Utjecaj ekstremnog zasušivanja na biokemijske i fiziološke značajke sadnica kapara

Srebačić, Dario

Master's thesis / Diplomski rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Agriculture / Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:204:994990

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Repository Faculty of Agriculture University of Zagreb

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

UTJECAJ EKSTREMNOG ZASUŠIVANJA NA BIOKEMIJSKE I FIZIOLOŠKE ZNAČAJKE SADNICA KAPARA

DIPLOMSKI RAD

Dario Srebačić univ. bacc. ing. agr.

Zagreb, veljača, 2022.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

Diplomski studij:

Biljne znanosti

UTJECAJ EKSTREMNOG ZASUŠIVANJA NA BIOKEMIJSKE I FIZIOLOŠKE ZNAČAJKE SADNICA KAPARA

DIPLOMSKI RAD

Dario Srebačić univ. bacc. ing. agr.

Mentor:

doc. dr. sc. Ivanka Habuš Jerčić

Zagreb, veljača, 2022.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

IZJAVA STUDENTA

O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI

Ja, **Dario Srebačić**, JMBAG 0178110302, rođen 10.08.1997. u Zaboku , izjavljujem da sam samostalno izradio diplomski rad pod naslovom:

Utjecaj ekstremnog zasušivanja na biokemijske i fiziološke značajke sadnica kapara

Svojim potpisom jamčim:

- da sam jedina autorica/jedini autor ovoga diplomskog rada;
- da su svi korišteni izvori literature, kako objavljeni tako i neobjavljeni, adekvatno citirani ili parafrazirani, te popisani u literaturi na kraju rada;
- da ovaj diplomski rad ne sadrži dijelove radova predanih na Agronomskom fakultetu ili drugim ustanovama visokog obrazovanja radi završetka sveučilišnog ili stručnog studija;
- da je elektronička verzija ovoga diplomskog rada identična tiskanoj koju je odobrio mentor;
- da sam upoznata/upoznat s odredbama Etičkog kodeksa Sveučilišta u Zagrebu (Čl. 19).

U Zagrebu, dana _____ _____

Potpis studenta / studentice

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

IZVJEŠĆE

O OCJENI I OBRANI DIPLOMSKOG RADA

Diplomski rad studenta Dario Srebačić, JMBAG 0178110302, naslova

Utjecaj ekstremnog zasušivanja na biokemijske i fiziološke značajke sadnica kapara

obranjen je i ocijenjen ocjenom _____ , dana _____ .

Povjerenstvo:		potpisi:
1.	Doc. dr. sc. Ivanka Habuš Jerčić mentor	_____
2.	Prof. dr. sc. Boris Lazarević član	_____
3.	Doc. dr. sc. Anita Bošnjak Mihovilović član	_____

Zahvala

Ovime zahvaljujem, prije svega svojoj mentorici doc. dr. sc. Ivanki Habuš Jerčić na strpljenu i pomoći prilikom izrade ovog diplomskog rada.

Također, zahvaljujem dr. sc. Ivani Tomaz na pomoći i sugestijama prilikom izrade praktičnog dijela u laboratoriju.

Veliku zahvalu dugujem svojim roditeljima, obitelji i prijateljima koji su bili uz mene tijekom cijelog perioda školovanja jer su uvijek bili uz mene i u najtežim trenucima. Sve što sam naučio tijekom školovanja bez njih ne bi bilo moguće.

Također, neizmjerno hvala djevojci Antoniji bez koje pisanje ovoga rada ne bi uspjelo.

Dario Srebačić

Sadržaj

1. Uvod 1

1.1. Cilj istraživanja 2

2. Pregled literature 3

2.1. Kapar (*Capparis spinosa* L.) 3

2.1.1. Okolinski uvjeti 5

2.1.2. Uzgoj i ekonomska vrijednost kapara 6

2.2. Utjecaj stres suše na biljke 8

2.2.1. Relativni sadržaj vode 9

2.2.2. Utjecaj suše na biokemijske procese u biljci 10

2.3. Enzimi stresa i ukupni proteini 12

2.3.1. Katalaza 13

2.3.2. Superoksid dismuntaza 13

2.3.3. Peroksidaza 14

2.3.4. Ukupni proteini 14

2.3.5. Aktivnost antioksidacijskih enzima kod biljaka 15

3. Materijali i metode 17

3.1. Određivanje relativnog sadržaja vode u listu 17

3.2. Izolacija topljivih i membranskih proteina 19

3.3. Određivanje koncentracije proteina po Bradford-u 19

3.4. Mjerenje aktivnosti superoksid-dismuntaze (SOD) 20

3.5. Mjerenje aktivnosti nespecifičnih peroksidaza 21

4. Rezultati i rasprava 23

4.1. Analiza varijance 23

4.2. Relativni sadržaj vode u listu (RWC) 24

4.3. Ukupni sadržaj topivih proteina 25

4.4. Aktivnost superoksid dismutaze (SOD) 26

4.5. Aktivnost nespecifične peroksidaze (POX) 27

4.6. Korelacija 28

5. Zaključak 29

6. Literatura 30

Životopis 36

Sažetak

Diplomskog rada studenta Dario Srebačić, naslova

Utjecaj ekstremnog zasušivanja na biokemijske i fiziološke značajke sadnica kapara

Suša se ubraja u jedan od najčešćih abiotskih stresova, a karakterizira je manjak oborina kroz dulji vremenski period u odnosu na prosječne oborinske prilike nekog područja. Stres suše negativno utječe na rast i razvoj biljaka tijekom njihove vegetacije. Biljke su s vremenom razvile nekoliko antioksidacijskih mehanizama kojima uklanjaju toksične komponente koje se nakupljaju tijekom stresa suše. Neki od enzima koje biljke nakupljaju imaju antioksidacijsko djelovanje, a s povećanjem antioksidacijske aktivnosti može se povećati tolerantnost na stres suše. Cilj istraživanja bio je utvrditi utjecaj ekstremnog zasušivanja na relativni sadržaj vode (RWC), sadržaj ukupnih proteina te aktivnost antioksidacijskih enzima superoksid dismutaze (SOD) te peroksidaze (POX) u listu sadnica kapara. Stres suše (zasušivanja) značajno utječe na sva mjerena svojstva. RWC u listu, kao i ukupni sadržaj topljivih proteina značajno se smanjio, dok se aktivnost SOD-a i POX-a značajno povećavala s intenzitetom suše.

Ključne riječi: suša, kapar, RWC, ukupni proteini, SOD, POX

Summary

Of the master's thesis - student **Dario Srebačić,** entitled

The impact of extreme drought stress on biochemical and physiological characteristics of caper seedlings

Drought is one of the most common types of abiotic stress and is characterized by the lack of precipitation over a long period of time compared to average precipitation in a certain area. Drought stress negatively affects the growth and development of plants during their vegetation. Over time, plants have developed several antioxidant mechanisms to remove toxic components that accumulate during drought stress. Some of the enzymes that plants accumulate have antioxidant activity and by increasing antioxidant activity, drought stress tolerance may increase. The aim of the study was to determine the effect of extreme drought on relative water content (RWC), total protein content and activity of antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD) and peroxidase (POX) in caper seedling leaves. Drought stress significantly affects all measured properties. The RWC in leaves as well as the total soluble protein content decreased significantly, while the activity of SOD and POX increased with drought intensity.

Keywords: drought, caper, RWC, total protein, SOD, POX

1. Uvod

Suša se ubraja u jedan od najčešćih abiotskih stresova, a karakterizira je manjak oborina kroz dulji vremenski period u odnosu na prosječne oborinske prilike nekog područja. S obzirom na čimbenike na koje utječe razlikujemo: meteorološku, agronomsku, hidrološku te socio-ekonomsku sušu (DHMZ, 2021.). Za poljoprivrednu proizvodnju svakako je najvažnija agronomska suša. Agronomska suša je kratkoročni manjak vode u razdoblju od nekoliko tjedana u površinskom sloju tla koji se događa u kritičnom trenutku razvoja biljaka (DHMZ, 2021.). Negativne posljedice agronomske suše pojačavaju visoke temperature, vjetar te niska relativna vlaga zraka. Nedostatak vode ugrožava biljne procese i prinose na većim geografskim područjima. Preživljavanje akutnog sušnog stresa ovisi o karakteristikama biljnog genotipa, intenzitetu i trajanju stresa (Laxa i sur., 2019.).

Stres suše negativno utječe na rast i razvoj biljaka tijekom njihove vegetacije. Naime suša dovodi do različitih molekularnih, staničnih, fizioloških i morfoloških oštećenja koja rezultiraju smanjenim rastom i promjenama u fiziološkim procesima biljaka. Promjene koje se dešavaju uslijed nedostatka vode u biljci su smanjenje lisne površine, odbacivanje lišća, pojačan rast korijena, pritvaranje puči, osmotska prilagodba i zadebljanje kutikule (Lazarević i Poljak, 2019.). Kao posljedica ovih promjena, u sušnim godinama, dolazi do smanjenja prinosa, sadržaja suhe tvari, lošije kvalitete prinosa te ukoliko sušni period dulje potraje čak i do venuća biljaka. Visoke temperature, toplinski ekstremi te stres uvjetovan sušom, tj. nedostatkom vode prema tome dovode do smanjenja produktivnosti kultiviranih biljka što dovodi do globalne nesigurnosti u količini proizvedene hrane (Bita i Gerats 2013.).

Dio rješenja nalazi se u proizvodnji biljnih vrsta koje su se adaptirale na stres suše različitim fiziološkim i biokemijskim mehanizmima. U biokemijske mehanizme prilagodbe koje su biljke tijekom vremena razvile spadaju brojni antioksidacijski enzimi kojima uklanjanju toksične komponente koje se nakupljaju tijekom stresa suše. Kod biljaka se s povećanjem antioksidacijske aktivnosti navedenih enzima može povećati tolerantnost na stresne čimbenik (Basu i sur., 2016.) Bez obzira na vremenski period kojem su izložene stresu suše, navedene biljke optimiziraju svoj rast i zadržavaju sposobnost reprodukcije (Basu i sur., 2016.).

Biljne vrste koje dobro podnose sušne uvjete ubrajaju se u kserofite. Oni imaju sposobnost prilagodbe na život u sušnim predjelima ili fiziološki nepovoljnim staništima i posjeduju mehanizme za sprečavanje gubitka vode ili mehanizme za spremanje raspoložive vode. U kserofite spada i biljna vrsta kapar (*Capparis spinosa* L.) koja je predmet proučavanja ovog diplomskog rada.

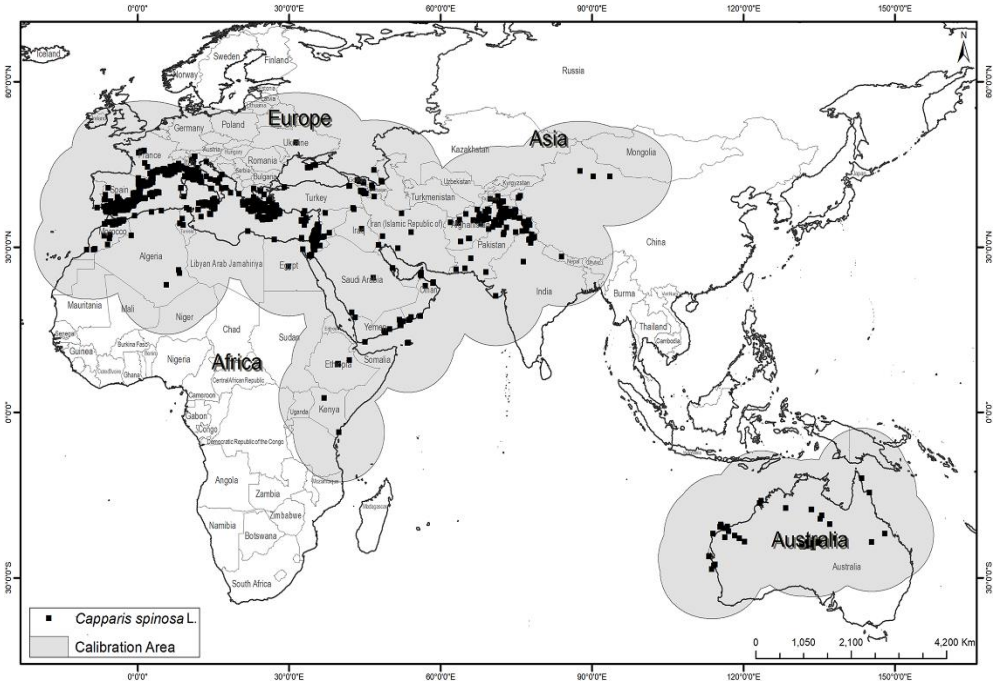
1.1. Cilj istraživanja

Cilj istraživanja bio je utvrditi utjecaj ekstremnog zasušivanja na relativni sadržaj vode u listu sadnica kapara, sadržaj ukupnih proteina te aktivnost antioksidacijskih enzima.

2. Pregled literature

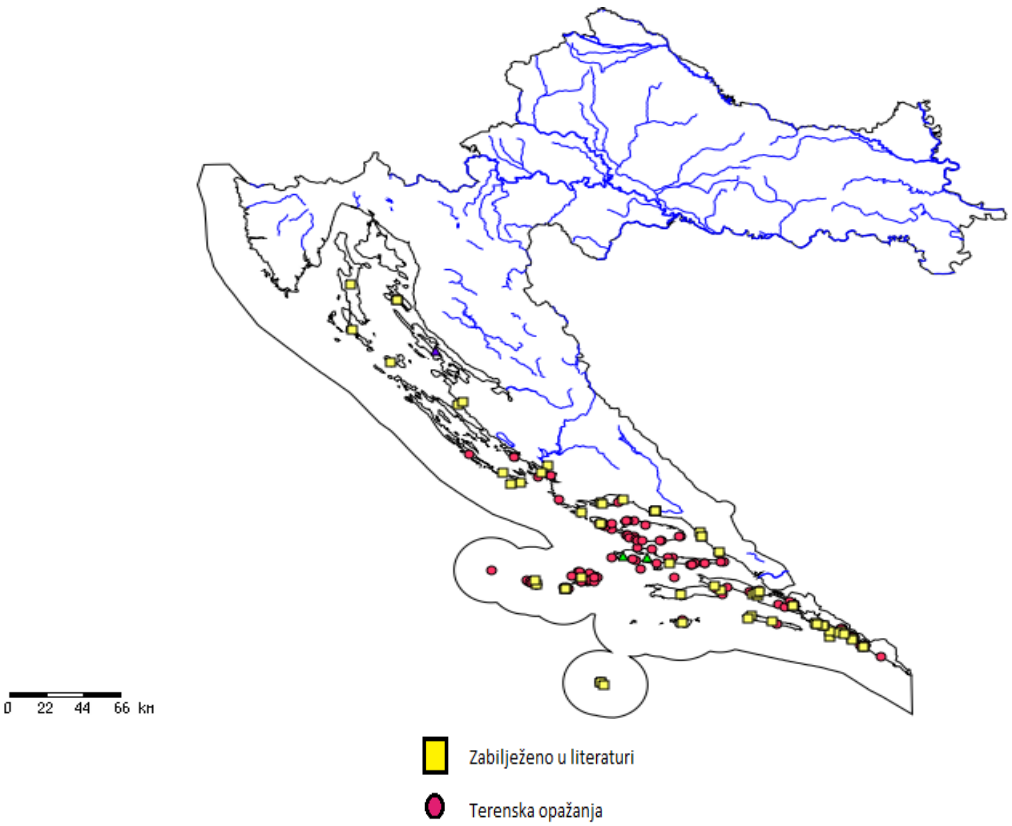
2.1. Kapar (*Capparis spinosa* L.)

Kapar (*Capparis spinosa* L.) je biljna vrsta koja pripada u porodicu *Capparidaceae*. To je višegodišnji listopadni kserofilni grm koji se izvanredno prilagodio na surove uvjete. Pretpostavlja se da se biljka razvila u tropskim krajevima te se proširila po južnoj Europi i središnjoj Aziji, posebice na Mediteranu te na istočnoj strani Kaspijskog mora. Mediteranske regije su pod snažnim utjecajem globalnog zatopljenja, što dovodi do brojnih nepovoljnih učinaka na agroekosustave i biljnu proizvodnju. Stoga se posebna pozornost treba usmjeriti na biljke prilagođene sušnim uvjetima za upotrebu u poljoprivrednim sustavima prema trenutnom scenariju klimatskih promjena. Kapari se vide kao potencijalni zanimljiv usjev u sušnim ili polusušnim regijama kao što su zemlje istočnog Mediterana (Chedraoui i sur., 2017).



Slika 2.1.1. Rasprostranjenost vrste *Capparis spinosa* L. u svijetu
(Izvor: https://peerj.com/articles/5792/)

Slika 2.1.1. prikazuje rasprostranjenost kapara u svijetu. Najveća rasprostranjenost i nalazišta kapara nalaze se na području Mediterana. Prema prikazanom na karti može se vidjeti da je kapar rasprostranjen u sjevernom dijelu Australije i južnom dijelu Azije što ukazuje na činjenicu da je to biljka toplijih područja gdje nastupa deficit vode kroz duža vremenska razdoblja.



Slika 2.1.2. Rasprostranjenost kapara u Republici Hrvatskoj
(Izvor: Bajlo Kristina, diplomski rad)

Slika 2.1.2. prikazuje rasprostranjenost kapara u Hrvatskoj. Prema prikazanoj mapi može se vidjeti da je kapar rasprostranjen duž Jadranske obale i na otocima. Također je vidljivo da je najveći broj nasada kapara zabilježen u srednjoj i južnoj Dalmaciji (najtopliji i najsunčaniji dijelovi Hrvatske obale), gdje su izražena suha i topla ljeta te blage i kišne zime.

Grmovi kapara štite tlo od direktnog sunčevog zračenja, time onemogućavaju ekstremno zagrijavanje tla, te na taj načini reguliraju mikroklimu uz tlo. Zbog vrlo razgranatog nadzemnog dijela biljke kapar predstavlja odličan pokrivač za tlo i sprečava evaporaciju, a time zadržava i čuva vodu u tlu te je izvrsna zaštita tla od erozije uzrokovane vjetrom (specijalno kod pjeskovitih tala) (Rostami i sur., 2016.). Kapar ima dubok korijenov sustav i podnosi temperature veće od 40 ˚C (Suleiman i sur., 2021.). Učinkovit korijenov sustav sadržava bakterije koje fiksiraju dušik te time obogaćuju tlo dušikom te istovremeno omogućuje rast biljci u tlima loše plodnost (Sadeghi i Rostami, 2017.). Uvođenje kapara u sušna i polusušna područja Mediterana moglo bi pomoći u sprječavanju narušavanju tih krhkih ekosustava (Sozzi, 2001.). U usporedbi s drugim biljkama koje podnose sušne uvjete, kapar ima visoku učinkovitost korištenja vode i izvanrednu sposobnost pretraživanja i upijanja vode iz tla zahvaljujući svojem opsežnom korijenovom sustavu (Gan i sur., 2013.).



Slika 2.1.3. List, cvijet i cvijetni pup kapara
(Izvor: https://hr.besthomemaster.com/9334814-)

Nadzemni dio kapara (Slika 2.1.3.) sastoji se od grana koje nisu raširene ili mogu biti višestruko raširene, zelene, crvene ili žute boje dužine do 4 m. One mogu biti zakrivljenog ili ravnog oblika sa ili bez jednostavnih dlačica. Listovi su naizmjenično poredani bez palistića i često su preobraženi u kukaste trnove (Žutić, 2010.). Mogu biti zaobljenog ili jajastog oblika sa zaobljenim ili tupim vrhom. Puči na listovima su glavni kanali za transpiraciju te su široko raspoređene na obje strane lista i mogu biti otvorene cijeli dan. Listovi su spojeni na stabljiku peteljkom koja može biti žljebasta ili ovalna dužine 0-2 cm (Chedrauri i sur., 2017.). Cvjetovi su pojedinačni i smješteni u pazušcima vršnih listova jednogodišnjih izboja, a cvjetaju noću. Sastoje se od četiri bijele ili bijelo-ružičaste latice, duguljastog, jajolikog ili zaobljeno jajastog oblika te sadrže puči i vrše transpiraciju (Chedraoui i sur., 2017.). Kapar cvate od svibnja do listopada. Jedna je od rijetkih biljnih vrsta koja raste ljeti i cvjeta u sušnim područjima (Chedroui i sur., 2017.). Prašnici su ružičaste boje i vrlo brojni (60-100) s nitima dužine do 5 cm (Kovačević, 2005.). Ima modrastu plodnicu koja se nalazi na dugoj dršci i sadrži veliki broj sjemenih zametaka. Plod je monokularna boba (Kovačević, 2005.), elipsastog, jajolikog ili duguljastog oblika. Sjeme kapara je mnogobrojno i crvenkastosmeđe boje (Fici, 2014.). Kapar je biljna vrsta koja se razmnožava generativno i vegetativno.

2.1.1. Okolinski uvjeti

Kao što je prethodno navedeno, kapar je biljka polusušnog i sušnog područja te je poznata kao biljna vrsta koja je otporna na sušu. Za rast i razvoj joj je potrebna polusuha klima sa srednjim godišnjim temperaturama preko 14˚C i srednjim godišnjim padalinama preko 200 mm (Chedroui i sur., 2017.). Može podnijeti vodni stres bez ikakvih fenotipskih manifestacija, a odlično odolijeva jakom vjetru i temperaturama preko 40˚C (Sozzi i Vicente, 2006.). Zimske mjesece preživljava u obliku panja, a mraz je jedini ograničavajući čimbenik preživljavanja sadnica u zimskim mjesecima. Uzgaja se na malim nadmorskim visinama, iako su neke biljke kapara pronađene na nadmorskim visinama preko 1000 metara (Barbera, 1991; Chalak i sur.

2007.). Raste na vapnenastim tlima, tlima sa malim postocima gline, slanim, pjeskovitim ili sjenovit tlima sa malim postotkom organske tvari.

Anatomske prilagodbe koje utječu na otpornost od suše uključuju obilježja korijena, stabljike, lišća i cvijeta. Korijenov sustav kapara predstavlja 62,5% ukupne biljne biomase nakon 4-5 mjeseci rasta (Sozzi, 2001; Gan i sur., 2013.). Korijenov sustav kapara izlučuje kisele spojeve koji mogu otopiti stijene i proširiti pukotine te biljci omogućiti pristup vodnim resursima. Kao što je već navedeno, puči su zadužene za transpiraciju i ravnomjerno su raspoređene na obje strane lista, a mogu ostati otvorene cijeli dan. Otvaranje puči potiče evapotranspiraciju i to otvaranje ima snažan učinak na hlađenje lišća (Chedraoui i sur. 2017.).

2.1.2. Uzgoj i ekonomska vrijednost kapara

Nasadi kapara mogu se uzgajati s ostalim jednogodišnjem biljem kao što su povrtne kulture, travnjaci i ljekovito bije (Solowey, 2010.). Značajna ekonomska vrijednost leži u cvjetnim pupoljcima, koji su poznati na tržištu pod nazivom „kapari“ ili „bobica kapara“ koji se najviše konzumiraju u svijetu. Također se koristi plod boba koji sadrži visokovrijedne nutrijente. Ova biljna vrsta ima vrlo atraktivan cvijet sa slatkom mirisom, pa se koristi kao ukrasna biljka za vrtove i zidove, kao i za terase koje su izložene Sunčevom svjetlu (Chedraoui i sur., 2017.). Kapar je tradicionalno korišten kao medicinska biljka i opširno proučavan zbog svojih bioloških svojstava. U tradicionalnoj medicini cijela je biljka bila korištena za liječenje reume, prehlade, bolesti slezene i kao diuretik (Shahrajabian i sur., 2021.). Kapar je pronašao svoju primjenu i u farmaceutskoj industriji. Istraživanjima su utvrđena antiupalna svojstva kapara kod pacijenata s Alzheimerovom bolešću. Koristi se također i za smanjenje LDL-kolesterola i hiperglikemije (Shahrajabian i sur., 2021.).

U stadiju cvjetnog pupoljka kapar je niskokaloričan. 100 grama pupoljaka sadrži svega 23 kalorije. Uz nisku energetsku vrijednost, sadrži mnoštvo fitonutrijenata, antioksidansa i vitamina (Tesoriere i sur., 2007.). Pupoljci sadrže vitamin A, vitamin K, niacin te riboflavin. Bogati su i mineralima, najviše kalcijem, željezom i bakrom. Kapari su jedan od najvećih biljnih izvora flavonoida rutina i kvercetina, jakih antioksidansa. Sadržaj kvercetina je različit u različitim dijelovima biljke: sadrži 1.75 mg kvercentina /g korijena, 5 mg/g stabljike, 7.92 mg/g lista, 10 mg/g cvjetnih pupoljaka, 12.8 mg/g cvijeta, 9.6 mg/g ploda i 6.2 mg/g sjemenke (Shahrajabian i sur., 2021.). Kvercetin ima protubakterijsko, antikancerogeno, analgetsko i protuupalno djelovanje (Tesoriere i sur., 2007.). Kapar je bogat izvor ne samo sumpornih spojeva, već i fenolnih i flavonoidnih glikozida koji doprinose njegovoj snažnoj citotoksičnoj aktivnosti. Bobe kapara sadrže ugljikohidrate (5%), proteine (2%) i lipide (0.9%), te vitamin C. U 100 g svježih cvjetnih pupoljaka sadrži 115-170 mg, a u plodovima oko 130 mg askorbinske kiseline (Grlić, 2005.). Tablica 2.1.1. prikazuje hranidbenu vrijednost kapara u 100 grama ploda.

Tablica 2.1.1. Hranidbena vrijednost ploda kapare

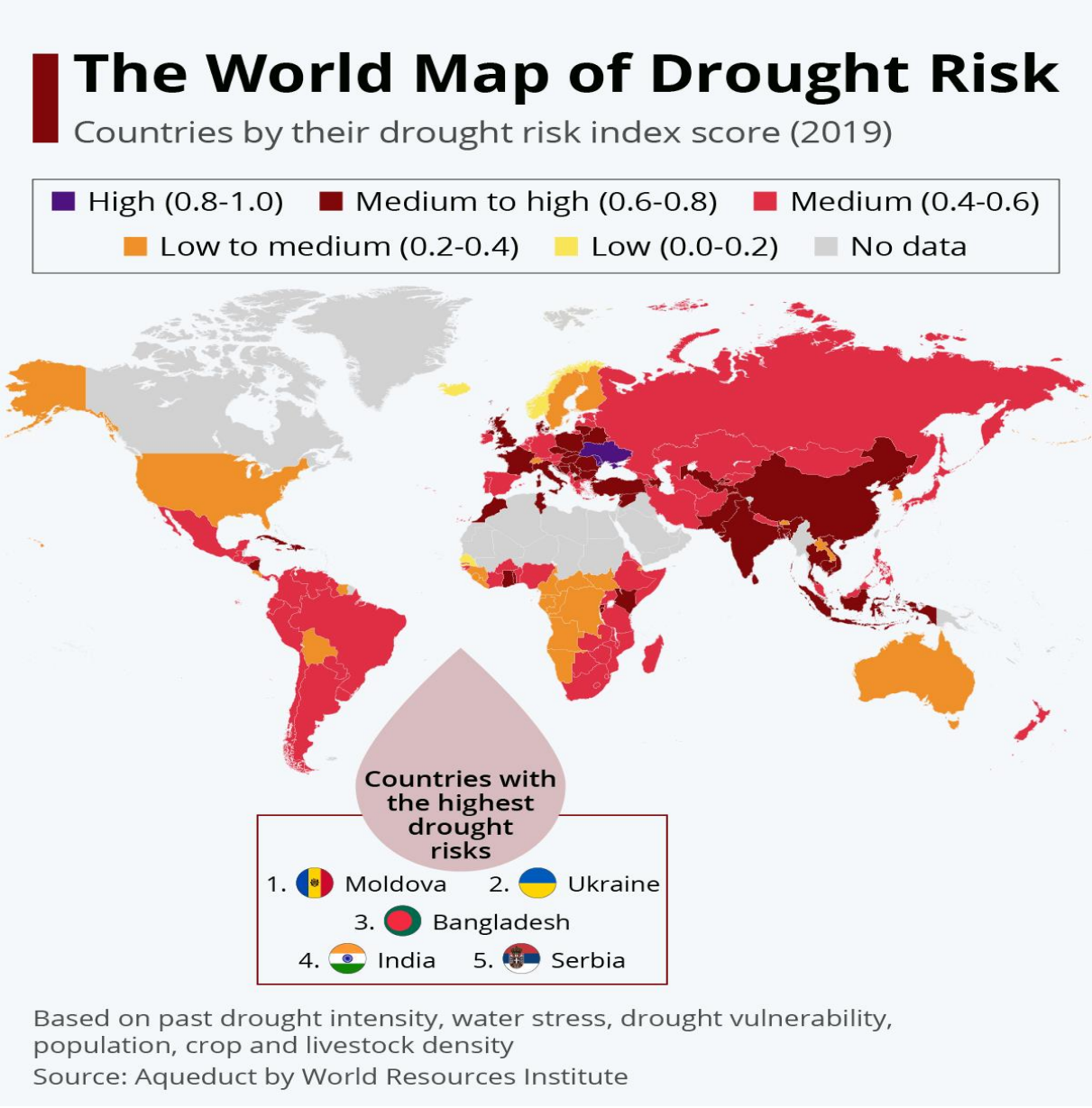
Sadržaj	Iznos na 100 g
Energija	20 kcal
Ugljikohidrati	5 g
Masti	0,9 g
Vlakna	3 g
Šećer	0,4 g
Natrij	2960 mg
Željezo	1,7 mg
Bjelančevine	2 g
Vitamin C	4 mg

(Izvor: Sher i Alyemeni, 2010.)

Cvjetni pupoljci i boba kapara koristi se u ljudskoj prehrani. Cvjetni pupoljci mogu se kiseliti u octu ili soli i koristite se kao predjelo ili začin. Mogu se koristiti kao sastojak u izradi umaka, preljeva i salata, hladnih jela te u umacima koji se poslužuju sa lososom, tjesteninom i pizzama, sirevima, janjetinom, ovčetinom, svinjetinom i piletinom (Sozzi i Vicente, 2006.). Boba kapara se također kiseli i koristi kao začin (Rivera i sur., 2003.). U prehrambenoj industriji koriste se ekstrakti pupoljka i bobica kao agensi okusa (Aliyazicioglu i sur., 2015.).

2.2. Utjecaj stres suše na biljke

Nedostatak vode jedan je od najčešćih abiotskih stresova koji ograničava produktivnost usjeva i rezultira ekonomskim gubitcima u proizvodnji (Hyman i sur., 2008.). Kraće ili dulje razdoblje stresa suše dovodi do smanjenog rasta i kvalitete biljaka te pada prinosa do 50% i više u odnosu na optimalne uvjete. Do pojave suše dolazi uslijed narušavanja prirodnog ciklusa kruženja vode u atmosferi (Kolarić, 2016.). Ona se pojavljuje postepeno, traje dugo i zahvaća velika područja na kojima dovodi do šteta.



Slika 2.2.1. Svjetska karta rizika od suše (2019.) godina
(Izvor: https://cdn.statcdn.com/Infographic/images/normal/25101.jpeg)

Slika 2.2.1. prikazuje kartu indeksa rizika suše u svijetu. Prema prikazanom na karti možemo zaključiti da je za 2019. godinu najveći indeks rizika za sušu bio u Moldaviji, Ukrajini, državama jugoistočne Azije i državama zapadne i srednje Europe. Najmanji indeks rizika suše zabilježen je u Skandinavskim zemljama, dok je u ostalim zemljama svijeta srednja do srednje visoka razina rizika od sušu.

Stres suše ozbiljno utječe na rast, razvoj i plodnost biljaka. Biljke koje rastu u sušnim područjima razvile su kseromorfološke osobine da smanje transpiraciju tijekom nastalog stresa. Suša pokreće smanjenje i u ekstremnim uvjetima gubitak vodnog potencijala, što istodobno dovodi do smanjenja turgora stanica (Laxa i sur., 2019.). Održavanje turgora tijekom stresa važno je za očuvanje metaboličkih odgovora u biljkama i dobro je prepoznatljiv mehanizam kod biljaka tolerantnih na vodni stres. Sposobnost biljaka koje se razmnožavaju sjemenom i njihova prilagodba na stres suše uključuje ili toleranciju na staničnu dehidraciju ili minimalan gubitak vode i održavanje pritiska turgora (Morgan, 1992.). Prva promjena na biljci nastala usred stresa suše je zatvaranje puči uslijed djelovanja apscizinske kiseline (ABA). Dugotrajni i povećani intenzitet stresa nastao djelovanjem suše dovodi do daljnjih reakcija u pogledu osmotske prilagodbe, smanjenja omjera mase i duljine izdanaka i korijenja, modifikacije stanične stjenke, dolazi do reprogramiranja metabolizma te aktivacije antioksidacijskog sustava (Laxa i sur., 2019.). Mnoge od navedenih karakteristika obrane od stresa suše su mjerljive te se koriste za karakterizaciju težine sušnog stresa. Izbjegavanje suše uključuje morfološke prilagode, poput uvijanja lišća i povećanog taloženja voska na površini lista (Kim i sur., 2007.). Stres suše prolazi klasifikaciju od blage, umjerene do teške faze stresa. Prijelaz između različitih stadija događa se stalno i održava napredovanje ozbiljnosti sušnog stresa trajanjem i snagom dehidracije.

2.2.1. Relativni sadržaj vode

Suša značajno utječe na vodni status biljke, a relativni sadržaj vode (RWC) u listovima jedan je od primarnih pokazatelja dehidracije (Yamasaki i Dillenburg 1999.; Jongdee i sur., 2002.). Relativni sadržaj vode (RWC) često se koristi kao indikator vodnog deficita odnosno mjerilo stresa. Ukupni konsenzus je da se relativni sadržaj vode (RWC) u blagom stresu suše kreće od 60-70% u odnosu na kontrolu gdje iznosi ≥ 90%, u umjerenom stresu između 40-60% i teškom stresu između 0-40% (Laxa i sur., 2019.). Navedene klasifikacije se razlikuju među različitim biljnim vrstama i u duljini izloženosti stresu suše.

Relativni sadržaj vode (RWC) opisan je kao količina vode u listu u vrijeme uzorkovanja, a jednak je relativno maksimalnoj vodi koju list može sadržavati. Bitan je parametar u istraživanjima vezanima uz vodu, npr. omogućuje izračun osmotskog potencijala pri punom turgoru. RWC se može učinkovito koristiti za procjenu tolerancije na sušu i odabir genotipova

najotpornijih na sušu (Abdalla i El-Khoshiban, 2007.). Relativan sadržaj vode u listu računa se iz sljedećih parametara:

$$RWC= (FW-DW)/(TW-DW)$$

FW= masa svježeg lista
DW= masa suhe tvari
TW= masa zasićenog lista

Relativni sadržaj vode (RWC) omogućuje usporedbu metaboličkih promjena u biljci, uz isti status stanične vode (Blum, 1998.). Također omogućuje procjenu stanja biljne vode u smislu stanične hidratacije i pod mogućim je učinkom i lisnog potencijala i osmotskog prilagođavanja (Blum, 1998.). Osmotska prilagodba definirana je kao proces nakupljanja otopljenih tvari u stanicama koje se dijele kada je vodni potencijal smanjen, što pomaže u održavanju turgora (Hirota i sur., 1990.) RWC može se mjeriti na razne načine. Ipak ključan dio je zasićenje listova. Mnogi znanstvenici koriste lisne diskove za rehidrataciju listova. No bolji način zasićenja listova je preko peteljke. Takvo zasićenje ide normalnim vodnim putem, nema oštećenja tkiva (što se događa sa lisnim diskovima) i prezasićenje je smanjeno na minimum . Još jedna prednost ove metode je da se vodni potencijal listova nakon zasićenja može mjeriti koristeći tlačne komore, time dopuštajući procjenu uspješnosti zasićenja (potpuno zasićen list ima vodni potencijal blizu 0).

2.2.2. Utjecaj suše na biokemijske procese u biljci

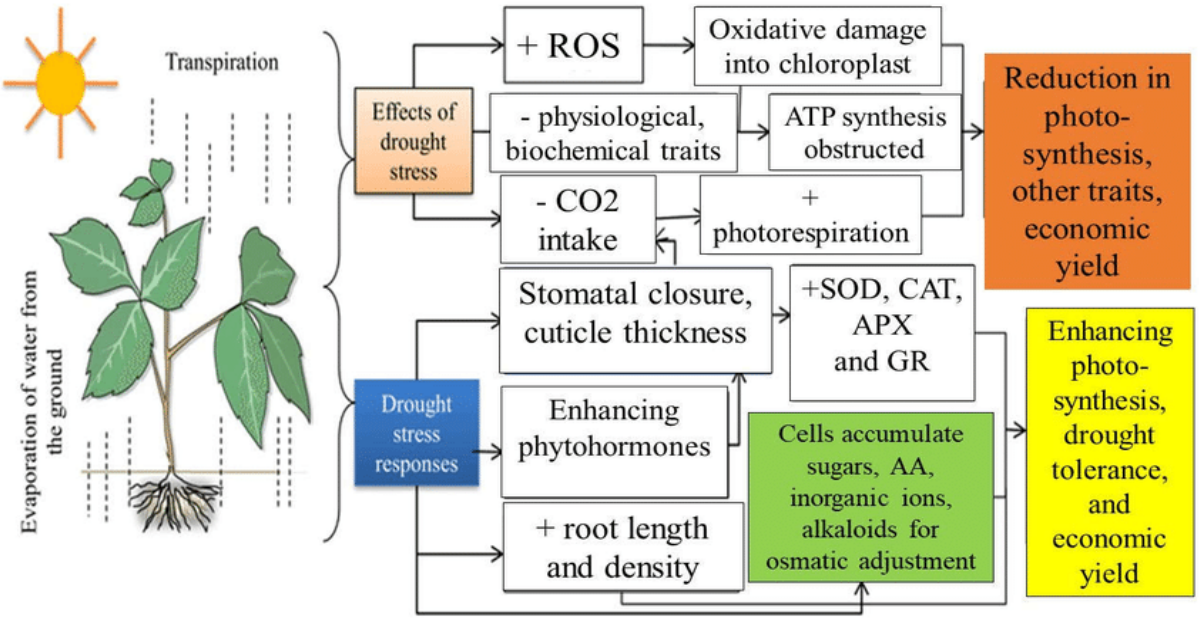
Suša uzrokuje nastanak reaktivnih kisikovih jedinki u biljkama što za posljedicu ima oštećenje biomembrana i makromolekula. Reaktivne kisikove jedinke (ROS) su slobodni radikali kisika: singlentni kisik ($^1O_2$), superoksidni ($^{\cdot}O_2^-$) i hidroksilni ($^{\cdot}OH$) radikali te vodikov peroksid (H_2O_2) kao mala, nenabijena, slobodno difundirajuća molekula (Antunović, 2013.). Stres suše također uzrokuje i nastajanje reaktivnih dušikovih jedinki (NO) (Hancock i sur., 2002.; Mittler, 2002.). Proces nastanka radikala u stanicama u uvjetima stresa je neprekidan i slučajan. ROS se u određenoj mjeri javlja kao rezultat normalne metaboličke aktivnosti u stanici (Ričko, 2009.). Aerobne metaboličke reakcije koje dovode do nastajanja ROS-a u stanicama događaju se u transportnom lancu elektrona u mitohondrijima, kod fotorespiracije i u lanacu prijenosa elektrona u kloroplastima. Proizvodnja ROS-a izazvana stresom odvija se u različitim staničnim organelama (Del Rio, 2015.) te se koristi za prijenos signala u jezgru i druge organele kako bi se reprogramirala ekspresija gena (Choudhury i sur., 2013.; Hossain i sur., 2015.). Razina ROS-a povećava se kad biljka proživljava nepovoljne uvjete, osobito stres suše, te služi kao signalna molekula. Prvi odgovor biljaka na sušu je zatvaranje puči kako bi se gubici vode zbog transpiracije smanjili na najmanju moguću mjeru (Laxa i sur.,2019.).

Pojačani nastanak reaktivnih kisikovih jedinki u biljkama tijekom suše uzrokuje oštećenje makromolekula i biomembrana (oksidiraju lipidne membrane, denaturiraju proteine i mutiraju DNA) (Cruze de Varvalho, 2008.). Suša se prvo očituje kao osmotski stres koji rezultira narušavanjem homeostaze i distribucije iona u stanici, a zatim i kao oksidativni stres koji uzrokuje denaturaciju funkcionalnih i strukturnih proteina (Mihaljević, 2015.). Biljka na stres suše odgovara ekspresijom brojnih gena, koji uvjetuju brojne biokemijske i molekularne mehanizme. Poznate su tri grupe gena uključenih u signalnu kaskadu i transkripcijsku kontrolu: prvu grupu čine Myc, MAP kinaze, SOS kinaze, fosfolipaze i transkripcijski faktori. Drugu grupu gena čine Hsps, čeperoni, LEA i osmoprotektani koji direktno sudjeluju u obrani samih membrana i proteina, a u treću grupu pripadaju geni koji reguliraju primanje vode i iona kao što su akvaporini i transporteri iona (Wang i sur, 2003.). Kao što je već navedeno ranije, tijekom pojave stresa suše dolazi do pojačane sinteze apscizinske kiseline (ABA), fitohormona koji se sintetizira u korijenu i putuje floemom do listova gdje se veže na receptore u stanici i time šire signal, te uvjetuje zatvaranje puči i smanjenje transpiracije. Zatvaranje puči ne samo da umanjuje gubitak vode putem transpiracije, već smanjuje unos ugljikovog dioksida i nutrijenata te tako mijenja metaboličke procese, uključujući i fotosintezu (Basu i sur., 2016.). Signalni put apscizinske kiseline ima važnu ulogu u odgovoru biljke na stres o čemu svjedoči i činjenica da su mnogi geni inducirani sušom također regulirani ABA-om (Wang i sur, 2003.).

Također stres suše utječe na fotosintezu smanjujući površinu lista i brzinu fotosinteze po jedinici površine lista (Basu i sur., 2016.). Smanjena brzina fotosinteze je posljedica zatvaranja puči i metaboličkih oštećenja u biljkama. Zbog stalne fotosinteze na svjetlu, povećana difuzijska barijera plina olakšava iscrpljivanje koncentracije međustaničnog ugljičnog dioksida (CO_2). Smanjena dostupnost CO_2 stimulira oksigenaciju ribuloze-1,5-bisfosfat i tako proizvodi fotorespiratorni vodikov peroksid (H_2O_2) u peroksiosomima (Laxa i sur., 2019.). Neke biljne vrste smanjuju broj listova i njihovu veličinu te u potpunosti ili djelomično odbacuju lišće (Basu i sur.,2016.). Kod otpornosti biljka na sušu javlja se sklerofilija, a to je vrsta prilagodbe gdje biljke formiraju tvrdo lišće koje može vratiti potpunu funkcionalnost pri normalnim uvjetima (Micco i Aronne, 2002.). Reducirano stanje kloroplasta i mitohondrija održava se osjetljivom ravnotežom između proizvodnje i potrošnje energije, a utječe na potrebu da se izbjegne povećana proizvodnja ROS-a (Sofo i sur., 2015.). Ti zahtjevi su posebno kritični tijekom izlaganje biljaka stresu pa tako i stresu suše. U uvjetima deficita vode, ROS i redoks znakovi koji su generirani uglavnom tijekom prijenosa elektrona u mitohondrijima ključni su za održavanje normalnih metaboličkih i energetskih tokova, optimizaciju različitih funkcija stanica, aktiviranje reakcija na aklimatizaciju putem retrogradne signalizacije i kontrolu sistemskih cjelovitih biljnih signalnih putova (Gallie, 2013.).

2.3. Enzimi stresa i ukupni proteini

Biljke sadrže učinkovit antioksidacijski obrambeni sustav (Slika 2.3.1.) kako bi se suprotstavile oksidativnom stresu, uključujući enzimatske i neenzimatske antioksidacijske procese (Heidari i sur., 2018.). Aktivacija staničnog antioksidacijskog sustava čest je fenomen u biljaka koji slijedi nakon stresa suše, karakterizirana proizvodnjom raznih antioksidacijskih enzima koji učinkovito čiste ROS-ove su katalaza (CAT), peroksidaza (POD) i superoksid dismuntaza (SOD). POD i CAT enzimi pretvaraju vodikov peroksid u vodu i molekularni kisik, dok enzim SOD pretvara superoksidni radikal (O_2^-) u vodikov peroksid (Heidari i sur., 2018.). Ustanovljeno je da stres suše inducira aktivnost tih antioksidativnih enzima, osobito u uvjetima izloženosti jakom stresu suše, sugerirajući da pustinjske biljke također koriste sličnu molekularnu strategiju za ROS uzrokovan stresom suše (Zhou i sur., 2021.). Prema navodima nekih autora takvi rezultati pokazuju da sve tri antioksidacijska enzima, posebice kada se javljaju u kombinaciji, doprinose antioksidativnom kapacitetu što igra važnu ulogu u prilagodbi biljaka na sušu (Zhou i sur., 2021). Neenzimatski antioksidansi koji štite biljku od stesa suše uključuju antocijanine, karotenoide, proteine, askorbate, alkaloide, fenolne spojeve te flavonoide. Kompatibilne otopljene tvari pojavljuju se u biljci kada je ona suočena sa sušom. Nakupina zaštitnih otopljenih tvari koje uključuju šećere (glukoza, fruktoza, saharoza), šećerne alkohole (manitol, glicerol, sorbitol, pinitol), prolin, glicerin, beatin i anorganske ione, u biljnim organima sprječava peroksidaciju staničnih organela (Sharma i sur., 2012.). Česta metabolička promjena koja se dešava u stresnim uvjetima do koje dolazi i prije pojave vidljivih simptoma je povećana aktivnost antioksidacijskih enzima. Različiti stresni uvjeti uzrokuju stvaranje povećane količine reaktivnog oblika kisika (vodikov peroksid, superoksidni radikal, singletni kisik, hidroksilni radikal) koji mogu reagirati s proteinima, nukleinskim kiselinama i narušiti njihovu strukturu i funkciju (Ričko, 2009.).



Slika 2.3.1. Shema reakcije biljaka u uvjetima stres suše
(Izvor: https://www.researchgate.net/figure/Adverse-effects-and-adaptations-of-plants-to-drought-stress-modified-from-Ullah-et-al_fig1_348848896)

2.3.1. Katalaza

Katalaza je enzim smješten u peroksiosomima i glioksiosomima. Odlikuje je velika aktivnost, jedna molekula može reducirati oko 6 milijuna molekula H_2O_2 do vode i kisika u jednoj minuti (Gill i Tuteja, 2010.). Ekspresija gena za katalazu (CAT) nije samo razvojno regulirana već je osjetljiva na različite okolišne signale. Njihova aktivnost u stanici je stalna, a razina te aktivnosti se može naglo smanjiti pod stresnim uvjetima, a smanjenje se regulira na razini translacije (Ričko, 2009.). Aktivnost katalaze može biti inhibirana niskim temperaturama i toplotnim stresom (Dat i sur., 2000.). U ne stresnim uvjetima, ROS se učinkovito eliminira neenzimatski i enzimatskim antioksidansima, dok tijekom sušnog stresa proizvodnja ROS-a premašuje sposobnost uklanjanja putem antioksidativnog sustava, uzrokujući oksidativni stres (Vanderauwea i sur., 2012.; Ajithkumar i Panneerselvam, 2014.).

2.3.2. Superoksid dismuntaza

Superoksid dismuntaza (SOD) je najučinkovitiji unutarstanični antioksidacijski enzim prisutan u svim aerobnim organizmima. SOD je metaloenzim koji uklanja superoksidne radikale ($^{\cdot}O_2^-$) katalizirajući njihovu dismutaciju (Antunović, 2013.). Jedan superoksidni radikal ($^{\cdot}O_2^-$) se reducira te tako stvara manje reaktivan vodikov peroksid, a drugi oksidacijom formira molekularni kisik. Uklanjanjem superoksidnog radikala smanjuje se mogućnost stvaranja izuzetno reaktivnih hidroksilnih radikala ($^{\cdot}OH$) Haber-Wess-ovom reakcijom. Kod biljaka su prisutne tri izoezimske forme superoksid dismuntaze (SOD) i one se klasificiraju prema metalu kojeg sadrže u aktivnom centru: Mn-SOD, Cu/Zn-SOD i Fe-SOD (Antunović, 2013.). Mn-SOD je izoenzim koji je prisutan u mitohondrijima i peroksisomima, Cu/Zn-SOD je prisutan u kloroplastima i citoplazmi, dok se Fe/SOD može naći samo u kloroplastima (Gill i Tuteja, 2010.; Pilon i sur., 2011.). Izoenzimi superoksid dismuntaze kodirani su genomom u jezgri.

2.3.3. Peroksidaza

Peroksidaze su enzimi prisutni u svim živim organizmima uključujući gljive i prokariote (Ričko, 2009.). One su monomerni glikoproteini koji imaju ulogu u kataliziranju oksidacije pojedinih staničnih tvari koristeći vodikov peroksid ili organski hidroksid kao supstrat (Gaspar i sur., 1991.).

Postoje dvije grupe peroksidaza s obzirom na fiziološku ulogu i supstratnu specifičnost (Asada 1992.). U prvu grupu se ubrajaju nespecifične peroksidaze koje koriste vodikov peroksid za različite oksidacijske reakcije čija je karakteristika slaba supstratna specifičnost. Te peroksidaze su uključene u proces dijeljenja stanice, biosinteze lingnina, etilena i suberina, razgradnju auksina, zarastanja rane te obrana od patogena zbog svojih baktericidnih i fungicidnih svojstava (Gaspar i sur.,1991.). U ovu skupinu se ubrajaju gvajakol- (GPOX) i pirogalol-peroksidaze (POX) gdje gvajakol, odnosno pirogalol mogu poslužiti kao donori elektrona u uvjetima *in vitro* (Ričko, 2009.). Oksidacijom pirogalola nastaje purpurogalin. Gvajakol-peroksidaza (GPOX) uključena je u regulaciju mnogih fizioloških procesa (metabolizam stanične stjenke, lignifikacija, suberinizacija, katabolizam auksina, senescencija) te u antioksidacijskom odgovoru u uvjetima stresa (Hiraga i sur., 2001., Mathe i sur., 2010.).

Drugoj skupini izoenzima peroksidaza pripadaju perkosidaze čija je glavna uloga uklanjanje vodikovog peroksida i organskih hidroperoksida te lipidnih peroksida kako ne bi došlo do nastajanja jako reaktivnih radikala koji oksidiraju sve stanične komponente i uzrokuju oštećenja u stanici. U ovu skupinu ubrajamo askorbat- (APOX) i glutation-peroksidazu (GPX) (Antunović, 2013). Da bi peroksidaze reducirale H_2O_2 u vodu potreban im je reducirajući supstrat, a to je kod biljaka najčešće askorbat (Asada, 1992.). Peroksidaze se primjenjuju kao nespecifični pokazatelji stresa na biljku prije pojave vidljivih posljedica kao što su npr. opadanje lišća, kloroza i zaostajanje u rastu (Pandolfini i sur., 1992.).

2.3.4. Ukupni proteini

Proteini su biološke makromolekule koje imaju mnoštvo važnih uloga u svim biološkim procesima. Oni djeluju kao biokatalizatori, prenose i pohranjuju ostale molekule te kontroliraju rast i diferencijaciju stanica. U proteinima nalazimo 20 različitih bočnih ogranaka, koji se međusobno razlikuju oblikom, nabojem, sposobnošću za stvaranjem vodikovih veza, hidrofobnošću i kemijskom reaktivnošću (Berg i sur., 2013.). Za topljivost proteina odgovorna je raspodjela polarnih i nepolarnih bočnih ogranaka. Stanične membrane građene su najvećim dijelom od lipida i proteina. Membranski lipidi tvore barijere propusnosti, dok specifični membranski proteini provode gotovo sve druge funkcije membrane. Preciznije rečeno, proteini kroz membranu prenose informacije i molekule, a lipidi čine prikladan okoliš za djelovanje tih proteina (Berg i sur., 2013.). Sastav i količina proteina u membranama ovise

ponajviše o funkciji membrane. Vanjske membrane mnogih stanica jako su metabolički aktivne. One sadrže mnoge crpke, kanale, receptore i enzime. Takve membrane obično sadržavaju 50% proteina. Najviše proteina sadržavaju membrane za pretvorbu energije, kao što su membrane mitohondrija i kloroplasta. Udio proteina u njima iznosi čak do 75% (Berg i sur., 2013.).

Topljivi šećeri i proteini su dva važna faktora koja pridonose promjenjivim osmotskim stanjima koje uzrokuje stres suše u biljkama (Chaves i sur, 2003.). Neki znanstvenici predlažu da biljke koriste ova dva kompatibilna osmolita (osmoprotektanta) kako bi smanjili svoj osmotski potencijal i podnijele pozitivne tlakove u sušnim uvjetima. Istraživanje na biljci *Cenchrus pauciflourus* pokazalo je da postoji mnogo veće nakupljanje topivih proteina u biljkama izloženim stresom. Ovako dobiveni rezultati poklapaju se sa drugim istraživanjima koja također pokazuju da su topljivi šećeri i proteini važni za otpornost biljaka na sušu. Topljivi su proteini oblik pohrane dušika u biljkama te njihovo nakupljanje pod stresom suše potiče osmotsku regulaciju i brz oporavak rasta nakon što je stres otklonjen (Chen i sur., 2019..). Promjena sadržaja topljivih proteina pod stresom suše često je praćena promjenom u komponenti proteina. Prema provedenom istraživanju na biljci *Artemisia halodendron* sadržaj topivih proteina povećao se kako se produžilo trajanje suše, ali je njihov sadržaj tijekom umjerene suše bio niži nego u kontroliranoj biljci (Chen i sur., 2019.). Kod istraživanja provedenih na kaparu Sadhegi i Rostami (2017.) utvrdili su povećanje ukupnog sadržaja proteina u kaparu tijekom sušnog perioda. Ovako slični rezultati povećanja ukupnog sadržaja proteina dobiveni su i za šećernu repu i divlju repu (Bor i sur., 2003.), rižu (Türkan i Demiral, 2009.), kukuruzu (Saed-Moochesi i sur., 2014.c) i bobu (Azooz i sur., 2011.).

2.3.5. Aktivnost antioksidacijskih enzima kod biljaka

Na biljci *Artemisia halodendron* provedeno je istraživanje sa svrhom utvrđivanja aktivnosti SOD-a pri stresu suše. Prilikom induciranja stresa suše utvrđeno je smanjenje aktivnosti SOD-a u uvjetima jake suše, ali se aktivnost peroksidaze i katalaze te sadržaj ukupnih topivih proteina, šećera i slobodnog prolina povećao (Chen i sur., 2019.). Istraživanje na biljci *Artemisia halodendron* utvrđeno je da je njezina tolerancija na sušu posljedica povećane enzimatske aktivnosti POD-a i CAT-a te nakupljanja osmoregulacijskih tvari (Chen i sur., 2019.). Sva tri parametra su bila u pozitivnoj korelaciji s osmotskim regulatorom, ali u negativnoj korelaciji sa sadržajem klorofila i aktivnošću SOD-a. Kod istraživanja provedenih na biljkama pamuka promatrane su aktivnosti POD-a u listovima glavne stabljike pamuka, te listovima s nižih i srednjih grana biljke pod utjecajem stresa suše, te je kod svih uočen fenomen inicijalnog pada i zatim rasta, što je vjerojatno povezano s karakteristikama djelovanja enzima POD u uvjetima suše (Li i sur., 2010.). Kod vrste *Panicum sumatrense* pod stresom suše duljina korijena se postupno povećavala u svim fazama rasta, dok su se smanjili pigmenti klorofila i visina biljke (Ajithkumar i Panneerselvam, 2014.). Prema navedenim autorima otopljene tvari

poput prolina, glicin-beatin i slobodnih aminokiselina povećane su u svim tretmanima suše (tretmani su provođeni zalijevanjem biljaka u intervalima od jednog dana, 4-tog dana, 7-mog dana, 10-tog dana i 13 dana). U istom istraživanju također je zabilježena povećana aktivnost antioksidacijskih enzima superoksid dismutaze (SOD), CAT i POD koji su ovoj vrsti omogućili visok stupanj tolerancije na stres suše. Ford i sur. (2011.) su proučavali kvantitativne promjene u sadržaju proteina australijske sorte krušne pšenice (*Triticum aestivum L.*) kao odgovor na stres suše. U istraživanju su korištene 3 sorte pšenice: Kukri (osjetljiva na sušu), Excalibur (tolerantna na sušu) i RAC875 (tolerantna na sušu). Kod sve 3 sorte utvrđene su promjene u skladu s povećanjem metabolizma oksidativnog stresa i kapaciteta uklanjanja ROS-a, što se vidi kroz povećanje CAT-a i SOD-a, a smanjenjem sadržaja proteina u listu.

3. Materijali i metode

U ovom istraživanju korištene su jednogodišnje sadnice kapara (*Caparis spinosa*) kao modelni organizam. Pokus je bio postavljen u komorama rasta Zavoda za oplemenjivanje bilja, genetiku i biometriku Agronomskog fakulteta u Zagrebu. U komorama rasta fotoperiod je iznosio 16/8 sati (svjetlo/tama), temperatura 27/20 ˚C (dan/noć) i konstantna 40 %-tna vlažnost zraka. U pokus je bilo uključeno ukupno 60 sadnica kapara.

Tijekom pokusa volumni sadržaj vode u supstratu redovito je mjeren pomoću Theta probe ML2x senzora povezanog s HH2 moisture meter (Delta-T Devices LTD., Cambridge, UK).

Vlaga u supstratu je održavana na 45±5% do trenutka početka zasušivanja. Tretman suše izazvan je prestankom navodnjavanja biljaka uz nastavak praćenja volumnog sadržaja vode u supstratu. Tretman zasušivanja trajao je 20 dana. Uzorak lisnog tkiva za analizu RWC-a, ukupnih proteina, SOD i POX uzet je pri vlazi supstrata od:

- 40±5% (kontrolni tretman - K) (slika 3.1.1.),
- 30±5% (slaba suša- LD)
- 20±5% (umjerena suša – MD)
- 10±5% (jaka suša – SD)) (slika 3.1.2.)
- 24 sata nakon zalijevanja (24 h)
- 48 sati nakon zalijevanja (48 h)).

Sa sadnica je uzorkovan peti list od vrha grane, a po tretmanu je uzeto po deset uzoraka.
Za statističku analizu korištena je analiza varijance ANOVA i Bonferroni test. Povezanost između proučavanih svojstava utvrđena je računanjem Pearsonovih korelacijskih koeficijenata. Analize su provedene pomoću SAS verzije 9.1.

3.1. Određivanje relativnog sadržaja vode u listu

Za određivanje relativne količine vode (engl. Relative Water Content, RWC) listovi sadnica su razrezani na 4 djela i odmah je izvagana masa svježe tvari (engl. fresh weight, FW). Tkivo je prebačeno u čašu s destiliranom vodom i ostavljeno stajati tri sata na sobnoj temperaturi, kako bi se postigao maksimalni turgor (do potpune hidracije). Za određivanje vrijednost TW (engl. turgid weight) tkivo je izvađeno iz vode, posušeno papirnatim ručnikom i ponovo izvagano. Uzorak je potom pincetom premješten u papirnatu škarniclu i stavljen u sušionik na 105°C. Nakon 24 sata određena je masa suhe tvari (engl. dry weight, DW). Sve odvage su izmjerene analitičkom vagom s preciznošću od 0,0001 g. Svaki tip uzoraka izmjeren je u 5 ponavljanja. Analiza je izvršena na način kako je opisano u radu Keles i Öncel (2004).
Konačna vrijednost RWC-a izračunata je prema standardnom izrazu koristeći vrijednosti FW, TW i DW.

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



Slika 3.1.1. Biljka kapara prije tretmana suše



Slika 3.1.2. Biljka kapara pri jakoj suši
(Izvor: Ivanka Habuš Jerčić)

3.2. Izolacija topljivih i membranskih proteina

U pokusu su biljke kapara postavljene u 6 tretmana sa 2 ponavljanja. Nakon završenog tretmana te sušenja listova učinjena je izolacija topivih i membranskih proteina. Za izolaciju proteina su uzeti listovi te su samljeveni u tresilici. Nakon mljevenja listova izvagano je 100 mg uzorka u epruvetu (slika 3.2.1.) .



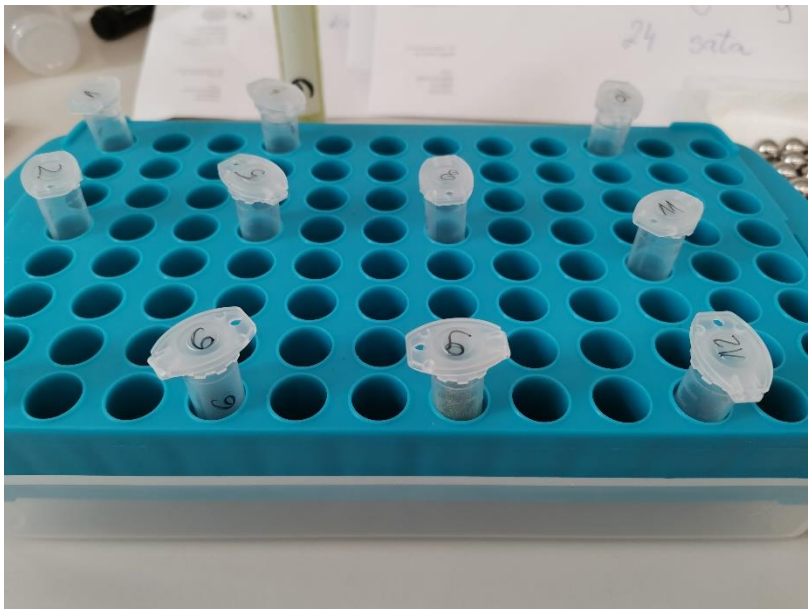
Slika 3.2.1. Samljeveni uzorci
(Izvor: Dario Srebačić)

3.3. Određivanje koncentracije proteina po Bradford-u

Koncentracija proteina u uzorcima koji su pripremljeni mjereni su spektofotometrijskom metodom po Bradfordu (1976.). Ovaj postupak određivanja koncentracije proteina temelji se na brzom pomaku maksimuma apsorbacije, od 465 nm na 595 nm, koji se javlja u trenutku kada se boja Coomassie briljant plavo G-250 (eng. Comassie Briliant Blue), u kiseloj otopini, veže na bočne ogranke aminokiselina pri čemu se boja otopine mijenja iz zelenkaste u plavu. Smatra se da se u kiseloj sredini (otopini) elektrostatskim silama sulfatne grupe bolje vežu s aminokiselinskim ostacima polipeptida. Određivanje proteina vršeno je na valnoj duljini od 595 nm. Koncentracija proteina svakog pojedinog uzorka ekstrapoliran je iz standardne krivulje koja je dobivena mjerenjem apsorbancije niza razrijeđenog goveđeg albuminskog seruma (BSA, eng. Bovine serum albumin).

Bradford radna otopina pripremljena je miješanjem 50 ml 95%-tnog etilnog alkohola, 100 ml 85%-tne fosforne kiseline, 100 mg Coomassie briljant plavo G-250 i destilirana voda do 1000 ml. Nakon što je napravljena razrijeđena BSA otopina za standardnu krivulju, pripremljena slijepa proba koja se sastojala od 100 µl deH_2O i pufera u kojem su pripremani uzorci. Uzorci su prije mjerenja količine proteina razrijeđeni 10 puta te se u kivete pipetiralo 100 µl. Zatim se u kivetu pipetiralo 1 ml Bradfordova reagensa i izmiješalo se (slika 3.3.1.).

Nakon što je uzorak odstajao 5 min pri sobnoj temperaturi, izmjerena je apsorbancija pri 595 nm prema slijepoj probi kojoj je dodan reagens.



Slika 3.3.1. Pripremljeni uzorci za analizu
(Izvor: Dario Srebačić)

3.4. Mjerenje aktivnosti superoksid-dismuntaze (SOD)

Za potrebe određivanja sadržaja SOD-a u ovome radu korištena je spektrofotometrijska metodom detekcije koja se temelji na upotrebi nitro plavog tetrazolijskog klorida (NBT) kao supstrata, prema Giannopolites i Ries (1977.). U prisutnosti superoksidnih radikala, NBT se reducira u neotopiv, plavo obojeni formazan koji se pokazuje apsorbacijski maksimum na valnoj duljini od 560 nm. Ukoliko je prisutan SOD, redukcija samoga NTB-a je inhibirana. Aktivnosti SOD-a izražava se kao ona količina enzima koja uzrokuje 50% inhibicije redukcije NBT-a pri 560 nm u prisutnosti riboflavina na svjetlu.

Dan prije same analize izrađen je pufer za izdvajanje proteina (pH 7,0). Pripremljeno je 50 ml pufera koji se sastoji od 1,583 ml 1 M otopine K_2HPO_4 i 0,963 ml 1M otopine KH_2PO_4, dodano je 500 µl 10 mM EDTA (etilendiaminotetraoctena kiselina) i 49 mg Na-askorbata (44 mg askorbinske kiseline) i nadopunjeno je do 50 ml reH_2O. Otopina je čuvana na temperaturi od 4 ˚C. Također za određivanje sadržaja SOD-a pripremljen je pufer za mjerenje aktivnosti SOD-a. Za 200 ml pufera odpipetirano je 9,08 ml 1 M otopine K_2PO_4 i 0,92 1 M otopine KH_2PO_4, dodano je 2 ml 10 mM EDTA, 0,388 g metionina, 127 mg NBT-a te je nadopunjeno do 200 ml reH_2O. Uz to je otopljen 2%-tni polivinil-polipirolidon (PVPP-veže polifenole koji bi mogli smetati pri reakciji) u deH_2O.

Za određivanje SOD-a izvagano je 100 mg uzorka te je homogenizirano u 1 ml hladnog pufera za izdvajanje proteina (pH 7,0) i dodano je 200 µl PVPP-a. Nakon toga je izvršena centrifugacija uzorka 20 min pri 29 000 x g pri temperaturi od 4 ˚C (slika 3.4.1.). Nakon što je završeno centrifugiranje uzorci su stavljeni u hladno te je izuzet ekstrakt od taloga. Za mjerenje SOD-a pomiješan je volumen ekstrakta i pufer za izdvajanje proteina (pH 7,0) ukupnog volumena 0,1 ml. U kivetu je stavljeno 2,9 ml pufera za mjerenje aktivnosti SOD-a (pH 7,8) i 0,1 ml ekstrakta pomiješanog sa puferom te je dodan riboflavin (2 µM). Uzorci su zatim pomiješani i stavljeni 10 min ispod izvora svjetla te je bila pokrenuta reakcija koja je zaustavljena zamračivanjem uzoraka. Spektrofotometar je prije očitavanje uzorak podešen na nultu vrijednost slijepom probom koja je označena slovom A. Kada je izvršeno podešavanje na nultu vrijednost očitavane su vrijednosti uzoraka i izrađena je krivulja aktivnosti.



Slika 3.4.1. Centrifugiranje uzoraka za analizu
(Izvor: Dario Srebačić)

3.5. Mjerenje aktivnosti nespecifičnih peroksidaza

Nespecifične peroksidaze (POX) određivane su pomoću spektrofotometra. Za izvedbu mjerenja peroksidaza napravljen je 50 mM kalij-fosfatni pufer (pH 7,0). Izrađeno je 50 ml pufera u koji se pipetiralo 1,583 ml 1 M otopine K_2HPO_4 i 0,936 1 M otopine KH_2PO4 te je nadopunjeno deH_2O do 50 ml. Pufer za mjerenje aktivnosti POX-a sastojao se od 50 mM KP-pufera, 18 mM gvajakol i 5 mM H_2O_2. Za 50 ml pufera za mjerenje aktivnosti POX-a dodano je

100,65 µl gvajakola, 25,5 µ 30% H_2O_2 te je nadopunjeno 50 mM KP-puferom (pH 7,0) do 50 ml. U kivetu za određivanje POX-a dodano je 950 µl pufera za mjerenje aktivnosti POX-a i dodano je 10 µl uzorka. Apsorbancija je mjerena spektroforometrom svakih 15 s tijekom 2,5 min pri valnoj duljini od 470 nm (slika 3.5.1.).



Slika 3.5.1. Mjerenje vrijednosti uzoraka spektrofotometrom
(Izvor: Dario Srebačić)

4. Rezultati i rasprava

4.1. Analiza varijance

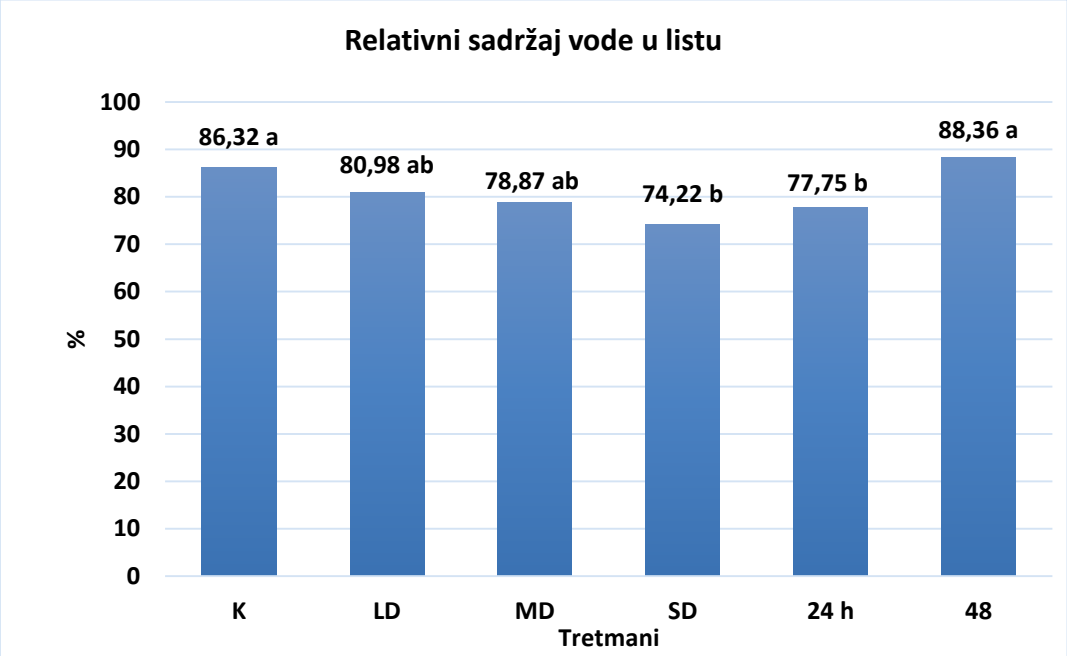
Tablica 4.1. Analiza varijance (ANOVA) za RWC, ukupne proteine, SOD i POX

Svojstvo	Prosječni kvadrat	Signifikantnost (P)
RWC	0,0063	0,0037**
UKUPNI PROTEINI	0,2417	<0,001***
SOD	713,57	<0,001***
POX	0,1688	<0,001***

,* F vrijednost signifikantna kod p<0,01, p<0,001

U tablici 4.1. prikazani se rezultati analize varijance za relativni sadržaj vode (RWC), sadržaj ukupnih proteina, aktivnost superoksid dismutaze (SOD) i peroksidaze (POX) u listu kapara izloženih različitom intenzitetu stresa suše. Analiza varijance ukazuje na postojanje statistički značajne razlike pri različitom intenzitetu suše kod svih mjerenih svojstava.

4.2. Relativni sadržaj vode u listu (RWC)



Grafikon 4.2. Relativni sadržaj vode u listu

Tretmani: (kontrolni tretman - K), (slaba suša- LD), (umjerena suša – MD), (jaka suša – SD), 24 sata nakon zalijevanja (24 h), 48 sati nakon zalijevanja (48 h). Vrijednosti označene istim slovom ne razlikuju se pri $p<0,05$

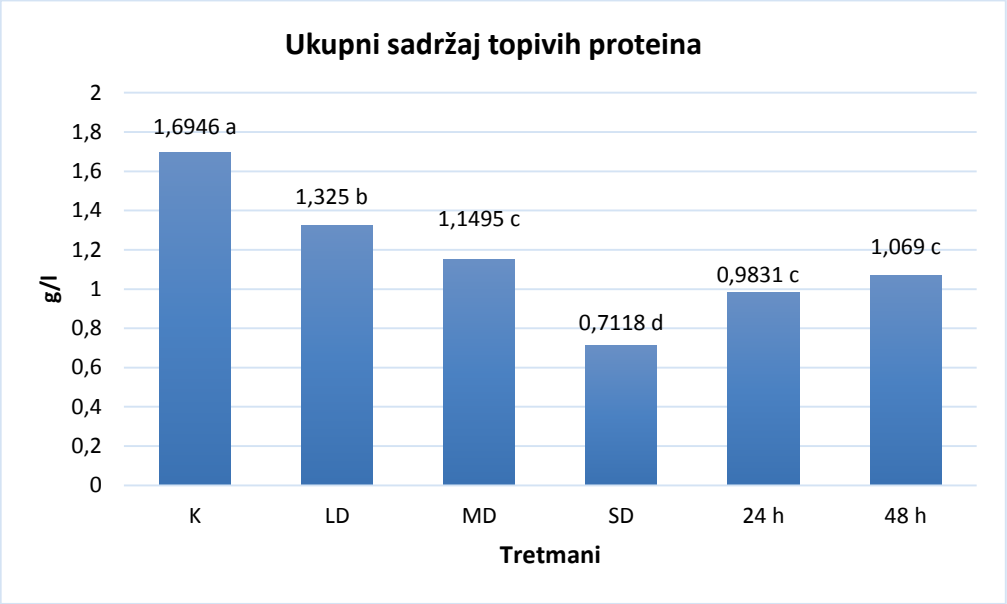
Na grafikonu 4.2. prikazan je relativni sadržaj vode u listu kapara pri različitom udjelu vode u supstratu. U kontrolnom tretmanu RWC u listu iznosio je 86,3%. Kako je zbog zasušivanja volumni sadržaj vode u supstratu opadao, smanjivao se i relativni sadržaj vode u listu. Pri blagoj i umjerenoj suši relativni sadržaj vode nije se značajno promijenio, međutim pri jakoj suši utvrđeno je značajno smanjenje RWC u odnosu na kontrolni tretman. RWC kod jakog intenziteta suše iznosio je 74,2%.

Nakon prekida zasušivanja (pri volumnom sadržaju vode u supstratu od 10 %) biljke kapara su zalijane te je nakon 24 sata utvrđen porast RWC-a u odnosnu na jaku sušu, međutim utvrđena razlika u RWC-u nije značajna. 48 sati nakon zalijevanja postotak RWC-a se dodatno povećava i utvrđeni RWC je značajno veći u odnosu na RWC izmjeren u jakoj suši ili 24 sata nakon zalijevanja. Na grafikonu 4.2. vidljivo je da se RWC kod biljaka kapara u kontrolnom tretmanu i kod zalijanih biljaka nakon 48 sati statistički značajno ne razlikuju.

Dobiveni rezultati u suglasnosti su s rezultatima Xu i sur. (2009.), koji su proveli istraživanje na biljci *Leymus chinensis.* Pri različitom intenzitetu suše određivali su relativni sadržaj vode u listu. Jaka i ekstremna suša uzrokovale su značajan pad RWC-a u odnosu na kontrolni tretman.

No usprkos značajnom smanjenju RWC kod jake i ekstremne suše, i u njihovom istraživanju kao i u našem, nakon zalijevanja RWC u listu se značajno povećao. RWC u listovima zalijanih biljaka nakon 48 sati od zalijevanja značajno se povećao u odnosu na RWC izmjeren u jakoj suši i dosegao je vrijednost kao u listovima u kontrolnom tretmanu.

4.3. Ukupni sadržaj topivih proteina



Grafikon 4.3. Sadržaj ukupnih proteina u uzorcima kapara

Tretmani: (kontrolni tretman - K), (slaba suša- LD), (umjerena suša – MD), (jaka suša – SD), 24 sata nakon zalijevanja (24 h), 48 sati nakon zalijevanja (48 h). Vrijednosti označene istim slovom ne razlikuju se pri $p<0,05$

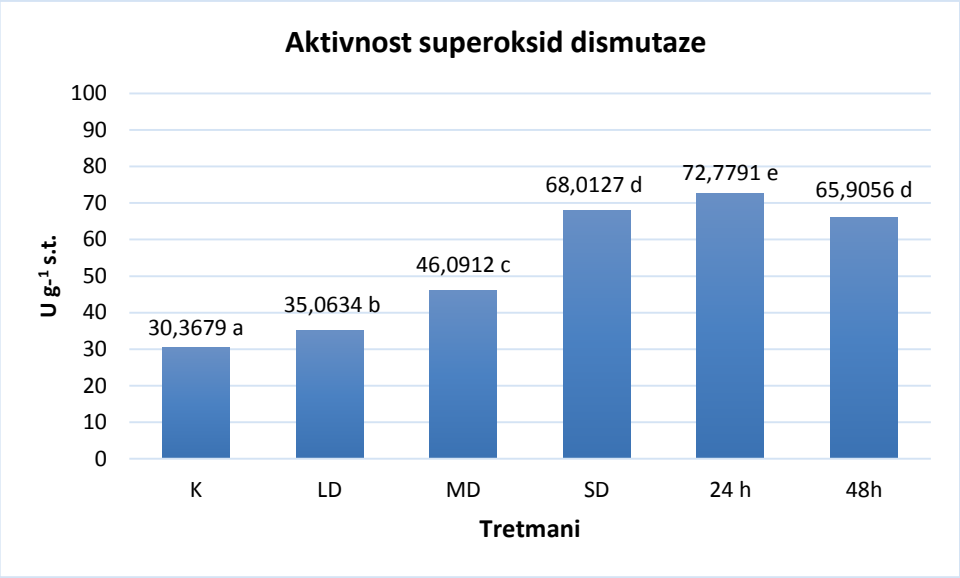
Grafikon 4.3. prikazuje sadržaj ukupnih proteina u sadnicama kapara pri različitom udjelu vode u supstratu. Najveća vrijednost ukupnih proteina izmjerena je u kontrolnom tretmanu i iznosila je 1,69 g/l. Smanjenje udjela vode u supstratu od cca 10% značajno je utjecalo na smanjenje sadržaja topivih proteina u listu kapara. Najmanji sadržaj ukupnih proteina izmjeren je kod jake suše i iznosio je 0,71 g/l.

24 i 48 sati nakon zalijevanja sadržaj ukupnih proteina u listu se značajno povećao u odnosu na sadržaj kod jakog stresa suše, međutim nije dosegao vrijednost utvrđenu u kontrolnom tretmanu već vrijednost približno jednaku umjerenoj suši.

Dobiveni rezultati u suprotnosti su s rezultatima Sadhegi i Rostami (2017.) i Chen i sur. (2019.). Sadhegi i Rostami (2017.) su utvrdili povećanje sadržaja ukupnih proteina tijekom sušnog perioda kod kapara. U suglasnosti s prethodno navedenim autorima Chen i sur. (2019.) su u istraživanju provedenom na biljci *Artemisia halodendron* utvrdili povećanje sadržaja topivih proteina s intenzitetom suše. Međutim tijekom umjerene suše sadržaj proteina je bio

manji nego u kontroliranom tretmanu. Na osnovu ovog istraživanja mogli bi zaključiti da 10% udio vode kod kapara ne predstavlja jaku sušu, već umjerenu.

4.4. Aktivnost superoksid dismutaze (SOD)



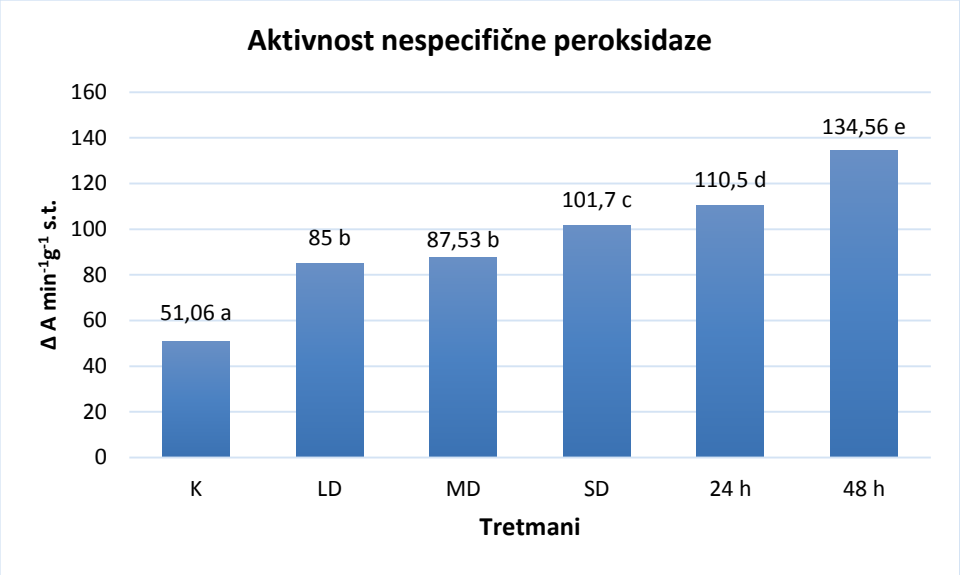
Grafikon 4.4. Aktivnost superoksid dismutaze u listovima kapara izloženim različitom intenzitetu suše

Tretmani: (kontrolni tretman - K), (slaba suša- LD), (umjerena suša – MD), (jaka suša – SD), 24 sata nakon zalijevanja (24 h), 48 sati nakon zalijevanja (48 h). Vrijednosti označene istim slovom ne razlikuju se pri $p<0,05$

Grafikon 4.4. prikazuje aktivnost superoksid dismutaze u listovima kapara izloženim različitom intenzitetu suše. Aktivnost SOD-a u listovima značajno se povećavala s intenzitetom stresa suše. Tako je u kontrolnom tretmanu aktivnost SOD-a po gramu suhe tvari iznosila 30,36, a kako se volumni udio vode u supstratu smanjivao povećavala se aktivnost SOD-a koja je kod jake suše iznosila 68,01 jedinica po gramu suhe tvari. Međutim 24 sata nakon zalijevanja u listu kapara se aktivnost SOD-a također značajno povećala u odnosu na jaku sušu, a tek 48 sati nakon zalijevanja se počela smanjivati. Iz grafikona 4.4. vidljivo je da ne postoji statistički značajna razlika u aktivnosti SOD-a u listovima između zalijanih biljaka nakon 48 sati i biljaka u jakoj suši. Razlog tome je vjerojatno u signalnim putevima koji reguliraju ekspresiju gena odgovornih za sintezu SOD-a.

Dobiveni rezultati u suglasnosti su s rezultatima Ajithkumar i Panneerselvam (2014.) koji su kod istraživanja na vrsti *Panicum sumatrens* zabilježili povećanu aktivnost antioksidacijskog enzima superoksid dismutaze (SOD) koji su ovoj vrsti omogućili visok stupanj tolerancije na stres sušu. Ford i sur. (2011.) su na 3 tipa krušne pšenice također utvrdili povećanu aktivnost SOD-a kod tolerantnijih genotipova pšenice.

4.5. Aktivnost nespecifične peroksidaze (POX)



Grafikon 4.5. Prikaz aktivnosti peroksidaza u listovima kapara izloženim različitom intenzitetu stresa suše

Tretmani: (kontrolni tretman - K), (slaba suša- LD), (umjerena suša – MD), (jaka suša – SD), 24 sata nakon zalijevanja (24 h), 48 sati nakon zalijevanja (48 h). Vrijednosti označene istim slovom ne razlikuju se pri $p<0,05$

Grafikon 4.5. prikazuje aktivnost nespecifične peroksidaze u listovima kapara izloženim različitom intenzitetu suše. Najmanja aktivnost POX-a izmjerena je u listovima kapra u kontrolnim uvjetima i iznosila je 51,06 $min^{-1}g^{-1}$ s.t. Prilikom smanjivanja volumnog udjela vode u supstratu aktivnost peroksidaze je rasla. Međutim kod blage i umjerene suše njezina aktivnost nije bila značajno veća, dok se kod jake suše njezina aktivnost značajno povećala i iznosila je 101,7 $min^{-1}g^{-1}$ s.t . Dobiveni rezultati u suglasnosti su s rezultatima Li i sur . (2010.) koji su pratili aktivnost peroksidaze u listovima pamuka u suši. Utvrdili su incijalno slabiju aktivnost peroksidaze, a s porastom intenziteta suše porast aktivnosti. Istraživanjem koje smo proveli na biljkama kapra utvrdili smo također porast aktivnosti POX-a u listovima s povećanjem intenziteta suše.

Usprkos zalijevanju aktivnost peroksidaze u listovima kapra se nakon 24 i 48 sata i nadalje značajno povećavala. Dobiveni rezultati u suprotnosti su s rezultatima Mafakheri i sur. (2011) koji su utvrdili kod slanutka povećanje aktivnosti peroksidaze s jačinom stresa (zasušivanje kroz 40 dana), te smanjenje njene aktivnosti 20 dana nakon prekida suše (ponovnog zalijevanja). Razlog dodatnog povećanja aktivnosti peroksidaze je vjerojatno u uzorkovanju listova prebrzo nakon zalijevanja. Da je uzorkovanje bilo provedeno kasnije možda bi dobiveni rezultati bili u suglasnosti s rezultatima navedenih autora.

4.6. Korelacija

Tablica 4.6. Korelacija između RWC-a, SOD-a, Ukupnih proteina i POX-a

	RWC	SOD	Ukupni proteini	POX
RWC				
SOD	-0,32636*			
Ukupni proteini	0,606101**	-0,83666**		
POX	-0,0217	0,8345**	-0,70854**	

*,** vrijednost signifikantna kod p<0,05, p<0,01

Osim analize varijance izračunate su korelacije između izmjerenih parametara. Koeficijenti korelacije značajni na razini p<0,05 označeni su jednom zvjezdicom (*), dok su koeficijenti korelacije značajni na razini p<0,01 označeni s dvije zvjezdice (**). Korelacije su prikazane u Tablici 4.6.

Smanjenje RWC-a u listovima zbog suše korelirano je (p<0,05) s povećanom aktivnosti superoksid dismutaze (-0,326). Visoka pozitivna korelacija (p<0,01) uočena između RWC i ukupnih proteina u listu (0,606).
Vrlo visoka negativna korelacija uočena je između ukupnih topljivih proteina i SOD-a (-0,836) te POX-a (-0,709), dok je vrlo visoka pozitivna korelacija uočena između SOD-a i POX-a (0,8345).

Dobiveni rezultati u suglasnosti su s rezultatima Ford i sur. (2011.) koji su utvrdili s povećanjem stresa suše (smanjenjem RWC) povećanu aktivnost CAT-a i SOD-a, a smanjeni sadržaj proteina u listu.

5. Zaključak

Cilj istraživanja bio je utvrditi utjecaj ekstremnog zasušivanja na relativni sadržaj vode u listu sadnica kapara, sadržaj ukupnih proteina te aktivnost antioksidacijskih enzima. Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti da:

- Stres suše (zasušivanja) značajno utječe na sva mjerena svojstva (RWC, ukupni sadržaj topljivih proteina, aktivnost superoksid dismutaze i peroksidaze)
- Relativni sadržaj vode u listu, kao i ukupni sadržaj topljivih proteina značajno se smanjio s stresom suše u odnosu na kontrolni tretman, a 48 sati nakon zalijevanja povećao se do vrijednosti koja je utvrđena u listu u kontrolnim uvjetima (prije induciranja stresa)
- Aktivnost superoksid dismutaze i peroksidaze se značajno povećavala s intenzitetom suše, no aktivnost superoksid dismutaze 48 sati nakon zalijevanja opada, dok se aktivnost peroksidaze ne smanjuje

6. Literatura

1. Abdalla M.M. and El-Khoshiban N.H. (2007). The influence of water stress on growth, relative water content, photosynthetic pigments, some metabolic and hormonal contents of two Triticium aestivum cultivars. Journal of Applied Scientific Research 3, 2062–2074.
2. Ajithkumar I.P., Panneerselvam, R. (2014). ROS scavenging system, osmotic maintenance, pigment and growth status of Panicum sumatrense roth. under drought stress. Cell Biochem. Biophys. 2014, 68, 587–595.
3. Aliyazicioglu, R., Tosun, G., and Eyupoglu, E. (2015). Characterisation of volatile compounds by spme and gc-fid/ms of capers (Capparis spinosa L.). Afr. J. Agric. Res. 10, 2213–2217.
4. Antunović J. (2013). Utjecaj ekstremnog zasušivanja na biokemijske i fiziološke značajke klijanaca ječma (Hordeum vulgare L.) uzgojenih pri slabom i jakom osvjetljenju. Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Sveučilište u Dubrovniku, Institut Ruđer Bošković. Doktorski rad
5. Asada K. (1992). Ascorbate peroxidase – a hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. Plant Physiol. 55, 235-241.
6. Azooz M. M., Youssef A. M. & Ahmad P. (2011). Evaluation of salicylic acid (SA) application on growth, osmotic solutes and antioxidant enzyme activities on broad bean seedlings grown under diluted seawater. International Journal of Plant Physiology and Biochemistry, 3, 253–264.
7. Bajlo K. (2017). Poboljšanje klijavosti sjemena kapare (Capparis orientalis Veill.). Sveučilište u zagrebu, Agronomski fakultet. Diplomski rad.
8. Barbera G. (1991). “Le câprier (Capparis spp.),” in Programme de Recherche Agrimed, ed B. Guiseppe (Luxembourg: Commission des Communautés européennes L- 2920), 62.
9. Basu S., Ramegowda V., Kumar A., Pereira A. (2016). Plant adaptation to drought stress (version 1; referees: 3 approved) F1000Research 2016, 5 (F1000 Faculty Rev):1554 (doi: 10.12688/f1000researgh.7678.1) –pristupljeno 27.01.2022.
10. Berg J.M., Tymoczko J.T., Stryer L. (2013). Biokemija, Školska knjiga, Zagreb, 2013.
11. Bita, C. E., and Gerats, T. (2013). Plant tolerance to high temperature in a changing environment: scientific fundamentals and production of heat stress-tolerant crops. Front. Plant Sci. 4:273. doi: 10.3389/fpls.2013.00273 –pristupljeno 12.12.2021.
12. Blum A. (1998). Principal estimates of plant water status for selection work. AFRA Regional Training Course: selection methods for drought tolerance in cereals and legumes. ARC-Roodeplaat, Pretoria, South Africa.
13. Bor M., Özdemir F. & Türkan I. (2003). The effect of salt stress on lipid peroxidation and antioxidants in leaves of sugar beet Beta vulgaris L. and wild beet Beta maritima L. Plant Science, 164, 77–84.

14. Bradford M.M. (1976). A rapid and sensitive assay for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72, 248-254.
15. Chalak L., Perin A., Elbitar A., and Chehade A. (2007). Phenotypic diversity and morphological characerization of Capparis spinosa L. in Lebanon. Biol. Tunisie4, 28–32.
16. Chaves M.M.; Maroco J.P.; Pereira J.S. (2003). Understanding plant responses to drought—From genes to the whole plant. Funct. Plant Biol. 2003, 30, 239–264.
17. Chedraoui S., Abl-Rizk A., El-Beyrouthy M., Chalak L., Ouaini N., Rajjou L. (2017). Capparis spinosa L. in Systematic Review: A Xerophilous Speciesof Multi Values and Promising Potentialities for Agrosystems under the Threat of Global Warming. Front. Plant Sci. 1845. doi: 10.3389/fpls.2017.01845
18. Chen J., Zhao X., Zhang Y., Li Y., Luo Y., Ning Z., Wang R., Cong A. (2019). E ects of Drought and Rehydration on the Physiological Responses of Artemisia halodendron. Water 2019, 11, 793; doi:10.3390/w11040793
19. Choudhury S., Panda P., Sahoo, L., Panda S.K. (2013). Reactive oxygen species signaling in plants under abiotic stress. Plant Signal. Behav. 2013, 8, e23681.
20. Dat J., Vandenabeele S., Vranová E., Van Montagu M., Inzé D., Van Breusegem, F. (2000). Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. Cell. Mol. Life Sci. 57, 779-795.
21. De Carvalho Cruz, M.H. (2008). Drought stress and reactive oxygen species: Production, scavenging and signaling. Plant Signal. Behav. 2008, 3, 156–165.
22. Del Río, L.A. (2015). ROS and RNS in plant physiology: An overview. J. Exp. Bot. 2015, 66, 2827–2837.
23. DHMZ-Državni hidrometeorološki zavod
24. Faran M. (2014). “Capparis spinosa - the plant on the wall,” in Medicinal and Aromatic Plants of the Middle-East (Medicinal and Aromatic Plants of the World), eds Z. Yaniv and N. Dudai (Dordrecht: Springer Netherlands), 59–65.
25. Fici, S. (2014). A taxonomic revision of the Capparis spinosa group (Capparaceae) from the Mediterranean to Central Asia. Phytotaxa. 174, 1–24. doi: 10.11646/phytotaxa.174.1.1
26. Ford K.L., Cassin A., Bacic A. (2011). Quantitative proteomic analysis of wheat cultivars with differing drought stress tolerance. Front. Plant Sci. 2011, 2, doi:10.3389/fpls.2011.00044.
27. Gallie D.R. (2013).The role of L-ascorbic acid recycling in responding to environmental stress and in promoting plant growth. J. Exp. Bot. 2013, 64, 433–443.
28. Gan L., Zhang C., Yin Y., Lin Z., Huang Y., Xiang, J., et al. (2013). Anatomical adaptations of the xerophilous medicinal plant, Capparis spinosa, to drought conditions. Hortic. Environ. Biotechnol. 54, 156–161. doi: 10.1007/s13580-013-0162-3
29. Gaspar T., Penel C., Hagege D. i Greppin H. (1991). Peroxidases in plant growth, differentiation and developmental processes. U: Lobarzewski, J., Greppin H., Penel C. i Gaspar Th. (urednici): Biochemical, Molecular and Physiological Aspects of Plant

Peroxidases, 249-280, University M. Currie-Sklodowska, Lublin, Poljska and University of Geneva, Ženeva, Švicarska.
30. Giannopolitis C.N., Ries S.K. (1977). Superoxide dismutase. I. occurrence in higher plants. Plant Physiol. 59, 309-314.
31. Gill S. S. & Tuteja N., (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. Plant physiology and biochemistry 48(12), December, pp. 909-30.
32. Grlić Lj. (2005). Enciklopedija samoniklog jestivog bilja. Ex libris, Zagreb.
33. Hancock J.T., Desikan R., Clarke A., Hurst R.D., Neill S.J. (2002). Cell signalling following plant/pathogen interactions involves the generation of reactive oxygen and reactive nitrogen species. Plant Physiol Bioch 40(6-8):611-617.
34. Heidari S., Fotouhi Ghazvini R., Zavareh M., Kafi M. (2018). Flowering, Physiological and Biochemical Responses of Two Echinacea Species to Drought Stress. Agric. conspec. sci. Vol. 84 (2019) No. 3 (263-270).
35. Hiraga S., Sasaki K., Ito H., Ohashi Y., Matsui H. (2001.) A large family of Clas III plant peroxidases. Plant Cell Physiol 42 (5): 462-468.
36. Hirota O., Oka M., Takeda T. (1990). Sink activity estimation by sink size and dry matter increase during the ripening stage of barley (Hordeum vulgare) and rice (Oryza sativa). Ann Bot. 1990; 65(4): 349–353.
37. Hossain M.A., Bhattacharjee S., Armin S.M., Qian P., Xin W., Li H.Y., Burritt D.J., Fujita M., Tran L.S. (2015). Hydrogen peroxide priming modulates abiotic oxidative stress tolerance: Insights from ROS detoxification and scavenging. Front. Plant Sci. 2015, 6, 420.
https://meteo.hr/klima.php?section=klima_pracenje&param=spi&el=saznajte_vise – pristup 15.12.2021.
38. Hyman S., Fujisaka P., Jones, S., Wood M. De, Vicente C., Dixon J., (2008). Strategic approaches to targeting technology generation: assessing the coincidence of poverty and drought-prone crop production. Agricultural Systems 98, 50–61.
39. Jongdee B, Fukai S, Cooper M. (2002). Leaf water potential and osmotic adjustment as physiological traits to improve drought tolerance in rice. Field Crops Res 76(2-3):153-163.
40. Keles Y., Öncel I. (2004). Growth and Solute Composition in Two Wheat Species Experiencing Combined Influence of Stress Conditions. Russ J Plant Physl 51(5): 203-208.
41. Kim K.S.; Park S.H.; Jenks M.A. (2007). Changes in leaf cuticular waxes of sesame (Sesamum indicum L.) plants exposed to water deficit. J. Plant Physiol. 2007, 164, 1134–1143.
42. Kolarić D. (2016). Utjecaj nepovoljnih vremenskih prilika na prinos ratarskih kultura. Sveučilište Josip Juraj Strossmayer u Osijeku. Završni rad.
43. Kovačević R. (2005). Kapar. Kapari d.o.o., Split.

44. Laxa M., Liebthal M., Telman W., Chibani K., Dietz K.J. (2019). The Rolw of the Plant Antioxidant System in Drought Tolerance. MDPI, Basel, Switzerland.
45. Lazarević B., Poljak M. (2019). Fiziologija bilja, Sveučilište u Zagrebu Agronomski fakultet, Zagreb
46. Li D., Li. C., Sun H.. Wang W., Liu L., Zhang Y. (2010). Effects of drought on soluble protein content and protective enzyme system in cotton leaves. Front. Agric. China 2010, 4(1): 56–62 DOI 10.1007/s11703-010-0102-2
47. Mafakheri A. & Siosemardeh A. & Bahramnejad B, & Struik P. & 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 - AUSTJ CROP SCI. 5. 1255-1260.
48. Mathe C., Barre A., Jourda C., Dunand C. (2010). Evolution and expression of class III peroxidases. Arch Biochem Biophys 500: 58-65.
49. Micco V.D., Aronne G. (2002). In Plant Responses to Drought Stress. (ed Aroca. Ricardo). Springer, 2002.
50. Mihaljević LJ. (2015). Oporavak klijanaca ječma rehidracijom nakon stresa izazvanog sušom. Sveučilište Josip Juraj Strossmayer u Osijeku. Diplomski rad
51. Mittler R. (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. Trends Plant Sci 7(9):405-410.
52. Morgan J.M., 1992. Adaptation to water deficits in three grain legume species. Mechanisms of turgor maintenance. Field Crops Research 29, 91–106.
53. Pandolfini T., Gabbrielli R. i Comparini C. (1992). Nickel toxicity and peroxidase activity in seedlings of Triticum aestivum L. Plant Cell Environ. 15, 719-725.
54. Pilon M., Ravet K., Tapken W. (2011). The biogenesis and physiological function of chloroplast superoxide dismutases. BBA-Bioenergetics 1807: 989-998
55. Ričko N. (2009).Utjecaj cinka na kadmijem uzrokovane promjene u rastu i aktivnosti antioksidacijskih enzima u vodenoj leći. Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb.
56. Rivera, D., Inocencio, C., Obon, C., and Alcaraz, F. (2003). Review of food and medicinal uses of Capparis L. subgenus Capparis (Capparidaceae). Econ. Bot. 57, 515–534. doi: 10.1663/0013-0001(2003)057[0515:ROFAMU]2.0.CO;2
57. Rostami L., Sadeghi H. and Hosseini S. (2016). Response of caper plant to drought and different ratios of calcium and sodium chloride. Planta Daninha, 34, 259–266.
58. Sadeghi H. & Rostami L., (2017). Changes in biochemical characteristics and Na and K content of caper (Capparis spinosa L.) seedlings under water and salt stress. Journal of Agriculture and Rural Development in the Tropics and Subtropics, pp. 199-206.
59. Sadeghi H. and Rostami L. (2017). Changes in biochemical characteristics and Na and K content of caper (Capparis spinosa L.) seedlings under water and salt stress. Department of Natural Resources and Environmental Engineering, College of Agriculture, Shiraz University, 71441-65186, Shiraz, Iran

60. Saed-Moocheshi A., Shekoofa A., Sadeghi H. & Pessarakli M. (2014c). Drought and Salt Stress Mitigation by Seed Priming with KNO3 and Urea in Various Maize Hybrids: An Experimental Approach Based onEnhancing Antioxidant Responses. Journal of Plant Nutrition, 37, 674–689.
61. Shahrajabian M.H., Sun W., Cheng Q. (2021). plant of the Millennium, Caper (Capparis spinosa L.), chemical composition and medicinal uses. Bulletin of the National Research Center.
62. Sharma P., Jha A. B., Dubey R. S. & Pessarakli M., (2012). Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions. Journal of Botany, April.
63. Sher H., and Alyemeni M. (2010). Ethnobotanical and pharmaceutical evaluation of Capparis spinosa L, validity of local folk and Unani system of medicine. J. Med. Plants Res. 4, 1751–1756.
64. Sofo A., Scopa A., Nuzzaci M. & Vitti A., (2015). Ascorbate Peroxidase and Catalase Activities and Their Genetic Regulation in Plants Subjected to Drought and Salinity Stresses. International journal of mulecular sciences, lipanj, Issue 16(6), pp. 13561-13578.
65. Solowey, E. (2010) “Arboreal pastures” in Growing Bread on Trees: The Case for Perennial Agriculture. Miami, FL: Acco, Israel/Biblio Books International.
66. Sozzi G. O. (2001). Caper bush: Botany and Horticulture. Horticultural Reviews, 27, 125–128.
67. Sozzi O. G., and Vicente A. R. (2006). ”Capers and caperberries,” in Handbook of Herbs and Spices, ed K. V. Peter (Boca Raton, FL: Woodhead Publishing Limited; CRC Press), 230–256.
68. Tesoriere L., Butera D., Gentile C., Livera M. A. (2007). Bioactive Components of Caper (Capparis spinosa L.) from Sicily and Antioxidant Effects in a Red Meat Simulated Gastric Digestion. J. Agric. Food Chem. 2007, 55, 8465–8471 8465
69. Turkan I. & Demiral T., (2009). Recent developments in understanding salinity tolerance. Environ Exp Bot , studeni, pp. 2-9.
70. Vanderauwera S., Vandenbroucke K., Inzé A., van de Cotte B., Mühlenbock P., de Rycke R., Naouar N., van Gaever T., van Montagu M.C., van Breusegem, F. (2012). AtWRKY15 perturbation abolishes the mitochondrial stress response that steers osmotic stress tolerance in Arabidopsis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2012, 109, 20113–20118.
71. Wang W, Vinocur B, Altman A (2003). Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures towards genetic engineering for stress tolerance. Planta 218: 1-14
72. Xu Z, Zhou G (2008). Responses of leaf stomatal density to water status and its relationship with photosynthesis in a grass. J Exp Bot. 2008; 59(12): 3317–25.
73. Xu Z., Zhou G., Shimizu H. (2009). Are plant growth and photosynthesis limited by pre-drought following rewatering in grass? Journal of Experimental Botany, Vol. 60, No. 13, pp. 3737–3749, 2009. doi:10.1093/jxb/erp216 Advance Access publication 13 July, 2009.

74. Yamasaki S, Dillenburg LR. (1999). Measurements of leaf relative water content in Araucaria angustifolia. Rev Bras Fisiol Veg 11(2):69-75.
75. Žutić I. (2010). Osnove uzgoja aromatičnog i ljekovitog bilja. Interna skripta, Agronomski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.

Slike:

1. Slika 2.1.1. Rasprostranjenost vrste Capparis spinosa L. u svijetu. https://peerj.com/articles/5792/ -> pristupljeno 13.01.2022.
2. Slika 2.1.3. List, cvijet i cvijetni pup kapara. https://hr.besthomemaster.com/9334814- -> pristupljeno 15.01.2022.
3. Slika 2.2.1. Svjetska karta rizika od suše (2019.) godina. https://cdn.statcdn.com/Infographic/images/normal/25101.jpeg -> pristupljno 22.01.2022.
4. Slika 2.3.1. Shema reakcije biljaka u uvjetima stres suše. https://www.researchgate.net/figure/Adverse-effects-and-adaptations-of-plants-to-drought-stress-modified-from-Ullah-et-al_fig1_348848896 -> pristupljeno 25.01.2022.

Životopis

Dario Srebačić rođen je 10. kolovoza 1997. godine u Zagrebu. Od 2012. do 2016. pohađao je Srednju školu u Bedekovčini, smjer Poljoprivredni tehničar – opći smjer. Tijekom srednjoškolskog obrazovanja u razdoblju od 18.10. do 01.11.2015. godine boravi na stručnoj praksi u Portugalu u tvrtki Florineve u sklopu projekta EPD (European Projects Development Unip. Lda) gdje stječe vještine u procesima uzgoja raznih vrsta cvijeća. Svoje akademsko obrazovanje započinje 2016. godine na Agronomskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu na preddiplomskom studiju Biljne znanosti. Tri godine kasnije stječe titulu svučilišnog prvostupnika inženjera agronomije (univ. bacc. ing. agr.). Nakon završetka preddiplomskog studija, 2019. godine upisuje diplomski studij Biljne znanosti na Agronomskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Stručnu praksu odrađuje u Bc Institutu za oplemenjivanje i proizvodnju bilja d.d. gdje stječe potrebne vještine vezane uz oplemenjivanje bilja.