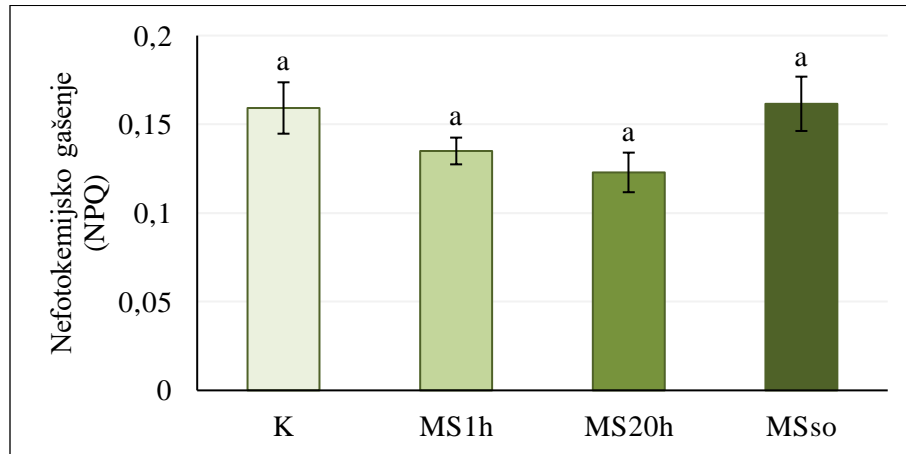
Mehanički podražaj od 5 N u trajanju od 20 sekundi u biljci *Arabidopsis thaliana* nije doveo do statistički značajne promjene fotokemijskog gašenja fluorescencije.



**Slika 14.** Fotokemijsko gašenje fluorescencije (qP) u biljaka *Arabidopsis thaliana* izloženih mehaničkom stresu od 5 N u trajanju od 20 sekundi. Analizirano je tkivo listova biljaka (K - kontrola, MS1h - 1 h nakon izlaganja mehaničkom stresu, MS20h - 20 h nakon izlaganja mehaničkom stresu, MSso - netretirani listovi 20 h nakon izlaganja biljaka MS20h mehaničkom stresu). Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost od pet ili šest bioloških replika  $\pm$  standardna pogreška. Rezultati koji se međusobno značajno razlikuju prema Newman-Keulsovom testu na razini  $P \leq 0,05$ , označeni su različitim slovima.

#### 4.11.4. Nefotokemijsko gašenje fluorescencije (NPQ)

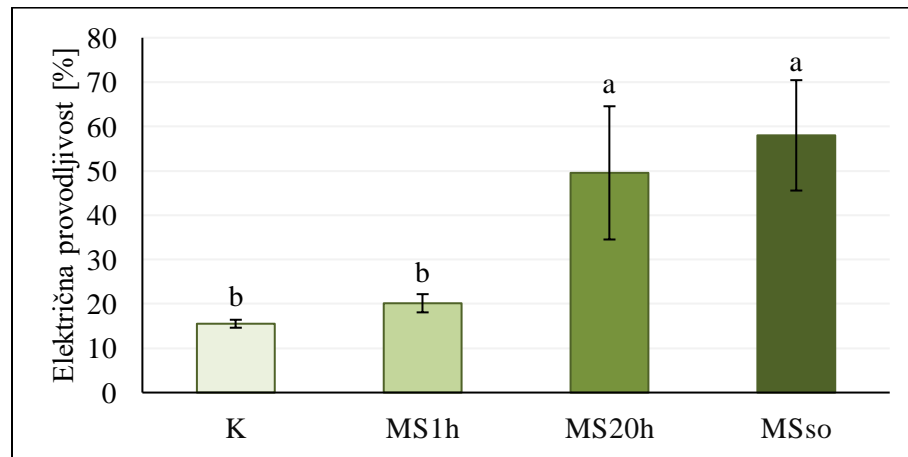
Izlaganje biljaka mehaničkom stresu nije dovelo do značajne promjene nefotokemijskog gašenja fluorescencije.



**Slika 15.** Nefotokemijsko gašenje fluorescencije (NPQ) u biljaka *Arabidopsis thaliana* izloženih mehaničkom stresu od 5 N u trajanju od 20 sekundi. Analizirano je tkivo listova biljaka (K - kontrola, MS1h - 1 h nakon izlaganja mehaničkom stresu, MS20h - 20 h nakon izlaganja mehaničkom stresu, MSso - netretirani listovi 20 h nakon izlaganja biljaka MS20h mehaničkom stresu). Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost od pet ili šest bioloških replika  $\pm$  standardna pogreška. Rezultati koji se međusobno značajno razlikuju prema Newman-Keulsovom testu na razini  $P \leq 0,05$ , označeni su različitim slovima.

#### 4.12. Propusnost plazmatske membrane

Nakon izlaganja biljaka vrste *Arabidopsis thaliana* mehaničkom podražaju od 5 N u trajanju od 20 sekundi, uočeno je statistički značajno povećanje propusnosti membrane kod biljaka analiziranih 20 h nakon tretmana (58,0%) i kod sistemskog odgovora (49,5%), u odnosu na kontrolu koja je iznosila 15,5%. (Slika 16).



**Slika 16.** Propusnost membrane u biljaka *Arabidopsis thaliana* izloženih mehaničkom stresu od 5 N u trajanju od 20 sekundi prikazana kao postotak. Analizirano je tkivo listova biljaka (K - kontrola, MS1h - 1 h nakon izlaganja mehaničkom stresu, MS20h - 20 h nakon izlaganja mehaničkom stresu, MSso - netretirani listovi 20 h nakon izlaganja biljaka MS20h mehaničkom stresu). Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost od pet ili šest bioloških replika  $\pm$  standardna pogreška. Rezultati koji se međusobno značajno razlikuju prema Newman-Keulsovom testu na razini  $P \leq 0,05$ , označeni su različitim slovima.

## 5. RASPRAVA

Manja zastupljenost istraživanja mehaničkog stresa u odnosu na broj istraživanja drugih vrsta biotičkih i abiotičkih stresnih uvjeta uočena je još prije 30 godina (Biddington, 1986). Pretraživanjem literature primijetile smo da je u tom području fiziologije stresa i dalje prisutan manji broj objavljenih radova. Nadalje, u radovima u kojima su objavljeni rezultati istraživanja mehaničkog stresa opisani su različiti mehanički podražaji poput savijanja, dodirivanja, potresanja, glađenja (Biddington, 1986), laganog pritiskanja (Tomas-Grau, 2018) i centrifugiranja (Garcês i sur., 2001). Pritom je bitno navesti da je većina korištenih mehaničkih podražaja provedena bez preciznog mjerenja intenziteta podražaja pa je rezultate teško usporediti s rezultatima našeg rada. Izdvojile bismo dva značajna istraživanja koja su obuhvatila širok spektar posljedica mehaničkog stresa, poput promjene koncentracije kalcija u stanici, propusnosti membrane (Benikhlef i sur., 2013), koncentracije ROS-a, genske ekspresije te rezistencije na infekciju sivom plijesni (*Botrytis cinerea*) (Benikhlef i sur., 2013; Tomas-Grau., 2018). Primijenjeni tretmani sastojali su se od blagog trljanja listova između palca i kažiprsta, nekoliko puta uzastopno. Budući da time nije definirana ni jakost ni trajanje primijenjene sile, otežana je usporedba s našim rezultatima. Kao primjer istraživanja s kojim bismo lakše usporedile svoje rezultate navele bismo rad u kojem su Ghosh i sur. (2017) primjenjivali vibraciju određene frekvencije i određeno vremensko trajanje s ciljem određivanja utjecaja mehaničkog stresa na propusnost membrane, učinkovitost fotosinteze i gensku ekspresiju kod biljke *Arabidopsis*. Nadalje, u istraživanjima mehaničkog stresa, rijetko su zastupljeni oni parametri koji su često mjereni prilikom istraživanja utjecaja drugih biotičkih i abiotičkih stresnih uvjeta, kao što su pokazatelji oksidativnog stresa poput lipidne peroksidacije, te antioksidativnog odgovora biljke, poput aktivnosti CAT, GPOD, APX i SOD. Stoga smo u svojem radu pokušale što preciznije primijeniti mehanički stres, uz mjerenje točne sile podražaja te odrediti njegov utjecaj na pojavu oksidacijskog stresa, aktivaciju antioksidacijskih mehanizama, propusnost membrane, koncentraciju pigmenata i fluorescenciju klorofila. Smatramo da upravo u mogućnosti kvantizacije mehaničkog stresa i ekstrapolacije rezultata na druge sustave te neistraženosti ovog područja biljne fiziologije leži značaj našeg rada.

Kao i ostale biljke, i vrsta *Arabidopsis thaliana* ima mogućnost odgovora na različite podražaje iz okoliša, poput mehaničkog stresa (Braam i Davis, 1990), što smo i potvrdile ovim istraživanjem. Izlaganjem navedene vrste kratkotrajnom mehaničkom podražaju (od 5 N u trajanju od 20 sekundi), detektirale smo značajan porast aktivnosti katalaze, superoksid dismutaze, lipidne peroksidacije, oksidacije fenola, koncentracije H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, propusnosti membrane te vrijednosti maksimalnog i

efektivnog prinosa PSII. Navedeni parametri pokazatelj su djelovanja mehaničkog stresa kao i odgovora, tj. obrane biljke.

Usljed izlaganja biljaka abiotičkom stresu, vodikov peroksid dovodi do lipidne peroksidacije što u nekim slučajevima može rezultirati i staničnom smrti. Naime, navode da povećanje koncentracije  $H_2O_2$  uzrokuje nagomilavanje  $\cdot OH$  preko Fentonovih reakcija, što dovodi do različitih staničnih oštećenja, a među ostalim i oštećenja membrana (Černý i sur., 2018). Osim toga,  $H_2O_2$  ima važnu ulogu u nepovoljnim okolišnim uvjetima jer povećana akumulacija vodikovog peroksida, u oštećenom tkivu može sudjelovati u prijenosu signala i na taj način posredovati u stjecanju otpornosti na abiotički i biotički stres kroz aktivaciju niza obrambenih mehanizama (Dat i sur., 2000). Uz to,  $H_2O_2$  može inducirati povećanu stabilnost stanične stijenke (Xiong i sur., 2015). Također,  $H_2O_2$  ima bitnu ulogu u sistemskom odgovoru koji omogućava aklimatizaciju na stresne okolišne uvjete (Si i sur., 2018). Dobiveni rezultati koji ukazuju na povećanu količinu  $H_2O_2$  20 h nakon tretmana u odnosu na kontrolu, u skladu su s poznatim ulogama koje  $H_2O_2$  ima u odgovoru na abiotički stres te s rezultatima dobivenim u drugim istraživanjima. Naime, značajno povećanje količine  $H_2O_2$  također je uočeno kod biljke *Arabidopsis thaliana* izložene ranjavanju (Orozco-Cardenas i Ryan, 1999) i napadu oblića (*Heterodera glycines*) (Waetzig i sur., 1999) kao i kod biljke *Fragaria ananassa* izložene blagom mehaničkom podražaju (Thomas-Grau i sur., 2017). Za razliku od naših rezultata gdje je povišena koncentracija  $H_2O_2$  zabilježena tek 20 h nakon tretmana, u navedenim je istraživanjima povišena koncentracija detektirana neposredno nakon izlaganja stresu. Mogući uzrok takve razlike u dobivenim rezultatima je korištenje podražaju različitog intenziteta. Iako nije statistički značajan, kod sistemskog odgovora vidljiv je trend povećanja količine  $H_2O_2$ . Mogući razlog tome leži u aktivaciji jasmonske kiseline koja indukcijom NADPH oksidaze potiče akumulaciju  $H_2O_2$ , što su Hu i suradnici (2009) pokazali na listovima rajčice. Pritom je bitno naglasiti da je JA izrazito bitna u odgovoru biljaka na napad patogena, kao i u odgovoru na ranjavanje (Hu i sur., 2009).

Kako bi odredili utjecaj mehaničkog stresa na pojavu oksidacijskog stresa u biljci *Arabidopsis thaliana* mjerili smo i stupanj lipidne peroksidacije. Pojava oksidacijskog stresa je osim kod povišenja koncentracije  $H_2O_2$ , vidljiva i u značajnom povećanju stupnja lipidne peroksidacije 1 h nakon tretmana, u odnosu na kontrolu, što ukazuje na oštećenja membrane. Iz radova drugih autora poznate su promjene strukturnih lipida kod biljke *Arabidopsis thaliana* 1 h nakon ozljeđivanja (Ling i sur., 2007) i izlaganja manjku vode (Vu i sur., 2014).



Uočeno povećanje propusnosti membrane poklapa se s već objavljenim rezultatima drugih autora. Benikhlef i sur. (2013) su također detektirali veću propusnost membrane nakon izlaganja biljke *Arabidopsis thaliana* mehaničkom stresu u obliku nježnog trljanja listića. Budući da lipidna peroksidacija može dovesti do povećanja propusnosti stanične membrane (Santos i sur., 2001; Zoeller i sur., 2012), rezultati našeg istraživanja nisu u potpunosti u skladu s očekivanjem. Značajno povećanje propusnosti membrane u odnosu na kontrolu, detektirano je 20 h nakon tretmana, kada je lipidna peroksidacija bila smanjena. No, to povećanje propusnosti membrane praćeno je porastom količine H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, što su također detektirali Benikhlef i sur. (2013). Moguće objašnjenje je da izmjereno povećanje membranske propusnosti nije posljedica same lipidne peroksidacije već i mehaničkih oštećenja nastalih tijekom tretmana. Povećana propusnost membrana kod sistemskog odgovora, analiziranog na biljkama 20 h nakon tretmana, može se objasniti mehanizmom kojeg su predložili Geitman i Gril (2018). Ta se reakcija temelji na brznoj inicijaciji i širenju električnih signala. Prilikom fizičkih oštećenja stanica, koja nastaju ranjavanjem i gorenjem biljnog tkiva, ključnu ulogu u nastanku sistemskog odgovora, uz hidraulički pritisak, imaju upravo električni signali, odnosno transmisija membranskog potencijala. Naime, signal se do udaljenih listova brzo i efektivno provodi istjecanjem iona iz stanica oštećenih mehaničkim podražajem (Geitman i Gril, 2018). Nije u potpunosti jasan način na koji spomenuti električni signali uzrokuju povećanje permeabilnosti udaljenih tkiva, ali jedna od pretpostavki je da uzrokuju povećanu proizvodnju ROS-a što posljedično dovodi i do povećane membranske propusnosti (Benikhlef i sur., 2013).

Pojačana aktivnost antioksidacijskih enzima CAT, SOD, GPOD i količine fenola također ukazuje na prisutnost oksidacijskog stresa u stanicama nakon djelovanja mehaničkog podražaja. SOD katalizira konverziju superoksidnog aniona u vodikov peroksid (Kliebenstein i sur., 1998), dok katalaza i peroksidaza prevode vodikov peroksid do vode (Erofeeva, 2015). Detektirano značajno povećanje aktivnosti enzima SOD i CAT kod svih biljaka izloženih mehaničkom stresu u odnosu na kontrolu su u skladu s predloženim objašnjenjem izmjerenih vrijednosti koncentracija H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i stupnja lipidne peroksidacije. Dok je aktivnost navedenih enzima značajno porasla u svim tretmanima (1h i 20h), značajni porast količine H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> detektiran je tek 20 h nakon tretmana. Iz toga možemo zaključiti da promjena količine H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nije uvjetovana isključivo aktivnošću antioksidacijskih enzima. Zanimljivo je da istraživanja djelovanja različitih stresnih uvjeta ukazuju i na smanjenje i na povećanje aktivnosti enzima SOD i CAT. Lu i sur. (2007) su detektirali povišenu aktivnost CAT u Croftonovoj travi nakon izlaganja niskim temperaturama, a nižu aktivnost u biljkama izloženim suši i višim temperaturama. Osim toga, Guan i Scandalios (2000) su detektirali povišenu aktivnost CAT u listovima kukuruza nakon ranjavanja tkiva, dok su Zhang

i Krikham (1994) detektirali sniženu aktivnost CAT u riži, juti i suncokretu nakon izlaganja vodnom stresu. Također, Lu i sur. (2007) su detektirali povišenu aktivnost enzima SOD u biljkama Croftonove trave nakon izlaganja uvjetima manjka vode te sniženoj i povišenoj temperaturi, dok su Zhang i Kirkham (1994) detektirali sniženu aktivnost SOD nakon vodnog stresa. Moguće objašnjenje ovih rezultata je da pojedine vrste abiotičkog stresa uzrokuju različite posljedice na aktivnost antioksidacijskih enzima u biljkama. Nadalje, aktivnosti GPOD se u našim istraživanjima nije značajno razlikovala od kontrole. Povišena aktivnost tog enzima detektirana je kod biljke *Sedum telephium ssp. maximum* nakon izlaganja visokim temperaturama (Ardelen i sur., 2014) te kod Croftonove trave nakon izlaganja niskim temperaturama i suši (Lu i sur., 2007). U našem istraživanju zanimljiv je izostanak aktivnosti enzima APX, budući da također ima značajnu ulogu u odgovoru biljaka na stresne faktore odnosno u obrani od oksidacijskog stresa (Afzal i sur., 2014). No, Chang i sur. (2004) također nisu detektirali aktivnost enzima APX kod biljke *Arabidopsis thaliana* izložene ranjavanju, a detektirana je u istoj vrsti biljaka nakon izlaganja kombiniranim tretmanu (ranjavanju i svjetlosnom stresu). Moguće objašnjenje navedenog istraživanja i naših rezultata je to da APX, koja je smještena u kloroplastima, nema izraziti značaj u obrani biljaka na mehanički stres te stoga aktivnost tog enzima nije detektirana. Također je moguće da su korišteni mehanički podražaji bili nedovoljnog intenziteta za aktivaciju ovog enzima.

Fenoli su sekundarni metaboliti koji obuhvaćaju velik broj različitih spojeva od kojih neki imaju značajnu ulogu u obrani od oksidacijskog stresa. Kod biljaka izloženih mehaničkom stresu smo, u odnosu na kontrolne biljke, detektirali značajni pad koncentracije fenola 1 h nakon tretmana. Dobiveni rezultati nisu u skladu s očekivanjem i prijašnjim istraživanjima. Jacob-Velazquez i sur. (2011) detektirali su povišenu koncentraciju fenola kod mrkve u odnosu na kontrolu, 48 h nakon ranjavanja. Moguće objašnjenje je da su fenoli koji su bili prisutni u stanici prije i tijekom tretmana sudjelovali u reakcijama detoksifikacije ROS-a nastalih neposredno nakon tretmana. Naime, Neill i Gould (2003) pokazali su da antocijani, koji najviše doprinose antioksidativnom svojstvu fenola, uklanjaju superoksidni anion. Stoga je moguće da je niska koncentracija fenola 1 h nakon tretmana posljedica njihovog sudjelovanja u detoksifikaciji superoksidnog iona, što je posljedično dovelo do smanjenja količine H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Zanimljivo je da u uzorcima analiziranim 20 h nakon tretmana te kod sistemskog odgovora, koncentracija fenola poprima vrijednost sličnu kontroli, te čak pokazuje trend povišenja u odnosu na kontrolu. Jedan od mogućih razloga ovog rezultata je djelovanje JA, za koju je poznato da se aktivira određeno vrijeme nakon izlaganja stresnim uvjetima (Vasquez-Medrano i sur., 2018). Dosadašnja istraživanja ukazuju na to da JA inducira aktivnost fenilalanin amonij-lijaze (PAL, engl. *phenylalanine ammonia-lyase*) i halkon sintaze, enzima nužnih za

biosintezu nekih skupina fenolnih spojeva (Hu i sur., 2009). Uz to, Thorpe i Hall (1984) detektirali su povećanu aktivnost enzima PAL uslijed ranjavanja. Nadalje, zanimljiva je pretpostavljena veza dobivenih rezultata koncentracije fenola, količine H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i stupnja lipidne peroksidacije 20 h nakon tretmana. Trend povećanja koncentracije fenola praćen je povećanim udjelom H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i smanjenjem stupnja lipidne peroksidacije. Mogući razlog tome je inhibicija Fentonovih i Haber-Weiss reakcija uslijed vezanja iona prijelaznih metala pomoću fenola (Arora i sur., 2000).

Dok u biosintezi fenola glavnu ulogu ima PAL, u njegovoj oksidaciji, odnosno degradaciji, ključnu ulogu imaju dva enzima: polifenol oksidaza i polifenol peroksidaza (POD, engl. *polyphenol peroxidase*). Međutim, gen za PPO nije pronađen u vrstama *Arabidopsis thaliana* i *A. lyrata*, niti u njihovom srodniku – vrsti *Brassica napus*. Budući da je gen pronađen u papaji, Tran i suradnici (2012) zaključili su da je zasigurno zajednički predak reda Brassicales i Malvales sadržavao gen za PPO kojeg su predci roda *Arabidopsis* i njihovi srodnici divergencijom izgubili. No, značajno povećanje stope oksidacije fenola u odnosu na kontrolu, zabilježeno kod biljaka analiziranih 1 h i 20 h nakon tretmana, kao i kod sistemskog odgovora ukazuje na aktivnost i prisutnost enzima koji oksidiraju fenole. Povećana aktivnost oksidacijskih enzima u nepovoljnim okolišnim uvjetima je također pokazana u istraživanju utjecaja povišenih koncentracija kadmija u biljci *A. thaliana* (Mianabadi i sur., 2009). Na temelju saznanja, da je u *Arabidopsis thaliana* otkiveno čak 17 gena koji kodiraju za enzim lakazu, koji je strukturno i funkcionalno sličan PPO (Tran i sur., 2012), postoji mogućnost da su u uročnjaku oksidaciju fenola preuzele lakaze. U prilog ovom objašnjenju idu mnoga *in vitro* istraživanja koja su potvrdila funkciju lakaze u oksidaciji fenola (Turlapati i sur., 2011). Boeckx i sur. (2015b) su istaknuli da lakaza nema kloroplastni tranzitni peptid (TP, engl. *transit peptide*) koji je potreban za uspješan ciljani unos u kloroplast gdje je PPO najviše zastupljen, te da je stoga malo vjerojatno ta lakaza u potpunosti nadoknađuje nedostatak PPO. Međutim, i dalje je moguće da lakaze doprinose oksidaciji fenola budući da se ona događa uslijed fizičkih oštećenja organela, odnosno vakuola (Tran i sur., 2012).

Herde i sur. (1999) su istraživanjem učinka mehaničkog ranjavanja listova rajčice na sadržaj pigmenata i fluorescenciju klorofila utvrdili sličnost s dobro istraženim učinkom svjetlosnog stresa. Stoga su dobiveni rezultati utjecaja mehaničkog stresa na fotoisntetske parametre u ovom radu uglavnom uspoređivani s rezultatima istraživanja učinka svjetlosnog stresa. Maksimalni prinos PSII je najčešće korišten indikator stresa koji govori o učinkovitosti fotosinteze, dok efektivni prinos PSII pokazuje koliki je udio svjetlosti apsorbirane od strane klorofila na PSII iskorišten za fotokemijske reakcije (Maxwell i Johnson, 2000). Vrijednosti maksimalnog i efektivnog prinosa PSII međusobno se slažu u trendovima porasta i pada. Zabilježeni značajni porast vrijednosti

maksimalnog i efektivnog prinosa PSII kod biljaka analiziranih 20 h nakon tretmana kao i odgovarajućeg sistemskog odgovora upućuje na određeni stupanj povećanja tolerancije stresa te veću sveukupnu učinkovitost fotosinteze. Ovaj rezultat je dosta zanimljiv budući da su brojna dosadašnja istraživanja zamijetila isključivo pad maksimalnog i efektivnog prinosa PSII uslijed izlaganja biljaka stresnim uvjetima (Qing-Ming i sur., 2008; Kim i Portis, 2015). Poznato je da biljke koje su izložene stresu često reagiraju promjenom koncentracije i sastava fotosintetskih pigmenta (Walters 2005), te povećanjem koncentracije fenolnih spojeva kao što su flavonoidi, antocijani, fenolne kiseline i tanini (Close i McArthur 2002). Međutim, u našem istraživanju nije uočena značajna promjena udjela pojedinih fotosintetskih pigmenta. Iz toga možemo zaključiti da korišteni mehanički podražaj nije bio dovoljnog intenziteta da bi inducirao biosintezu fotosintetskih pigmenta.

U našim smo pokusima utvrdili da primjena mehaničkog podražaja na listove biljke nije značajno utjecala na fotokemijsko gašenje kao niti na nefotokemijsko gašenje fluorescencije. Fotokemijsko gašenje je mjera smanjenja fluorescencije zbog učinkovitog prijenosa elektrona u lancu prijenosa elektrona u kloroplastima. Nefotokemijsko gašenje je povezano s procesima zaštite, najčešće od svjetlosnog stresa, na temelju rasipanja suviška energije u obliku topline. U našem pokusu niti jedan od spomenutih parametara nije se razlikovao od kontrole. Chang i sur. (2004.) pokazali su da ranjavanje listova uročnjaka dovodi do smanjenih NPQ vrijednosti dok su Kim i Portis (2005) također potvrdili trend smanjivanja vrijednosti prilikom izlaganja biljaka toplotnom stresu. No, više vrijednosti NPQ upućuju na povišenu razinu zaštite od fotoinhibicije, a budući da u ovom radu biljke nisu bile izložene svjetlosti visokog intenziteta koja uzrokuje pojačanu fotoinhibiciju, dobivene niže vrijednosti NPQ su u skladu s očekivanjem.

Mnoga istraživanja ukazuju na važnost antioksidacijskog sustava u toleranciji biljaka na različite stresne faktore (Fecht-Christoffers i sur., 2003). Provedena istraživanja ukazuju na postojanje veze između ranjavanja i rezistencije na patogene (Castro-Mercado i sur., 2009). Uočeno je da geni koji kodiraju za katalazu omogućavaju rezistenciju biljaka na manjak vode, napad patogena i stres uzrokovan solima i metalima (Afzal sur., 2014). Tsuji i Donnelly (2000) su izlaganjem biljke *Arabidopsis thaliana* ranjavanju i patogenu *Pseudomonas syringae* pv. *Syringae* inducirali povećanu aktivnost peroksidaza. Iz svega navedenog, kao i na temelju rezultata dobivenih u ovom istraživanju, odnosno zamijećene povećane aktivnosti nekih antioksidacijskih enzima, predlažemo detaljnije istraživanje primjene mehaničkog stresa u aklimatizaciji. Mišljenja smo da na temelju dosadašnjih istraživanja postoje dovoljno čvrste pretpostavke da bi se uporabom mehaničkog stresa kao mjere aklimatizacije biljaka mogla povećati proizvodnja i otpornost određenih biljnih vrsta na

nepovoljne okolišne uvjete. Osim toga, bilo bi korisno istražiti može li se aklimatizacijom biljaka na mehanički stres smanjiti potreba za upotrebom gnojiva, čija je proizvodnja i primjena nepovoljna za okoliš. Željele bismo završiti ovaj rad sa mišlju da saznanja dobivena istraživanjem mehaničkog stresa mogu biti poticaj za daljnja istraživanja koja bi mogla doprinijeti razvijanju novih načina povećanja prinosa biljaka i rješavanju izazova nedostatka hrane.

## 6. ZAKLJUČAK

U ovom radu istraživale smo utjecaj mehaničkog podražaja od 5 N u trajanju od 20 sekundi na biljku *Arabidopsis thaliana*. U tu svrhu mjerile smo parametre oksidacijskog stresa, antioksidacijskog odgovora, propusnost membrane, koncentraciju pigmenta i učinkovitost fotosinteze. Na temelju provedenog istraživanja može se zaključiti sljedeće:

- 1 h nakon izlaganja biljaka mehaničkom stresu uočen je značajan porast stupnja lipidne peroksidacije i značajan porast aktivnosti superoksid dismutaze i katalaze te značajno smanjenje ukupne koncentracije fenola, u odnosu na kontrolu, što ukazuje na pojavu oksidacijskog stresa i aktivaciju antioksidacijskih mehanizama
- 20 h nakon izlaganja biljaka mehaničkom stresu značajno je porasla količina vodikovog peroksida, stopa oksidacije fenola, aktivnost katalaze i superoksid dismutaze, maksimalni i efektivni prinos fotosistema II te propusnost plazmatske membrane, u odnosu na kontrolu, što također upućuje na pojavu oksidacijskog stresa i djelovanje antioksidacijskih enzima.
- Na temelju usporedbe tretiranih grupa biljaka analiziranih u različito vrijeme nakon tretmana (1 i 20 h) može se zaključiti kako je jedino povišena aktivnost katalaze i superoksid dismutaze prisutna kod obje grupe. Naime, značajan porast lipidne peroksidacije te smanjenje ukupne koncentracije fenola karakterističan je za grupu biljaka analiziranih neposredno nakon izlaganja mehaničkom podražaju (1 h), dok je značajan porast količine vodikovog peroksida, stope oksidacije fenola, maksimalnog i efektivnog prinosa fotosistema II kao i povećanje propusnosti membrane karakteristično za grupu biljaka analiziranih 20 h nakon izlaganja biljaka mehaničkom podražaju.
- Na prisutnost sistemskog odgovora (20 h nakon izlaganja biljaka mehaničkom stresu) upućuje značajan porast stope oksidacije fenola, aktivnosti katalaze i superoksid dismutaze, maksimalnog i efektivnog prinosa fotosistema II te propusnosti plazmatske membrane, u odnosu na kontrolu u netretiranom tkivu. Može se uočiti da značajna promjena navedenih parametara u sistemskom odgovoru prati promjenu istih u tretiranom tkivu, 20 h nakon izlaganja tretmanu, osim u slučaju izmjerene količine vodikovog peroksida.

## 7. ZAHVALE

*Od srca se zahvaljujemo svojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Željki Vidaković-Cifrek na pruženoj pomoći, savjetima i strpljenju, kako u eksperimentalnom dijelu, tako i tijekom pisanja ovoga rada.*

*Uz to, veliko hvala i izv. prof. dr. sc. Mirti Tkalec i mag. biol. exp. Sandri Vitko na svojoj pomoći, korisnim savjetima i nesebičnom prenošenju znanja pri provođenju ovoga istraživanja.*

*Također veliko hvala Martini što je uvijek bila naša desna ruka te bez koje izrada ovog rada zasigurno ne bi prošla tako zanimljivo i zabavno.*

*Zahvaljujemo se i svim ostalim članovima Botaničkog zavoda na ukazanom razumijevanju i strpljenju.*

*Iznimno ugodna atmosfera koja je vladala u laboratoriju zasigurno je omogućila da izrada ovog rada bude jedno jako poučno, veselo i lijepo iskustvo.*

## 8. POPIS LITERATURE

- Abdi, K., Esmaeili, N. i Ebrahimzadeh, H. (2017). Correlation between polyphenol oxidase (PPO) activity and total phenolic contents in *Crocus sativus* L. corms during dormancy and sprouting stages. *Pharmacognosy Magazine*, 13(51), 519.
- Aebi, H. (1984). Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*, 105, 121-126.
- Afzal, F., Khurshid, R., Ashraf, M. i Kazi, A.G. (2014). Reactive oxygen species and antioxidants in response to pathogens and wounding. *Oxidative Damage to Plants*, 397-424.
- Aluru, M., Zola, J., Foudree, A. i Rodermel, S. (2009). Chloroplast photooxidation-induced transcriptome reprogramming in *Arabidopsis thaliana* white leaf sectors. *Plant Physiology*, 150(2), 904-923.
- Alscher, R.G., Erturk, N. i Heath, L.S. (2002). Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *Journal of experimental botany*, 53(372), 1331-1341.
- Anjum, N.A., Sharma, P., Gill, S.S., Hasanuzzaman, M., Khan, E.A., Kachhap, K., Mohamed, A.A., Thangavel, P., Devi, G.D., Vasudhevan, P. i Sofo, A. (2016). Catalase and ascorbate peroxidase-representative H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-detoxifying heme enzymes in plants. *Environmental science ipollution research*, 23(19), 19002-19029.
- Apel, K. i Hirt, H. (2004). Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology*, 55(1), 373-399.
- Arabidopsis Genome Initiative (2000). Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, 408(6814), 796-815.
- Armstrong, G. i Hearst, J. (1996). Carotenoids 2: Genetics and molecular biology of carotenoid pigment biosynthesis. *The FASEB Journal*, 10(2), 228-237.
- Arora, A., Byrem, T., Nair, M. i Strasburg, G. (2000). Modulation of liposomal membrane fluidity by flavonoids and isoflavonoids. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 373(1), 102-109.
- Arora, A., Sairam, R. K. i Srivastava, G. C. (2002). Oxidative stress and antioxidative system in plants. *Current Science*, 1227-1238.
- Asada, K., (1992). Ascorbate peroxidase – a hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. *Physiologia Plantarum*, 85(2), 235-241.



- Bajji, M., Lutts, S. i Kinet, J. (2001). Physiological changes after exposure to and recovery from polyethylene glycol-induced water deficit in callus cultures issued from durum wheat (*Triticum durum* Desf.) cultivars differing in drought resistance. *Journal of Plant Physiology*, 156(1), 75-83.
- Benikhlef, L., L'Haridon, F., Abou-Mansour, E., Serrano, M., Binda, M., Costa, A., Lehmann, S. i Métraux, J. (2013). Perception of soft mechanical stress in Arabidopsis leaves activates disease resistance. *BMC Plant Biology*, 13(1), 133.
- Biddington, N. (1986). The effects of mechanically-induced stress in plants? *Plant Growth Regulation*, 4(2), 103-123.
- Blokhina, O. (2003). Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Annals of Botany*, 91(2), 179-194.
- Boeckx, T., Webster, R., Winters, A., Webb, K., Gay, A. i Kingston-Smith, A. (2015a). Polyphenol oxidase-mediated protection against oxidative stress is not associated with enhanced photosynthetic efficiency. *Annals of Botany*, 116(4), 529-540.
- Boeckx, T., Winters, A., Webb, K. i Kingston-Smith, A. (2015b). Polyphenol oxidase in leaves: is there any significance to the chloroplastic localization?. *Journal of Experimental Botany*, 66(12), 3571-3579.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
- Braam, J. i Davis, R.W., (1990). Rain-, wind-, and touch-induced expression of calmodulin and calmodulin-related genes in Arabidopsis. *Cell*, 60(3), 357-364.
- Buchanan, B., Gruissem, W. i Jones, R. (2015). Biochemistry and molecular biology of plants. 2nd ed. *John Wiley and Sons*, 1033-1035.
- Castro-Mercado, E., Martinez-Diaz, Y., Roman-Tehandon, N. i Garcia-Pineda, E., (2009). Biochemical analysis of reactive oxygen species production and antioxidative responses in unripe avocado (*Persea americana* Mill var Hass) fruits in response to wounding. *Protoplasma*, 235(1-4), 67-76.

- Catalá, A. (2006). An overview of lipid peroxidation with emphasis in outer segments of photoreceptors and the chemiluminescence assay. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 38(9), 1482-1495.
- Caverzan, A., Passaia, G., Rosa, S.B., Ribeiro, C.W., Lazzarotto, F. i Margis-Pinheiro, M. (2012). Plant responses to stresses: role of ascorbate peroxidase in the antioxidant protection. *Genetics and molecular biology*, 35(4), 1011-1019.
- Chance, B., i Maehly, A. (2006). The Assay of Catalases and Peroxidases. *Methods of Biochemical Analysis*, 357-424.
- Chang, C.C.C., Ball, L., Fryer, M.J., Baker, N.R., Karpinski, S. i Mullineaux, P.M., (2004). Induction of ascorbate peroxidase 2 expression in wounded Arabidopsis leaves does not involve known wound-signalling pathways but is associated with changes in photosynthesis. *The Plant Journal*, 38(3), 499-511.
- Choudhury, F., Rivero, R., Blumwald, E. i Mittler, R. (2017). Reactive oxygen species, abiotic stress and stress combination. *The Plant Journal*, 90(5), 856-867.
- Close, D.C. i McArthur, C., 2002. Rethinking the role of many plant phenolics—protection from photodamage not herbivores?. *Oikos*, 99(1), 166-172.
- Corpas, F.J., Barroso, J.B., Palma, J.M. i Rodriguez-Ruiz, M. (2017). Plant peroxisomes: a nitro-oxidative cocktail. *Redox biology*, 11, 535-542.
- Černý, M., Habánová, H., Berka, M., Luklová, M. i Brzobohatý, B. (2018). Hydrogen Peroxide: Its Role in Plant Biology and Crosstalk with Signalling Networks. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(9), 2812.
- Demidchik, V. (2015). Mechanisms of oxidative stress in plants: From classical chemistry to cell biology. *Environmental and Experimental Botany*, 109, 212-228.
- Desikan, R., A-H Mackerness, S., Hancock, JT. i Neill, SJ. (2001.) Regulation of the Arabidopsis transcriptome by oxidative stress. *Plant Physiology*, 127, 159-72.
- Dowling, D. i Simmons, L. (2009). Reactive oxygen species as universal constraints in life-history evolution. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 276(1663), 1737-1745
- Drażkiewicz, M., Skórzyńska-Polit, E. i Krupa, Z. (2004). Copper-induced oxidative stress and antioxidant defence in Arabidopsis thaliana. *BioMetals*, 17(4), 379-387.

- Erofeeva, E.A. (2015). Dependence of guaiacol peroxidase activity and lipid peroxidation rate in drooping birch (*Betula pendula* Roth) and Tillet (*Tilia cordata* Mill) leaf on motor traffic pollution intensity. *Dose-Response: An International Journal*, 1-6.
- Fancev, E. (2010). Sustav za mjerenje sile vibracijskog stimulatora. Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu.
- Foyer, C., Ruban, A. i Noctor, G. (2017). Viewing oxidative stress through the lens of oxidative signalling rather than damage. *Biochemical Journal*, 474(6), 877-883.
- Freeman, B. i Beattie, G. (2008). An Overview of Plant Defenses against Pathogens and Herbivores. *The Plant Health Instructor*.
- Fujita, M., Fujita, Y., Noutoshi, Y., Takahashi, F., Narusaka, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K. i Shinozaki, K. (2006). Crosstalk between abiotic and biotic stress responses: a current view from the points of convergence in the stress signaling networks. *Current Opinion in Plant Biology*, 9(4), 436-442.
- Gadjev, I., Stone, J. i Gechev, T. (2008). Chapter 3: Programmed Cell Death in Plants. *International Review of Cell and Molecular Biology*, 87-144.
- Garcês, H., Durzan, D. i Pedrosa, M.C., (2001). Mechanical stress elicits nitric oxide formation and DNA fragmentation in *Arabidopsis thaliana*. *Annals of Botany*, 87(5), 567-574.
- Geitmann, A. and Gril, J. (2018). Molecular Mechanisms of Mechanosensing and Mechanotransduction *Plant biomechanics*. 1st ed. Springer, 375-382.
- Ghosh, R., Gururani, M.A., Ponpandian, L.N., Mishra, R.C., Park, S.C., Jeong, M.J. and Bae, H. (2017). Expression analysis of sound vibration-regulated genes by touch treatment in *Arabidopsis*. *Frontiers in plant science*, 8, 100.
- Gill, S. i Tuteja, N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48(12), 909-930.
- Green, T. i Ryan, C. (1972). Wound-induced proteinase inhibitor in plant leaves: a possible defense mechanism against insects. *Science*, 175(4023), 776-777.
- Guan, L.M. i Scandalios, J.G. (2000). Hydrogen peroxide-mediated catalase gene expression in response to wounding. *Free Radical Biology and Medicine*, 28(8), 1182-1190.

- Hasanuzzaman, M., Nahar, K. and Fujita, M. (2013). Extreme Temperature Responses, Oxidative Stress and Antioxidant Defense in Plants. *Abiotic Stress - Plant Responses and Applications in Agriculture*. IntechOpen.
- Hatsugai, N. i Katagiri, F. (2018). Quantification of plant cell death by electrolyte leakage assay. *Bio-protocol*, 8(5).
- Havaux, M. (2013). Carotenoid oxidation products as stress signals in plants. *The Plant Journal*, 79(4), 597-606.
- Havaux, M. (1998). Carotenoids as membrane stabilizers in chloroplasts. *Trends in Plant Science*, 3(4), 147-151.
- Heil, M. i Bostock, R. (2002). Induced systemic resistance (ISR) against pathogens in the context of induced plant defences. *Annals of Botany*, 89(5), 503-512.
- Herde, O., Peña-Cortés, H., Fuss, H., Willmitzer, L. i Fisahn, J. (1999). Effects of mechanical wounding, current application and heat treatment on chlorophyll fluorescence and pigment composition in tomato plants. *Physiologia Plantarum*, 105(1), 179-184.
- Hu, X., Wansha, L., Chen, Q. i Yang, Y. (2009). Early signals transduction linking the synthesis of jasmonic acid in plant. *Plant signaling & behavior*, 4(8), 696-697
- Huber, A.E. i Bauerle, T.L. (2016) Long-distance plant signaling pathways in response to multiple stressors: the gap in knowledge. *Journal of Experimental Botany*, 67(7), 2063-2079.
- Humadi, S.S. i Istudor, V. (2009). *Lythrum salicaria* (purple loosestrife). Medicinal use, extraction and identification of its total phenolic compounds. *Farmacia*, 57(2), 192-200..
- Iida, H. (2014). Mugifumi, a beneficial farm work of adding mechanical stress by treading to wheat and barley seedlings. *Frontiers in Plant Science*, 5
- Jacobo-Velázquez, D.A., Martínez-Hernández, G.B., del C. Rodríguez, S., Cao, C.M. and Cisneros-Zevallos, L. (2011). Plants as biofactories: physiological role of reactive oxygen species on the accumulation of phenolic antioxidants in carrot tissue under wounding and hyperoxia stress. *Journal of agricultural and food chemistry*, 59(12), 6583-6593.
- Jaffe, M. i Forbes, S. (1993). Thigmomorphogenesis: the effect of mechanical perturbation on plants. *Plant Growth Regulation*, 12(3), 313-324.

- Johnson, M., Havaux, M., Triantaphylidès, C., Ksas, B., Pascal, A., Robert, B., Davison, P., Ruban, A. i Horton, P. (2007). Elevated zeaxanthin bound to oligomeric LHCII enhances the resistance of Arabidopsis to photooxidative stress by a lipid-protective, antioxidant Mechanism. *Journal of Biological Chemistry*, 282(31), 22605-22618.
- Kim, K. i Portis, A. (2005). Temperature dependence of photosynthesis in Arabidopsis plants with modifications in Rubisco activase and membrane fluidity. *Plant and Cell Physiology*, 46(3), 522-530.
- Kim, M., Hyun, J., Kim, J., Park, J., Kim, M., Kim, J., Lee, S., Chun, S. i Chung, I. (2007). Relationship between phenolic compounds, anthocyanins content and antioxidant activity in colored barley germplasm. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(12), 4802-4809.
- Kliebenstein, D.J., Monde, R.A. i Last, R.L. (1998). Superoxide dismutase in Arabidopsis: an eclectic enzyme family with disparate regulation and protein localization. *Plant physiology*, 118(2), 637-650.
- Koornneef, M. i Meinke, D. (2010). The development of Arabidopsis as a model plant. *The Plant Journal*, 61(6), 909-921.
- Lavid, N., Schwartz, A., Yarden, O. i Tel-Or, E. (2001). The involvement of polyphenols and peroxidase activities in heavy-metal accumulation by epidermal glands of the waterlily (Nymphaeaceae). *Planta*, 212(3), 323-331.
- Lichtenthaler, H. (1988). In Vivo Chlorophyll Fluorescence as a Tool for Stress Detection in Plants. U: Lichtenthaler H.K. (ur.) *Applications of Chlorophyll Fluorescence in Photosynthesis Research, Stress Physiology, Hydrobiology and Remote Sensing*, str. 129-142.
- Lim, B., Nagao, A., Terao, J., Tanaka, K., Suzuki, T. i Takama, K. (1992). Antioxidant activity of xanthophylls on peroxy radical-mediated phospholipid peroxidation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism*, 1126(2), 178-184.
- Ling, L., Li, W. i Xu, Z. (2007). Profiling the changes of lipid molecular species in response to wounding in Arabidopsis thaliana (Cruciferae) by ESI-MS/MS. *Acta Botanica Yunnanica*, 29 (6), 671-676

- Lu, P., Sang, W.G. i Ma, K.P. (2007). Activity of stress-related antioxidative enzymes in the invasive plant crofton weed (*Eupatorium adenophorum*). *Journal of Integrative Plant Biology*, 49(11), 1555-1564.
- Lukaszuk, E., Rys, M., Możdżeń, K., Stawoska, I., Skoczowski, A. i Ciereszko, I. (2016). Photosynthesis and sucrose metabolism in leaves of *Arabidopsis thaliana* aos, ein4 and rcd1 mutants as affected by wounding. *Acta Physiologiae Plantarum*, 39(1).
- Lutts, S. (1996). NaCl-induced senescence in leaves of rice (*Oryza sativa* L.) cultivars differing in salinity resistance. *Annals of Botany*, 78(3), 389-398.
- Mafakheri, A., Siosemardeh, A., Bahramnejad, B., Struik, P. C. i Sohrabi, Y. (2011). Effect of drought stress and subsequent recovery on protein, carbohydrate contents, catalase and peroxidase activities in three chickpea (*Cicer arietinum*) cultivars. *Australian Journal of Crop Science*, 5, 1255-1260.
- Maxwell, K. i Johnson, G. (2000). Chlorophyll fluorescence - a practical guide. *Journal of Experimental Botany*, 51, 659-668.
- Meinke, D.W., Cherry, J.M., Dean, C., Rounsley, S.D. i Koornneef, M. (1998). *Arabidopsis thaliana*: a model plant for genome analysis. *Science*, 282(5389), 662-682.
- Mianabadi, M., Saffar, A. i Bagherieh Najjar, M. (2009). Activity of Antioxidant Enzymes in Response to Cadmium in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Sciences*, 9(1), 44-50.
- Michalak, A. (2006). Phenolic compounds and their antioxidant activity in plants growing under heavy metal stress. *Polish Journal of Environmental Studies*, 15(4).
- Miller, G., Schlauch, K., Tam, R., Cortes, D., Torres, M.A., Shulaev, V., Dangl, J.L. i Mittler, R. (2009). The plant NADPH oxidase RBOHD mediates rapid systemic signaling in response to diverse stimuli. *Science Signaling*, 2, ra45.
- Mitchell-Olds, T. (2001). *Arabidopsis thaliana* and its wild relatives: a model system for ecology and evolution. *Trends in Ecology & Evolution*, 16(12), 693-700.
- Mittler, R. (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in plant science*, 7(9), 405-410.

- Nakano, Y. i Asada, K. (1981). Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant and cell physiology*, 22(5), 867-880.
- Neill, S.O., Gould, K.S., Kilmartin, P.A., Mitchell, K.A. i Markham, K.R. (2002). Antioxidant activities of red versus green leaves in *Elatostema rugosum*. *Plant, Cell & Environment*, 25(4), 539-547.
- Noctor, G., Lelarge-Trouverie, C. i Mhamdi, A. (2015). The metabolomics of oxidative stress. *Phytochemistry*, 112, 33-53
- Orozco-Cardenas, M. i Ryan, C.A. (1999). Hydrogen peroxide is generated systemically in plant leaves by wounding and systemin via the octadecanoid pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(11), 6553-6557.
- Read, J. i Stokes, A. (2006). Plant biomechanics in an ecological context. *American Journal of Botany*, 93(10), 1546-1565.
- Rivero, L., Scholl, R., Holomuzki, N., Crist, D., Grotewold, E. i Brkljacic, J. (2013). Handling Arabidopsis Plants: Growth, Preservation of Seeds, Transformation, and Genetic Crosses. *Methods in Molecular Biology*, 3-25.
- Roger, M. J. R. i Weiss, O. (2001): Fluorescence techniques. U: Roger M. J. (ur.) *Handbook of Plant Ecophysiology Techniques*. Springer Netherlands, str. 155-171.
- Saffar, A., Bagherieh Najjar, M.B. i Mianabadi, M. (2009). Activity of antioxidant enzymes in response to cadmium in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Sciences*, 9(1), 44-50.
- Santos, C., Campos, A., Azevedo, H. i Caldeira, G. (2001). In situ and in vitro senescence induced by KCl stress: nutritional imbalance, lipid peroxidation and antioxidant metabolism. *Journal of Experimental Botany*, 52(355), 351-360.
- Schillmiller, A.L. i Howe, G.A. (2005). Systemic signaling in the wound response. *Current opinion in plant biology*, 8(4), 369-377.
- Serino, G. i Marzi, D. (2018). *Arabidopsis thaliana* as an Experimental Organism. *eLS*, 1-9.
- Si, T., Wang, X., Zhao, C., Huang, M., Cai, J., Zhou, Q., Dai, T. i Jiang, D. (2018). The Role of Hydrogen Peroxide in Mediating the Mechanical Wounding-Induced Freezing Tolerance in Wheat. *Frontiers in Plant Science*, 9.

- Sulaiman, C. i Balachandran, I. (2012). Total phenolics and total flavonoids in selected Indian medicinal plants. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 74(3), 258.
- Suzuki, N., Rivero, R., Shulaev, V., Blumwald, E. i Mittler, R. (2014). Abiotic and biotic stress combinations. *New Phytologist*, 203(1), 32-43.
- Taiz, L. i Zeiger, E. (2006). *Plant Physiology*. 4th ed. Sinauer Associates Inc. Publishers, Massachusetts, str. 591-592.
- Takahashi, M. i Asada, K. (1983). Superoxide anion permeability of phospholipid membranes and chloroplast thylakoids. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 226(2), 558-566.
- Tayefi-Nasrabadi, H., Dehghan, G., Daeihassani, B., Movafegi, A. i Samadi, A. (2011). Some biochemical properties of guaiacol peroxidases as modified by salt stress in leaves of salt-tolerant and salt-sensitive safflower (*Carthamus tinctorius* L. cv.) cultivars. *African Journal of Biotechnology*, 10(5), 751-763
- Thorpe, J. R. i Hall, J. L. (1984). Chronology and elicitation of changes in peroxidase and phenylalanine ammonia-lyase activities in wounded wheat leaves in response to inoculation by *Botrytis cinerea*. *Physiological Plant Pathology*, 25(3), 363–379.
- Tomas-Grau, R., Requena-Serra, F., Hael-Conrad, V., Martínez-Zamora, M., Guerrero-Molina, M. i Díaz-Ricci, J. (2017). Soft mechanical stimulation induces a defense response against *Botrytis cinerea* in strawberry. *Plant Cell Reports*, 37(2), 239-250.
- Tran, L., Taylor, J. i Constabel, C. (2012). The polyphenol oxidase gene family in land plants: Lineage-specific duplication and expansion. *BMC Genomics*, 13(1), 395.
- Tsuji, J. i Donnelly, M., (2000). Accumulation of a Basic Peroxidase Isoenzyme in Leaves of *Arabidopsis thaliana* Following Inoculation with *Pseudomonas Syringae* Pv. *Syringae* or Wounding. *Michigan Academician*, 32(4), 411.
- Turlapati, P.V., Kim, K.W., Davin, L.B. i Lewis, N.G. (2011). The laccase multigene family in *Arabidopsis thaliana*: towards addressing the mystery of their gene function (s). *Planta*, 233(3), 439-470.
- Uarrota, V.G., Moresco, R., Schmidt, E.C., Bouzon, Z.L., da Costa Nunes, E., de Oliveira Neubert, E., Peruch, L.A.M., Rocha, M. i Maraschin, M. (2016). The role of ascorbate peroxidase, guaiacol peroxidase, and polysaccharides in cassava (*Manihot esculenta* Crantz) roots under postharvest physiological deterioration. *Food chemistry*, 197, 737-746.



- Van Breusegem, F., Bailey-Serres, J. i Mittler, R. (2008). Unraveling the tapestry of networks involving reactive oxygen species in plants. *Plant physiology*, 147(3), 978-984.
- Vu, H.S., Shiva, S., Roth, M.R., Tamura, P., Zheng, L., Li, M., Sarowar, S., Honey, S., McElhiney, D., Hinkes, P. i Seib, L. (2014). Lipid changes after leaf wounding in *Arabidopsis thaliana*: expanded lipidomic data form the basis for lipid co-occurrence analysis. *The Plant Journal*, 80(4), 728-743.
- Waetzig, G., Sobczak, M. i Grundler, F. (1999). Localization of hydrogen peroxide during the defence response of *Arabidopsis thaliana* against the plant-parasitic nematode *Heterodera glycines*. *Nematology*, 1(7), 681-686.
- Weigel, D. i Mott, R. (2009). The 1001 Genomes Project for *Arabidopsis thaliana*. *Genome Biology*, 10(5), 107.
- Wellburn, A. (1994). The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *Journal of Plant Physiology*, 144(3), 307-313.
- Willekens, H., Inzé, D., Van Montagu, M. i van Camp, W. (1995). Catalases in plants. *Molecular Breeding*, 1(3), 207-228.
- Xiong, J., Yang, Y., Fu, G. i Tao, L. (2015). Novel roles of hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) in regulating pectin synthesis and demethylesterification in the cell wall of rice (*Oryza sativa*) root tips. *New Phytologist*, 206(1), 118-126.
- Xu, X., Xu, H., Wang, Y., Wang, X., Qiu, Y. i Xu, B. (2008). The effect of salt stress on the chlorophyll level of the main sand-binding plants in the shelterbelt along the Tarim Desert Highway. *Science Bulletin*, 53(S2), 109-111.
- Zhang, J. i Kirkham, M.B. (1994). Drought-stress-induced changes in activities of superoxide dismutase, catalase, and peroxidase in wheat species. *Plant and Cell Physiology*, 35(5), 785-791.
- Zhu, J. (2016). Abiotic stress signaling and responses in plants. *Cell*, 167(2), 313-324.
- Zoeller, M., Stingl, N., Krischke, M., Fekete, A., Waller, F., Berger, S. i Mueller, M. (2012). Lipid profiling of the *Arabidopsis* hypersensitive response reveals specific lipid peroxidation and fragmentation processes: biogenesis of pimelic and azelaic acid. *Plant Physiology*, 160(1), 365-378.

URL1: <https://www.tekscan.com/pdfs/FlexiforceUserManual.pdf> (Tekscan, FlexiForce Sensors User Manual, 2. svibanj 2009) (25.03. 2019.)

## 9. SAŽETAK

Klara Krmpotić, Iva Šutevski

### **Učinak mehaničkog stresa na modelnu biljku *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.**

Tijekom životnog ciklusa biljke su izložene različitim stresnim uvjetima koji dovode do promjena fizioloških i biokemijskih procesa. Među njima, značajno mjesto zauzima mehanički stres koji može biti uzrokovan abiotičkim čimbenicima, poput ekstremnih vremenskih nepogoda, ali i biotičkim, poput djelovanja herbivora. Osim štetnih posljedica zabilježeni su i pozitivni učinci mehaničkog stresa na biljke, kao što je aklimatizacija na druge nepovoljne okolišne uvjete. Prema broju postojećih literaturnih navoda može se zaključiti da je mehanički stres značajno manje istražen u odnosu na druge vrste stresa. Stoga je cilj našeg rada bio odrediti učinak mehaničkog stresa na odabrane biokemijske i fiziološke parametre: propusnost membrane, koncentraciju fotosintetskih pigmenata, učinkovitost fotosinteze te pokazatelje oksidacijskog stresa i antioksidacijskog odgovora. Istraživanje je provedeno na biljci *Arabidopsis thaliana* čiji su listovi izloženi mehaničkom podražaju od 5 N u trajanju od 20 sekundi. Pritom su spomenuti parametri mjereni u tkivu listova neposredno nakon (1 h) te 20 h nakon tretmana. Osim tretiranog, 20 h nakon izlaganja mehaničkom stresu, analizirano je i netretirano tkivo lista u svrhu detekcije sistemskog odgovora. Primijenjeni mehanički podražaj doveo je do značajnog porasta stupnja lipidne peroksidacije i aktivnosti superoksid dismutaze i katalaze te značajnog smanjenja ukupne koncentracije fenola u odnosu na kontrolu, u tkivu analiziranom 1 h nakon tretmana. Međutim, u tkivu listova analiziranih 20 h nakon tretmana zabilježeno je značajno povećanje količine vodikovog peroksida, stope oksidacije fenola, aktivnosti katalaze i superoksid dismutaze, propusnosti membrane te maksimalnog i efektivnog prinosa PSII, u odnosu na kontrolu. Iz navedenog, može se uočiti da su od svih promatranih parametara samo aktivnost katalaze i superoksid dismutaze značajno povećani i 1 h i 20 h nakon tretmana. Uz to, na temelju rezultata mjerenja postoji naznaka da je primijenjeni mehanički podražaj doveo do aktivacije sistemskog odgovora, što je dokazano povećanom stopom oksidacije fenola, aktivacijom katalaze i superoksid dismutaze, većim maksimalnim i efektivnim prinosom PSII te povećanom propusnosti plazmatske membrane u netretiranom tkivu analiziranom 20 h nakon izlaganja biljaka mehaničkom stresu. Rezultati ovog rada mogli bi dati smjernice za daljnja istraživanja mehaničkog stresa kako bi se dobila potpunija slika o njegovom učinku i na temelju dobivenih rezultata razmotrio potencijal primjene u postupcima aklimatizacije biljaka.

**Ključne riječi:** *Arabidopsis thaliana*, mehanički stres, oksidacijski stres, antioksidacijski sustav

## 10. SUMMARY

Klara Krmpotić, Iva Šutevski

### **The effect of mechanical stress on model plant *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.**

During their life cycle, plants are exposed to various stressful conditions that lead to changes in physiological and biochemical processes. Among them, mechanical stress is of great importance. It can be caused by abiotic factors such as extreme weather conditions, and also by biotic factors such as an herbivore attack. Despite its negative effects, mechanical stress can also cause positive changes in plants, and an example of such is acclimatization to other adverse environmental conditions. According to the existing literature, it can be concluded that mechanical stress is significantly less studied than other stressors. Therefore, the aim of our work was to determine the effect of mechanical stress on the selected biochemical and physiological parameters: membrane permeability, photosynthetic pigment content, photosynthetic efficiency, and parameters of oxidative stress and antioxidative response. The study was conducted on plant species *Arabidopsis thaliana* exposed to mechanical stimulation of 5 N for 20 seconds. These parameters were measured promptly after (1 h) and 20 h after treatment in leaves of separate plants. In addition, untreated leaf tissue was also analyzed 20 h after exposure to mechanical stress, for the purpose of detecting systemic responses. Compared to the control, the applied mechanical stimulation has led to a significant increase in lipid peroxidation and superoxide dismutase and catalase activity, and a significant reduction of the total concentration of phenol in the tissue analyzed 1 h after treatment. In contrast, in the tissue analyzed 20 h after the treatment, a significant increase in the amount of hydrogen peroxide, rate of phenol oxidation, catalase and superoxide dismutase activity, membrane permeability, the maximum and effective quantum yield of PSII were observed with respect to control. From all observed parameters, it can be seen that only catalase and the superoxide dismutase activity significantly increased 1 h and also 20 h after the treatment. Based on our observed results it is evident that the applied mechanical stimulation has led to the activation of a systemic response. This is shown by increased phenol oxidation rate, catalase and superoxide dismutase activation, greater maximum and effective quantum yield of PSII and increased membrane permeability in untreated tissue analyzed 20 h after exposure to mechanical stress. Obtained results could encourage further research on mechanical stress in order to gain a more complete picture of its effect and to consider its potential application in the process of plant acclimatization.

**Key words:** *Arabidopsis thaliana*, mechanical stress, oxidative stress, antioxidative system