

Sveučilište J. J. Strossmayera u Osijeku

Odjel za biologiju

Preddiplomski sveučilišni studij Biologija

Anita Ament

**Utjecaj vodnog stresa primjenom polietilen glikola na biljke u
fazi klijanja i ranoj fazi rasta klijanaca**

Završni rad

Osijek, 2018.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA
Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Odjel za biologiju
Preddiplomski sveučilišni studij Biologija
Znanstveno područje: Prirodne znanosti
Znanstveno polje: Biologija

Završni rad

**UTJECAJ VODNOG STRESA PRIMJENOM POLIETILEN GLIKOLA NA BILJKE U FAZI
KLIJANJA I RANOJ FAZI RASTA KLIJANACA**

Anita Ament

Rad je izrađen u: Laboratoriju za ekofiziologiju biljaka Odjela za biologiju, Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Mentor: Dr. sc. Vesna Peršić, doc.

Komentor: Dr. sc. Martina Varga

Kratak sažetak:

Vodni deficit je važan okolišni čimbenik koji utječe na klijavost, rast i razvoja biljaka te produktivnost poljoprivrednih kultura diljem svijeta. Cilj ovog istraživanja bio je razumjeti fiziološke i biokemijske mehanizme prilagodbe ozime pšenice sušnom stresu tijekom klijanja i ranog rasta klijanaca. Različite razine suše inducirane su korištenjem otopina polietilen glikola (PEG 6000) kojima su sjemenke tretirane tijekom šest dana. Za određivanje ukupne klijavosti i energije klijanja mjereni su postotak klijavosti, prosječno vrijeme klijanja, indeks stope klijavosti. Za utvrđivanje utjecaja suše na rast klijanaca mjerene su svježa masa klijanaca, duljina izdanka i korijena, sadržaj proteina i koncentracija slobodnog prolina kao i lipidna peroksidacija (udio malondialdehida) u korijenu i izdanku klijanaca, te koncentracija fotosintetskih pigmenata u izdanku. Rezultati ukazuju da deficit vode smanjuje parametre klijavosti i energiju klijanja u obje sorte. U uvjetima suše inducirane PEG-om dolazi do izraženijih fizioloških promjena u tkivu sorte El Nino u odnosu na sortu Felix. Povećanjem intenziteta suše inducirane PEG-om, El Nino akumulira dva puta više prolina u odnosu na sortu Felix. Dolazi do aktivacije mehanizama obrane od suše inducirane PEG-om, međutim ti mehanizmi nisu dovoljni da bi spriječili oštećenje membrana. Sorta Felix je pokazala veći potencijal tolerancije na sušu uzrokovanu PEG-om u fazi klijanja i ranog rasta klijanaca.

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: suša, PEG 6000, klijanci pšenice, klijavost, prolin

Rad je pohranjen: na mrežnim stranicama Odjela za biologiju te u Nacionalnom repozitoriju završnih i diplomskih radova Nacionalne i sveučilišne knjižnice u Zagrebu.

BASIC DOCUMENTATION CARD
Josip Juraj Strossmayer University of Osijek
Department of Biology
Undergraduate university study programme in Biology
Scientific area: Natural sciences
Scientific field: Biology

Bachelor Thesis

**THE EFFECT OF POLYETHYLENE GLYCOL INDUCED WATER STRESS ON GERMINATION
AND EARLY SEEDLING GROWTH**

Anita Ament

Thesis performed at: Laboratory of Plant Ecophysiology, Department of Biology, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek

Supervisor: Vesna Peršić, PhD, Asst. Prof.

Cosupervisor: Martina Varga, PhD

Short abstract:

Soil water potential is an important environmental factor influencing germination, growth and development of plants as well as productivity of crop plants worldwide. The main purpose of this study was to understand the physiological and biochemical adaptation mechanisms of winter wheat through germination stage and early seedling growth. Different levels of drought were induced by polyethylene glycol solution (PEG 6000) in which seeds were germinated and grown for six days. The final germination percentage, mean germination time and germination rate index were measured in order to determine total germination and germination energy. To determine the effect of drought on the seedlings growth fresh weight of seedlings, and shoot and root length were measured as well as lipid peroxidation (as malondialdehyde content) and osmotic substances (soluble proteins and free proline) in both shoots and roots of seedlings and photosynthetic pigments content in the shoots. The results indicated that reduced water potential decreased germination indicators and seedling vigour in both cultivars. When exposed to PEG-induced drought more intense physiological changes were determined in the El Nino plants in comparison to Felix. The defence mechanisms against negative effects of PEG-induced drought were activated. Nevertheless these mechanisms were insufficient to prevent membrane damage in the seedlings. The cultivar Felix showed better potential for PEG-induced drought tolerance in the germination stage and early growth stage.

Original in: Croatian

Keywords: drought, PEG 6000, wheat seedlings, germination indices, proline content

Thesis deposited: on the web site of the Department of Biology and in Croatian Digital Theses Repository of the National and University Library.

Sadržaj:

1. Uvod	1
2. Materijal i metode.....	5
2.1. Biljni materijal	5
2.2. Suša inducirana PEG-om	5
2.3. Mjerene varijable	6
2.3.1. Klijanja i rani rast.....	6
2.3.2. Fiziološke promjene	7
2.4. Statistička obrada podataka.....	8
3. Rezultati.....	10
3.1. Utjecaj suše inducirane PEG-om na klijavost ozime pšenice	10
3.1.1. Postotak klijavosti	10
3.1.2. Indeks stope klijavosti	11
3.1.3. Prosječno vrijeme klijanja	12
3.1.4. Ostali morfološki parametri	13
3.2. Utjecaj suše inducirane PEG-om na rani rast klijanaca ozime pšenice	13
3.2.1. Svježa masa i duljina izdanka i korijena	13
3.3. Fiziološki odgovor klijanaca ozime pšenice na PEG-om induciranu sušu.....	15
3.3.1. Razina proteina	15
3.3.2. Sadržaj slobodnog prolina	16
3.3.3. Razina lipidne peroksidacije	17
3.3.4. Razina koncentracije fotosintetskih pigmenata	18
4. Rasprava	20
5. Zaključak.....	24
6. Literatura.....	25

1. Uvod

Biljke su, kao i sva živa bića, svakodnevno izložene mnogobrojnim stresorima. Također, razne antropogene aktivnosti naglašavaju postojeće čimbenike stresa. Stresore dijelimo na biotičke i abiotičke. Biotički su stresori živi organizmi (kukci, kralježnjaci, biljke, bakterije, itd.) koji u određenoj mjeri mogu imati negativan utjecaj na biljke. U abiotičke stresore ubrajamo ekstremne temperature, vjetar i sunčevo zračenje koji se smatraju fizičkim elementima, te pesticide i različite toksine koje smatramo kemijskim elementima. Svi navedeni faktori predstavljaju prijetnju biljkama i sprječavaju ih da postignu svoj puni genetički potencijal (Mahajan i Tuteja 2005). U poljoprivrednoj proizvodnji promjenljivi okolišni uvjeti dovode do smanjenja prinosa, a očekuje se i da će uslijed klimatskih promjena doći do povećanja intenziteta i frekvencije ekstremnih okolišnih uvjeta (Khaled i sur. 2015).

Voda je glavni limitirajući faktor za poljoprivrednu proizvodnju. Vodni stres, općenito, može nastati kao posljedica suviška ili nedostatka vode. Kao primjer suviška vode može se uzeti poplava. Prilikom poplave smanjena je opskrba korijena kisikom što rezultira ograničenim unosom hranjivih tvari i ograničenom respiracijom te, naposljetku, smanjenim prinosom (Loreti i sur. 2016). S druge strane, češći problem predstavlja nedostatak vode, odnosno suša (Mahajan i Tuteja 2005). Smanjena dostupnost vode može se kvantificirati kao smanjenje vodnog potencijala okoline (Mohammadkhani i Heidari 2008). Deficit vode dovodi do narušavanja karakteristične strukture dvoslojne lipidne membrane koja postaje izuzetno porozna. Također, dolazi do pomicanja membranskih proteina i membrana gubi svoj integritet i selektivnost te aktivnost enzima (Jaleel i sur. 2009). Sve navedeno rezultira narušenom vodnom ravnotežom, smanjenjem vodnog potencijala unutar stanica, gubitka turgora te smanjenog rasta biljke (Mahajan i Tuteja 2005). Osim toga, izraženiji pad sadržaja vode u stanicama može dovesti do smanjenja stope fotosinteze, poremećaja metabolizma biljke te, naposljetku, uvenuća biljke (Jaleel i sur. 2009). Suša, kao i ostali abiotički stresori, utječe na akumulaciju reaktivnih kisikovih jedinki (engl. *reactive oxygen species*, ROS) u biljnim tkivima. Kao posljedica toga javlja se peroksidacija lipida, oksidacija aminokiselina i proteina, oštećenje genetičkog materijala i, naposljetku, stanična smrt (Gill i Tuteja 2010).

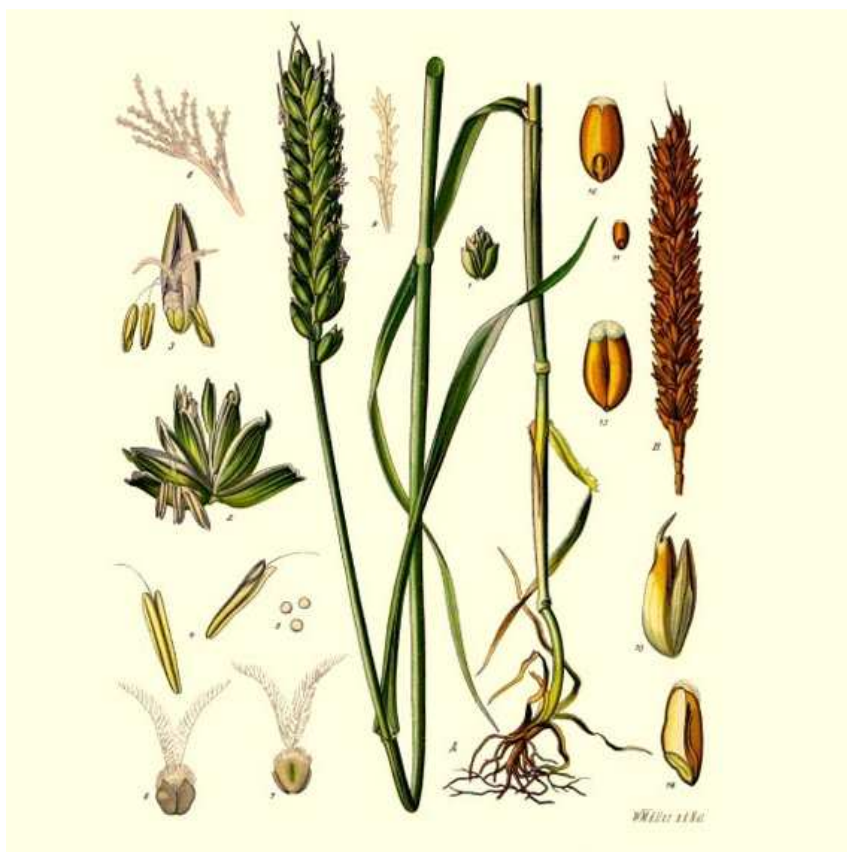
Smatra se da je suša okolišni stres koji u najvećoj mjeri ograničava globalnu poljoprivrednu proizvodnju (Srivastava i sur. 2016). S toga je jedan od glavnih ciljeva oplemenjivačkih programa diljem svijeta povećanje tolerancije poljoprivrednih kultura na sušu. Otpornost na sušu je kompleksno svojstvo pod utjecajem brojnih gena koje obuhvaća nekoliko slojeva i

komponenti odgovora na stres koji ovise o tipu, intenzitetu i trajanju vodnog deficita (Hellal i sur. 2018). Bolje razumijevanje mehanizama koji omogućavaju prilagodbu na deficit vode i održavanje rasta, razvoja i produktivnosti tijekom razdoblja stresa mogu pomoći u razvoju različitih genotipova poljoprivrednih kultura koje su otporne na sušu (Zhang i Kirkham 1994).

U razvojnom ciklusu biljaka pokazalo se da su na sušu najosjetljivije faza klijanja i faza ranog rasta klijanaca. Suša smanjuje postotak klijavosti sjemena te duljinu korjenčića i izdanka (Duman 2006). Klijanje sjemena, vigor sjemena i duljina koleoptile preduvjeti su za dobar rast i prinos poljoprivrednih kultura te se sve više prate u programima selekcije sorti s boljom tolerancijom na stresne čimbenike (Baloch i sur. 2012). Tijekom takvih istraživanja gotovo je nemoguće dizajnirati eksperiment s uvjetima smanjene dostupnosti vode bez utjecaja na ostale uvjete uzgoja (na primjer koncentraciju hranjivih tvari). Upotreba različitih osmotskih spojeva za pripremu i održavanje sušnih uvjeta smatra se jednim od najboljih načina za istraživanje utjecaja sušnog stresa na klijavost sjemena. Ovi spojevi, u koje se ubrajaju manitol, polietilen glikol, saharoza i sorbitol, nemaju štetan ili toksičan učinak na biljku, ali inhibiraju rast biljaka tako što smanjuju vodni potencijal okoline, slično sušenju tla, čime onemogućavaju biljkama primanje vode (Ibrahim i sur. 2001). Polietilen glikol (PEG) smatra se najboljim osmotskim agentom za izazivanje suše i često se koristi u istraživanjima. To je ne-ionski u vodi topljiv polimer velike molekulske mase za koji se očekuje da nema mogućnost ulaska u stanice (Djibtil i sur. 2005).

Pšenica (*Triticum aestivum* L.) je jedan od najznačajnijih poljoprivrednih usjeva koji zauzima oko 32% ukupne površine pod žitaricama i s godišnjom proizvodnjom od 676 milijuna tona predstavlja glavnu namirnicu za oko 35% globalne populacije (FAO 2011). Pšenicu odlikuje velik broj varijeteta i kultivara te zbog toga posjeduje širok areal rasprostranjenosti. Pšenicu je prvi put opisao Linneaus 1753. godine. Pripada redu *Poales*, porodici trava *Poaceae*, potporodici *Pooidae* (klasaste trave) te rodu *Triticum*. Jednogodišnja je zeljasta biljka cilindrične, člankovite i šuplje stabljike koja se sastoji od nodija i internodija, odnosno koljenaca te pet do šest članaka. Visina stabljike iznosi 50-120 cm, a u današnje vrijeme prednost se daje nižim sortama pšenice jer su otpornije na polijeganje. Listovi su cjeloviti, linearni, izmjeničnog rasporeda te posjeduju paralelne žile bez peteljke. Svaki list ima razvijen rukavac koji obuhvaća stabljiku, a jezičac, odnosno ligula razvija se na prijelazu iz rukavca u plojku lista. Između plojke i rukavca nalaze se još i uške. Različite sorte pšenice razlikujemo upravo prema veličini, obliku i boji jezičca i uški.

Na vršni članak stabljike nastavlja se klas, odnosno cvjetovi koji su skupljeni u cvat. Klas se sastoji od centralne osi, odnosno rahisa s čije se dvije suprotne strane pružaju klasići s dvospolnim cvjetovima. Klasić se sastoji od vretenca, dvije plijeve i cvjetova koji su pak sastavljeni od dvije pljevice, dvije pljevčice te prašnika i tučka. Plod je pšeno na kojem je jasno izražena centralna brazda te se stoga lako razlikuju trbušna, leđna i bočna strana. Korijen je žiličast te ozima pšenica najčešće klija s tri primarna korjenčića nakon kojih se razvija busenasto korijenje. Morfološke karakteristike prikazane su na Slici 1. Pšenica se može podijeliti na ozime i jare forme. Za cjeloviti vegetacijski ciklus ozime pšenice potrebne su niske temperature, od 0 do 10 °C, tijekom 30-ak dana te se stoga sije u jesen. U suprotnom, ne dolazi do razvoja i formacije stabljike sa klasom i plodom. Daje veći prinos od jare pšenice i zauzima veće zasađene površine u svijetu. S druge strane, jara pšenica sije se u proljeće i nema zahtjeva za niskim temperaturama. Prednost jare pšenice očituje se u većoj otpornosti na visoke temperature i sušu, te daje kvalitetnije zrno i brašno. U Hrvatskoj ozima pšenica zauzima glavninu zasađenih površina.



Slika 1. Ilustracija pšenice, *Triticum aestivum* L. (Web 1.)

Ciljevi ovog istraživanja bili su razumjeti fiziološke i biokemijske mehanizme prilagodbe ozime pšenice sušnom stresu tijekom klijanja i ranog rasta klijanaca utvrđivanjem energije klijanja i ukupne klijavosti sjemenki. Energijom klijanja testirali smo kojom se brzinom mlade biljke mogu osamostaliti i oduprijeti negativnim čimbenicima u početnom porastu. Manji broj dana označava veću energiju klijavosti što predstavlja prednost. Osim toga, u svrhu razumijevanja fizioloških i biokemijskih mehanizama prilagodbe ozime pšenice u fazi klijanja i ranog rasta klijanaca u korijenu i izdanku biljaka, izmjereni su koncentracija ukupnih proteina, sadržaj slobodnog prolina i sadržaj malondialdehida.

2. Materijal i metode

2.1. Biljni materijal

U eksperimentalnom radu korišteno je sjeme dvije sorte ozime pšenice (*Triticum aestivum* L.): „El Nino“ i „Felix“. Sjeme je dobiveno 2018. godine od Poljoprivrednog instituta u Osijeku kao komercijalni usjev. Sorta Felix rana je sorta, prosječne visine stabljike 75 cm, genetskog potencijala rodnosti većeg od 11 t/ha što znači da je visokorodna sorta dobre kakvoće. Osim toga, tolerantna je na rasprostranjene bolesti ozime pšenice, polijeganje, niske temperature i umjerenu sušu. Sorta El Nino novija je sorta ozime pšenice, a priznata je 2016. godine te upisana u Sortnu listu Republike Hrvatske. Rezultati ispitivanja usporedbom sa standardnim sortama Žitarka, Srpanjka i Divana potvrdili su da je sorta različita, ujednačena i postojana (Drezner i sur. 2016). Međutim, u ovom istraživanju nije bilo dodatnih podataka o njezinim svojstvima.

2.2. Suša inducirana PEG-om

Da bi procijenili utjecaj suše tijekom klijanja i ranog rasta klijanaca, polietilen glikol (PEG 6000) otopljen je u 10% hranjivoj otopini prema Hoaglandu (Hoagland i Arnon 1950) u odgovarajućim količinama kako bi simulirale različite razine suše.

Sav pribor i posuđe potrebno za pripremu i provođenje eksperimenta sterilizirano je suhom sterilizacijom pri 150 °C u trajanju od 3h. Prije početka eksperimenta odabrane su neoštećene sjemenke podjednake morfoloških karakteristika te je provedena površinska dezinfekcija potapanjem sjemenki u 2% otopinu natrijevog hipoklorita (NaClO) tijekom 10 minuta, nakon čega su sjemenke isprane nekoliko puta sterilnom destiliranom vodom. Ovaj postupak proveden je identično za obje korištene sorte. Nakon sterilizacije, sjemenke su stavljene u sterilnu posudu s vodom tijekom 4h u mraku da se pokrene postupak usvajanja vode (imbibicija). Zatim su sjemenke prebačene u Petrijeve zdjelice s dva sloja filter papira. U svaku Petrijevu zdjelicu prebačeno je po 25 sjemenki tako da je međusobna udaljenost sjemenki bila podjednaka. U Petrijeve zdjelice dodano je po 10 ml otopina PEG-a (5, 10, 15, 20, 25 i 30%) u 10% hranjivoj otopini. Kao kontrola (0% PEG) koristila se 10% hranjiva otopina po Hoaglandu.

Ispitivanje utjecaja različitih razina suše inducirane PEG-om na klijavost pšenice i rani rast klijanaca trajalo je šest dana te je provedeno na 100 sjemenki po određenom tretmanu (četiri ponavljanja po 25 sjemenki svake sorte). Nakon pripreme svi tretmani i replike postavljeni

su nasumično u uzgojnu komoru. Tijekom prvih 72h eksperimenta u komori je bio mrak uz temperaturu 22 °C. Slijedećih 72h biljke su uzgajane u uvjetima 12h fotoperioda uz intenzitet svjetlosti 80 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ te 25/22 °C dnevno/noćnu temperaturu. Svaki dan tijekom eksperimenta zamijenjena je otopina u Petrijevim zdjelicama u svrhu onemogućavanja promjene u koncentracijama otopina te zagađenja u slučaju razvoja plijesni. Također, svaki su dan izbrojane proklijale sjemenke. Proklijala sjemenka definirana je kao sjemenka kojoj je korijen narastao 0,3 cm u dužinu.

2.3. Mjerene varijable

2.3.1. Klijanja i rani rast

Ukupna klijavost (engl. *final germination percentage*, FGP) u postocima izračunata je (za svako ponavljanje) prema formuli: $FGP = \frac{\text{broj iskljalih sjemenki}}{\text{ukupan broj sjemenki}} \times 100$, a obuhvaća samo konačni postotak iskljalih sjemenki i ne daje podatke o brzini i jednoličnosti klijanja.

Prosječno vrijeme klijanja (engl. *mean germination time*, MGT) izračunato je prema formuli:

$MGT = \frac{\sum (D \times n)}{\sum n}$; gdje je: n broj sjemenki iskljalo na dan D; D broj dana od početka klijanja.

Prosječno vrijeme klijanja predstavlja precizniju mjerenu varijablu, odnosno uzima u obzir broj dana u kojemu je većina sjemenki iskljala za iskazivanje razlike između sorti i pojedinih tretmana.

Indeks stope klijavosti (engl. *germination rate index*, GRI) izračunat je prema formuli:

$GRI = \sum \frac{GD}{D}$; gdje je G postotak klijavosti pomnožen sa 100, a D broj dana od početka klijanja i pokazuje postotak klijavosti po danu. Veći postotak klijavosti i kraće trajanje klijanja u danima rezultira većim indeksom stope klijavosti.

Koeficijent brzine klijavosti (engl. *coefficient of velocity of germination*, CVG) izračunat je prema formuli: $CVG = \frac{\sum n}{100} + \sum nD$; gdje je n broj sjemenki iskljalo na određeni dan, a D broj dana od početka klijanja. Koeficijent brzine klijavosti ne stavlja naglasak na ukupni postotak klijavosti, nego se bazira na vremenu potrebnom za njegovo postizanje.

Vrijeme proteklo između prve zabilježene iskljale sjemenke (engl. *first day of germination*, FDG) i zadnje iskljale sjemenke (engl. *last day of germination*, LDG) u tretmanu označava se kao TSG (engl. *time spread of germination*) $TSG = LDG - FDG$.

Indeks klijavosti (engl. *germination indeks*, GI) izračunat je prema formuli: $GI = (6 \times n_1) + (5 \times n_2) + \dots + (1 \times n_6)$; gdje je n broj sjemenki iskljalih prvi, drugi i posljednji (6.) dan eksperimenta, pri čemu je najveća težina stavljena na prvi dan kada su zabilježene iskljale sjemenke, a najmanja na zadnji dan kada su zabilježene nove iskljale sjemenke (1. dan=6, 2. dan=5 itd.). Smatra se da je indeks klijavosti najcjelovitiji parametar koji obuhvaća postotak klijavosti kao i vrijeme potrebno za klijanje. Također, povećava razlike između pojedinih tretmana (Kader 2005).

Nakon sedam dana inkubacije utvrđena je dužina korijena (cm), dužina izdanka (cm) i svježa masa klijanaca (mg).

2.3.2. Fiziološke promjene

Koncentracija proteina u biljnom tkivu određena je metodom prema Bradfordu (1976). Tkivo korijena i izdanka pšenice usitnjeno je do finog praha u tekućem dušiku. Približno 200 mg usitnjenog tkiva ekstrahirano je tijekom 15 minuta na ledu u 1 ml 100 mM hladnog kalij fosfatnog pufera pH 7 uz dodatak 0,1 mM EDTA i 1% polivinil piroolidona (PVP), te potom centrifugirano 10 minuta pri 20 000 g i temperaturi od 4 °C. Supernatant je odvojen u čistu kivetu, a preostali talog reekstrahiran dodatkom 1 ml istog pufera. Koncentracija proteina kvantitativno je određena na temelju linearne ovisnosti apsorbancije o sadržaju proteina. Otopljeni proteini reagiraju s bojom Coomassie briljant plavo G-250 (engl. *Comassie Brilliant Blue*, CBB) pri čemu dolazi do vezanja anionske boje za NH₃ skupine proteina, što je praćeno promjenom boje reagensa (iz smeđe u plavu) i pojavom apsorpcijskog maksimuma kod 595 nm. Nepoznate koncentracije proteina u uzorcima sirovog ekstrakta očitavane su iz kalibracijskog pravca načinjenog nizom razrjeđenja otopine albumina govedeg seruma (engl. *bovine serum albumine*, BSA) i izražene kao mg proteina/g svježe tvari biljnog tkiva.

Koncentracija fotosintetskih pigmenata određena je spektrofotometrijski u izdanku obje korištene sorte. Biljno tkivo je usitnjeno do finog praha u tekućem dušiku. Oko 100 mg usitnjenog biljnog tkiva prebaćeno je u plastičnu kivetu te je dodano 5 ml 80% acetona. Ekstrakcija pigmenata trajala je 24h u mraku pri 4 °C. Nakon ekstrakcije uzorci su centrifugirani 15 minuta pri 18 000 g i temperaturi 4 °C. Razrjeđenje supernatanta napravljeno je dodatkom 2 ml 80% acetona, te je korišteno za mjerenje apsorbancije pri valnim duljinama od 470, 644,8 i 661,6 nm. Koncentracije fotosintetskih pigmenata izračunate su prema Lichtenthaleru (1987) i izražene su u mg/g svježe tvari.

Sadržaj slobodnog prolina u biljnom tkivu određen je spektrofotometrijski, metodom prema Bates i sur. (1973), uz određene prilagodbe. Otprilike 100 g maceriranog tkiva ekstrahirano je s 1 ml 3% (w/v) sulfosalicilne kiseline (5 μ L sulfosalicilne kiseline po mg svježe tvari). Uzorci su konstantno držani na ledu te su centrifugirani 5 minuta na sobnoj temperaturi i maksimalnoj brzini. U ranije pripremljenu reakcijsku smjesu koja se sastoji od 100 μ L 3% sulfosalicilne kiseline, 200 μ L ledene octene kiseline i 200 μ L ninhidrina, dodano je 100 μ L supernatanta biljnog ekstrakta. Uzorci su miješani na vrtložnoj miješalici do potpune homogenizacije smjese te zatim prebačeni u vodenu kupelj na 96 °C. Nakon 60 minuta u vodenoj kupelji reakcija se zaustavlja premještanjem uzoraka na led. Nastali obojani prolin-ninhidrin kompleksa ekstrahiran je dodatkom 1 mL toluena te je svaki uzorak dobro promiješan na vrtložnoj miješalici 20 sekundi. Nakon nekoliko minuta odvaja se vodeni i toulenski sloj, pri čemu se obojani prolin-ninhidrin kompleks nalazi u gornjem toulenskom sloju. Toulenski sloj s prolinom prebačen je u kivetu od kvarcnog stakla i spektrofotometrijski je izmjerena apsorbanacija pri valnoj duljini od 520 nm. Kao slijepa proba korišten je čisti toluen. Koncentracija prolina ekstrahiranog iz tkiva izračunata je iz standardne krivulje pripremljene s poznatim koncentracijama L-prolina (1 do 20 μ g/ml), na isti način kao uzorak. Sadržaj prolina u tkivu izražen kao μ mol/g svježe tvari.

Količina malondialdehida (MDA) određena je spektrofotometrijski metodom prema Verma i Dubey (2003). Otprilike 100 mg usitnjenog biljnog tkiva ekstrahirano je s 1 ml 0,1% trikloroocetnom kiselinom (TCA) tijekom 15 minuta nakon čega je slijedilo centrifugiranje u trajanju od 5 minuta na 6000 g pri 4 °C. U 500 μ L supernatanta dodano je 1 mL 0,5% tiobarbiturine kiseline (TBA) u 10% TCA. Tako pripremljena smjesa zatim je zagrijavana 30 minuta u vodenoj kupelji na 95 °C pri čemu dolazi do raspada lipidnih peroksida te nastaju produkti koji reagiraju s TBA. Reakcija se zaustavlja naglim hlađenjem na ledu. Prije mjerenja potrebno je centrifugirati uzorak na 18 000 g pri 4 °C u trajanju od 15 minuta. Za mjerenje apsorbanacije pri valnim duljinama od 532 i 600 nm korišten je supernatant. Kao slijepa proba korištena je otopina 0,5% TBA u 10% TCA. Koncentracija produkata lipidne peroksidacije izražena je kao MDA u jedinicama μ g/g svježe tvari, uz upotrebu ekstinkcijskog koeficijenta $\epsilon_{532}=155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

2.4. Statistička obrada podataka

Statističke analize napravljene su u statističkom programu Statistica 13.3 (© 1984-2017 TIBCO Software Inc). Za usporedbu srednjih vrijednosti (i medijana) dvije ili više skupina uzoraka korišteni su parametrijski i neparametrijski testovi. S obzirom da se radi o malom

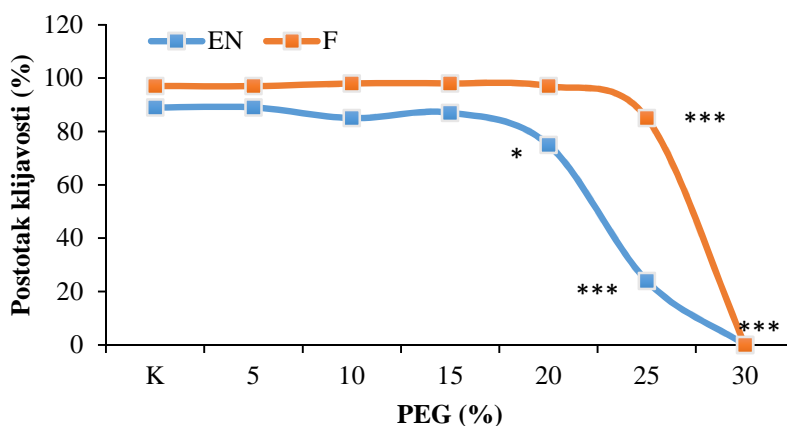
broju podataka čija distribucija značajno odstupa od normalne za usporedbu sorti korištena je neparametrijska statistika. Također, za usporedbu sorti prema vrijednostima svježe mase izdanka i korijena korišten je Mann-Whitney U test, dok je za usporedbu između tretmana korištena Kruskal-Wallis analiza varijance. S obzirom na mali broj podataka, za potrebe definiranja razlike između dvije sorte prema sadržaju prolina, proteina i malondialdehida također je korišten Mann-Whitney U test, odnosno za usporedbu tretmana Kruskal-Wallis ANOVA, za oba testa uzevši u obzir i korijen i izdanak zajedno. Rezultati klijavosti obrađeni su Shapiro-Wilks testom te je utvrđeno da podatci ne slijede Gaussovu raspodjelu. Naime, Gaussova se raspodjela širi u beskonačnost u oba smjera te tako uključuje i beskonačno negativne kao i beskonačno pozitivne brojeve, a biološki podaci su često po svojoj prirodi ograničeni u stupnjevanju (Marusteri i Bacarea 2010). No, podatci slijede zvonoliku raspodjelu koja sličí Gaussovoj raspodjeli, a broj uzoraka po sorti iznosi cca. 200, stoga je nakon transformacije podataka napravljena jednosmjerna ANOVA, a za usporedbu između kontrole i tretmana polietilen glikolom kao *post hoc* test korišten je Dunnett-ov test. Za kontrolu utjecaja vremena klijanja na parametre klijavosti korištena je dvosmjerna analiza kovarijance (two way ANCOVA).

3. Rezultati

3.1. Utjecaj suše inducirane PEG-om na klijavost ozime pšenice

3.1.1. Postotak klijavosti

U kontrolnim uzorcima klijavost sorte Felix iznosila je 97%, a sorte El Nino 89%. Slika 2 prikazuje utjecaj različitih koncentracija PEG-6000 na klijavost sjemenki dviju sorti. Kod obje sorte ne dolazi do značajnijih promjena klijavosti u prisutnosti nižih koncentracija otopine PEG-a (5%, 10%, 15%). U slučaju sorte El Nino, do prvih značajnijih promjena u postotku klijavosti dolazi pri koncentraciji otopine PEG-a od 20% te se taj negativni trend nastavlja (ANCOVA $F_{6,160} = 58,8$, $p < 0,0001$). S druge strane, pri 20% koncentraciji, sorta Felix još ne pokazuje značajne promjene u odnosu na kontrolu, no te su promjene zabilježene pri sljedećoj koncentraciji od 25% (ANCOVA $F_{6,160} = 54,4$, $p < 0,0001$). Pri koncentraciji otopine PEG-a od 30% nisu zabilježene proklijale sjemenke ni u jednoj sorti. Faktorijalna ANOVA je pokazala da se dvije istraživane sorte ozime pšenice statistički značajno razlikuju prema klijavosti sjemena ($F_{30,252} = 15,02$, $p < 0,0001$), a rezultati usporedbe sorti po danima klijanja dani su u Tablici 1.



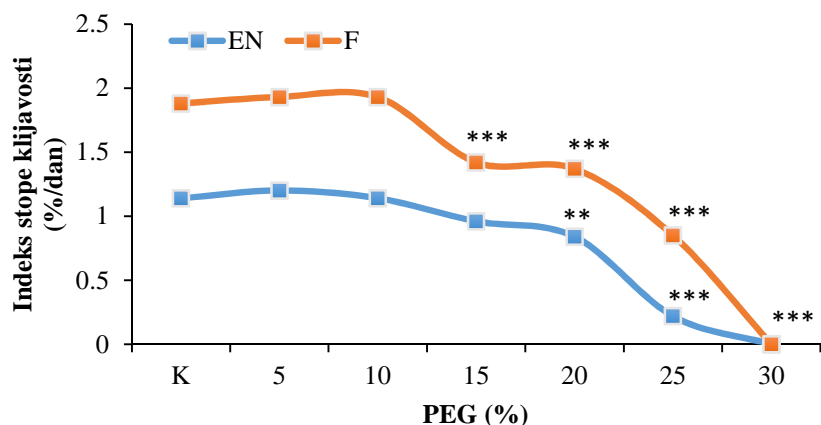
Slika 2. Postotak klijavosti (%) dvije sorte ozime pšenice, El Nino (EN) i Felix (F), pri različitim koncentracijama (%) polietilen glikola (PEG-6000). K označava kontrolni tretman s 10% Hoagland hranjivim medijem. * ($p < 0,05$) i *** ($p < 0,0001$) označavaju statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu, a rezultat je analize kovarijance i *post hoc* Dunnett testa.

Tablica 1. Srednja vrijednost broja iskljanih sjemenki svih tretmana (N), 95% confidence interval i rezultati Tukey HSD testa. Različita slova označavaju statistički značajnu razliku između sorte ozime pšenice Felix (F) i El Nino (EN) po pojedinim danima brojanja iskljanih sjemenki uzevši u obzir sve tretmane.

Dani klijanja	1.		2.		3.		4.		5.		6.	
Sorta	F	EN	F	EN	F	EN	F	EN	F	EN	F	EN
N	5,5	0,7	17,2	9,6	20,4	13,7	20,4	15,1	20,4	15,6	20,4	16,0
95 % CI	3,0- 8,1	0,3- 1,2	13,1- 21,1	6,9- 12,3	17- 23,7	10,7- 16,7	17- 23,7	11,9- 18,3	17- 23,7	12,3- 18,9	17- 23,8	12,9- 19,4
Tukey HSD	e	f	d	g	a	c	a	bc	a	b	a	bd

3.1.2. Indeks stope klijavosti

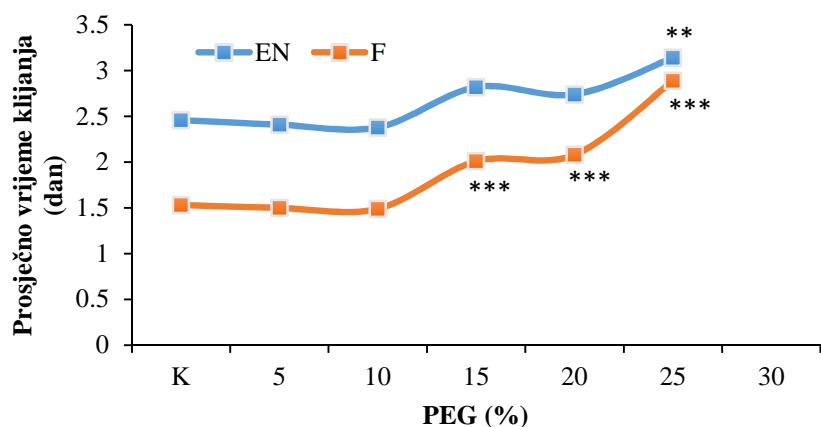
Dinamika klijanja ukazuje na brzinu (energiju) klijanja, a energija klijanja označava „živost“ (vigor) sjemena, tj. što više sjemenki proklija u što kraćem roku, to je potencijal sjemena veći. Više vrijednosti indeksa stope klijavosti sorte Felix ukazuju na brže klijanje sjemenki ove sorte (Slika 3, Tablica 1). Dodatkom 5% i 10% otopine PEG u hranjivi medij sjemenki sorte Felix nije došlo do značajnijeg utjecaja na stopu klijavosti. Značajnije smanjenje stope klijavosti u odnosu na kontrolu utvrđeno je već dodatkom 15% PEG-a, za razliku od sorte El Nino gdje je stopa klijavosti značajno smanjena tek dodatkom 20% PEG-a (Slika 2). Stopa klijavosti sorte El Nino manja je za 38-41% u odnosu na stopu klijavosti sorte Felix i u kontroli i u tretmanima 5-20% PEG-om, dok je u tretmanu 25% otopinom PEG-a stopa klijavosti sorte El Nino još niža, odnosno 75% manja u odnosu na stopu klijavosti sorte Felix.



Slika 3. Indeks stope klijavosti (%/dan) dviju sorti ozime pšenice pri različitim koncentracijama polietilen glikola (%) za sortu Felix (F) i El Nino (EN). K označava kontrolni tretman. ** ($p < 0,01$) i *** ($p < 0,0001$) označavaju statistički značajnu razliku stope klijavosti u pojedinim tretmanima u odnosu na kontrolu kao rezultat *post hoc* Dunnett testa.

3.1.3. Prosječno vrijeme klijanja

Niže vrijednosti prosječnog vremena klijanja ukazuju na brže klijanje sjemenki sorte Felix u kontroli i u većini tretmana (Slika 4).



Slika 4. Prosječno vrijeme klijanja (dan) dviju sorti ozime pšenice, El Nino (EN) i Felix (F), pri različitim koncentracijama polietilen glikola (%).** ($p < 0,01$) i *** ($p < 0,0001$) označavaju statistički značajnu razliku stope klijavosti u pojedinim tretmanima u odnosu na kontrolu kao rezultat *post hoc* Dunnett testa.

U kontroli i tretmanima sa 5% i 10% otopinom PEG-a, prosječno vrijeme klijanja iznosi 1,5 dan za sortu Felix i 2,5 dana za sortu El Nino. Povećanjem koncentracije PEG-a produžuje se prosječno vrijeme klijanja sjemenki kod obje sorte. Statistički značajno povećanje prosječnog vremena klijanja (ANOVA $F_{10,34} = 22,83$, $p < 0,0001$) utvrđeno je kod sorte Felix dodatkom 15%, 20% i 25% otopine PEG-6000 ($p < 0,0001$), dok je za sortu El Nino samo 25% PEG imao značajan utjecaj na povećanje prosječnog vremena klijanja sjemenki ($p = 0,0012$), Slika 4.

3.1.4. Ostali morfološki parametri

Ostali morfološki parametri obuhvaćaju koeficijent brzine klijavosti, indeks klijavosti i vrijeme proteklo od prve do zadnje isklijale sjemenke (Tablica 2). Smanjuju se povećanjem koncentracije otopine PEG-a kod obje sorte. Koeficijent brzine klijavosti i indeks klijavosti sorte Felix u kontrolnom tretmanu veći je za 61%, odnosno 64% u usporedbi sa sortom El Nino. Vrijeme između prve zabilježene isklijale sjemenke i zadnje isklijale sjemenke kod sorte Felix bilo je 2,5 puta kraće nego kod sorte El Nino.

Tablica 2. Koeficijent brzine klijavosti (CVG) , indeks klijavosti (GI) i vrijeme proteklo od prve do zadnje isklijale sjemenke (TSG) iskazan u danima sorte Felix (F) i El Nino (EN).

koncentracija PEG-a/oznaka sorte	CVG		GI		TSG (dan)	
	EN	F	EN	F	EN	F
Kontrola	40,60	65,56	60,00	98,00	4,25	1,75
5%	41,87	67,19	66,00	105,00	4,00	1,25
10%	42,15	67,15	58,00	100,00	4,75	1,25
15%	35,67	49,73	61,00	49,00	3,00	0,25
20%	36,63	48,07	51,00	51,00	2,50	0,75
25%	31,93	34,62	19,00	62,00	0,75	0,50

3.2. Utjecaj suše inducirane PEG-om na rani rast klijanaca ozime pšenice

3.2.1. Svježa masa i duljina izdanka i korijena

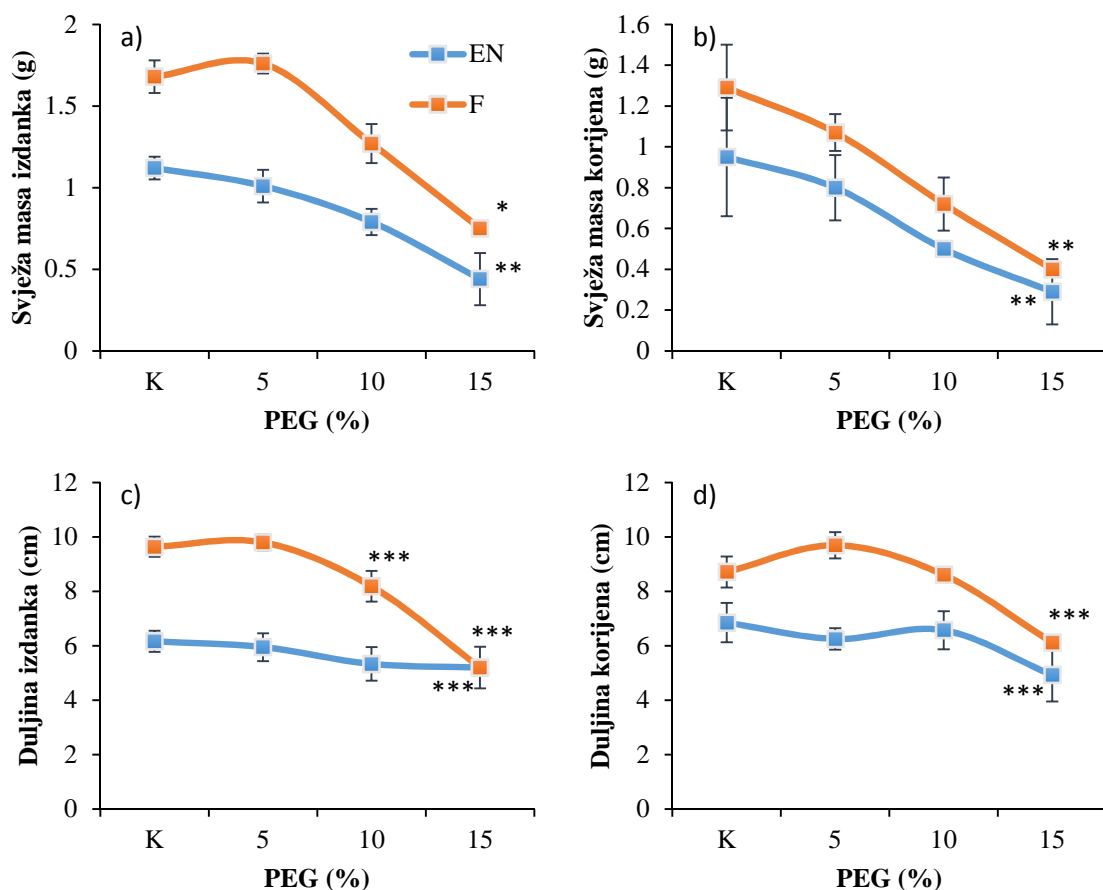
Morfološki parametri klijanja sjemenki također uključuju svježe mase izdanaka i korijena kao i njihovu duljinu (Slika 5). Smanjena dostupnost vode u korijenovom sustavu utjecala

je na razvoj izdanka u uvjetima smanjenja vodnog potencijala hranjive otopine, odnosno, povećanja vodnog deficita dodatkom PEG-6000. Rezultati su pokazali statistički značajno smanjenje (Kruskal-Wallis ANOVA $H_{3,16} = 8,96$, $p = 0,03$) svježe mase biljaka sorte Felix samo u tretmanu 15% PEG-om u odnosu na kontrolu ($p = 0,045$). Slično je utvrđeno i za sortu El Nino (Kruskal-Wallis $H_{3,16} = 11,22$, $p = 0,01$) i samo se svježa masa korijena i izdanka klijanaca koji su rasli u 15% PEG-u značajno razlikovala od kontrole ($p = 0,01$). Svježa masa izdanka sorte Felix bila je 55%, a izdanka sorte El Nino 61% manja u odnosu na kontrolu, dok je masa korijena u obje sorte bila 69% manja u odnosu na kontrolu.

Statističkom analizom je utvrđeno da se dvije sorte Felix i El Nino značajno razlikuju prema vrijednostima svježe mase izdanka (Mann-Whitney U test, $p = 0,024$), ali ne i prema vrijednostima svježe mase korijena (Mann-Whitney U test, $p = 0,32$).

Promatrajući duljinu korijena i izdanka, može se zamijetiti da je korijen sorte Felix smanjen za 31%, a sorte El Nino za 27% u odnosu na kontrolu. Što se tiče duljine izdanka, smanjenje je značajnije te iznosi 47% za sortu Felix i 41% za sortu El Nino. Kod sorte Felix utvrđena je statistički značajna razlika u duljini korijena između tretmana ($F_{3,190} = 45,8$; $p < 0,0001$), pri čemu je statistički značajno manja duljina u odnosu na kontrolu utvrđena samo u tretmanu 15% PEG-om ($p < 0,0001$). Što se tiče izdanka, također je utvrđen značajan utjecaj PEG-a na rast izdanka ($F_{3,190} = 78,4$; $p < 0,0001$), a Dunnett-ovim testom je utvrđeno da postoji značajna razlika u odnosu na kontrolu u 10% PEG-u ($p < 0,0001$) i 15% PEG-u ($p < 0,0001$).

Kod sorte El Nino, također je utvrđena statistički značajna razlika između tretmana u duljini korijena ($F_{3,176} = 4,62$; $p = 0,004$) i izdanka ($F_{3,170} = 11,1$; $p < 0,0001$). Značajno su se od kontrole razlikovali samo duljina korijena u 15% PEG-u ($p = 0,003$) i duljina izdanka u 15% PEG-u ($p < 0,0001$). Sorte ozime pšenice Felix i El Nino su se značajno razlikovali prema vrijednostima duljine izdanka ($p = 0,015$), ali ne i duljine korijena ($p = 0,13$).



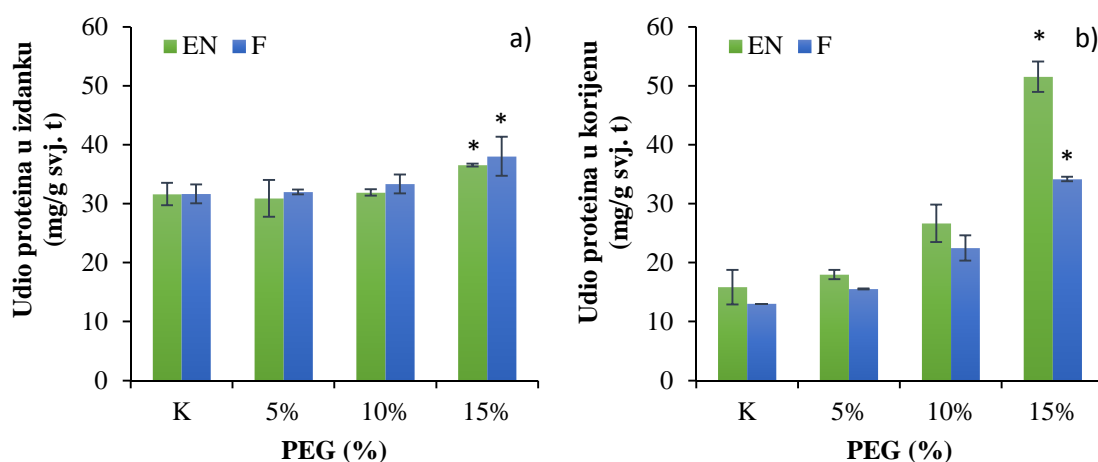
Slika 5. Svježa masa (g) izdanka (a) i korijena (b) te duljina (cm) izdanka (c) i korijena (d) pri različitim koncentracijama polietilen glikola dviju sorti ozime pšenice: Felix (F) i El Nino (EN). *** ($p < 0,001$) označavaju statistički značajnu razliku svježe mase izdanka ili korijena u pojedinim tretmanima u odnosu na kontrolu kao rezultat *post hoc* Dunnett testa.

3.3. Fiziološki odgovor klijanaca ozime pšenice na PEG-om induciranu sušu

3.3.1. Razina proteina

Sadržaj proteina mjereno je u izdanku i korijenu klijanaca pšenice koje su bile izložene tretmanima sušom i kontrolnim biljkama. Srednje vrijednosti koncentracije proteina u izdanku i korijenu klijanaca prikazane su na Slici 6. S obzirom na mali broj podataka, za potrebe definiranja razlike između dvije sorte prema sadržaju proteina statistička analiza napravljena uzevši u obzir i korijen i izdanak zajedno. Kod obje sorte rezultati su pokazali statistički značajno povećanje sadržaja proteina samo u tretmanu 15% PEG-om u odnosu na kontrolu (Kruskal-Wallis ANOVA $H_{3,16} = 8,9$, $p = 0,03$ za El Nino i $H_{3,16} = 8,1$ $p = 0,04$ za Felix). Sadržaj proteina veći je za 143% u izdanku, nego u korijenu sorte Felix te je kod sorte

El Nino također utvrđen veći sadržaj proteina u izdanku, i to za 100% u kontrolnim uvjetima. U korijenu sorte El Nino utvrđen je 225% veći sadržaj proteina u odnosu na kontrolu, a u izdanku 16% veći sadržaj proteina. U korijenu sorte Felix utvrđen je 163% veći sadržaj proteina u odnosu na kontrolu, a u izdanku 20% veći sadržaj proteina. Prema sadržaju proteina statistička je analiza pokazala da nema značajne razlike između dvije sorte (Mann-Whitney U test, $p = 0,72$). Međutim, postoji razlika u sadržaju proteina u korijenu između dviju sorti. U korijenu kontrolnog tretmana sorte El Nino utvrđen je za 22% veći udio proteina od sorte Felix, a u tretmanu s 15% PEG-om 51% veći udio proteina.

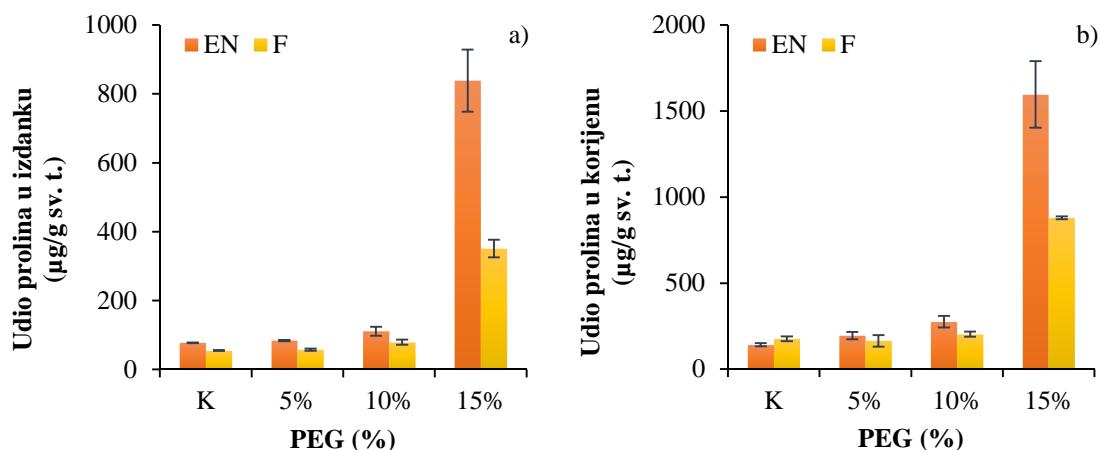


Slika 6. Udio proteina (mg/g svježe tvari) u izdanku (a) i korijenu (b) dviju sorti ozime pšenice, El Nino (EN) i Felix (F), pri različitim koncentracijama polietilen glikola (PEG, %). K označava kontrolni tretman. * ($p < 0,05$) označavaju statistički značajno povećanje sadržaja proteina u odnosu na kontrolu.

3.3.2. Sadržaj slobodnog prolina

Sadržaj slobodnog prolina mjeren je u izdanku i korijenu klijanaca pšenice izloženima suši i kontrolnim biljkama. Na Slici 7 prikazane su srednje vrijednosti prolina u izdanku i korijenu klijanaca pšenice koji su uzgajani pri različitim koncentracijama otopina PEG-a. Sadržaj slobodnog prolina u izdanku sorte El Nino iznosio je $838,70 \pm 90,1 \mu\text{g/g}$ svježe tvari, što je skoro tri puta više u odnosu na sadržaj sorte Felix ($350,82 \pm 25,8 \mu\text{g/g sv. t.}$). Pri najvišoj koncentraciji otopine PEG-a, udio slobodnog prolina u korijenu sorte El Nino iznosio je $1596,40 \pm 193,6 \mu\text{g/g}$ svježe tvari što je gotovo dvostruko više od sorte Felix u istom tretmanu ($873,4 \pm 8,4 \mu\text{g/g sv. t.}$). Prema sadržaju prolina statistička je analiza pokazala da nema značajne razlike između dvije sorte (Mann-Whitney U test, $p = 0,4$), ali

da se po odgovoru na dodatak PEG-6000 kod obje sorte sadržaj prolina značajno razlikuje od kontrole samo pri 15% PEG-u. U korijenu kontrolnih biljaka sorte Felix utvrđen je 20% veći sadržaj prolina u odnosu na korijen sorte El Nino. Međutim, u izdanku je preko 40% veći sadržaj prolina utvrđen u biljkama sorte El Nino.



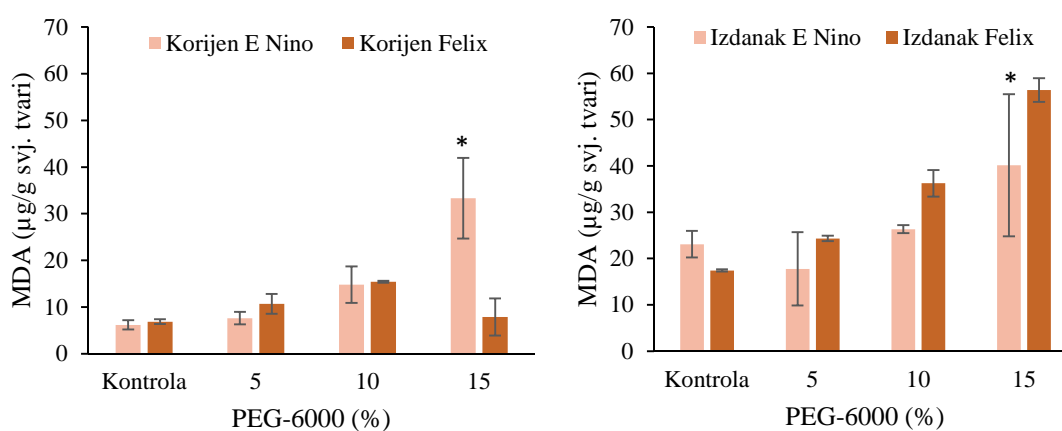
Slika 2. Udio prolina ($\mu\text{g/g sv. t.}$) u izdanku i korijenu dviju sorti ozime pšenice, El Nino (EN) i Felix (F), pri različitim koncentracijama polietilen glikola (PEG, %). K označava kontrolni tretman. Statistički značajno veći sadržaj prolina biljaka koje su rasle u mediju s 15% PEG-om (Kruskal-Wallis ANOVA).

Rezultati su pokazali statistički značajno povećanje sadržaja prolina (Kruskal-Wallis ANOVA $H_{3,16} = 9,6$, $p = 0,02$) kod sorte Felix samo u tretmanu 15% PEG-om ($p = 0,04$). Slično je utvrđeno i za genotip El Nino (Kruskal-Wallis $H_{3,16} = 9,9$, $p = 0,02$) i samo se sadržaj prolina klijanaca koji su rasli u 15% PEG-u značajno razlikovao od kontrole ($p = 0,02$). Sadržaj prolina u korijenu je kod sorte Felix porastao 400%, a u izdanku 543% u odnosu na sadržaj prolina u korijenu i izdanku kontrolnih biljaka. Kod sorte El Nino sadržaj prolina u korijenu biljaka koje su rasle u 15% PEG-u porastao je 1026%, a u izdanku 982% u odnosu na sadržaj prolina u korijenu i izdanku kontrolnih biljaka.

3.3.3. Razina lipidne peroksidacije

Razina lipidne peroksidacije mjerena je u izdanku i korijenu klijanaca pšenice koje su bile izložene tretmanima sušom i kontrolnih biljaka. Srednje vrijednosti koncentracije malondialdehida (MDA) u izdanku i korijenu klijanaca prikazane su na Slici 8. S obzirom na mali broj podataka, za potrebe definiranja razlike između dvije sorte prema sadržaju

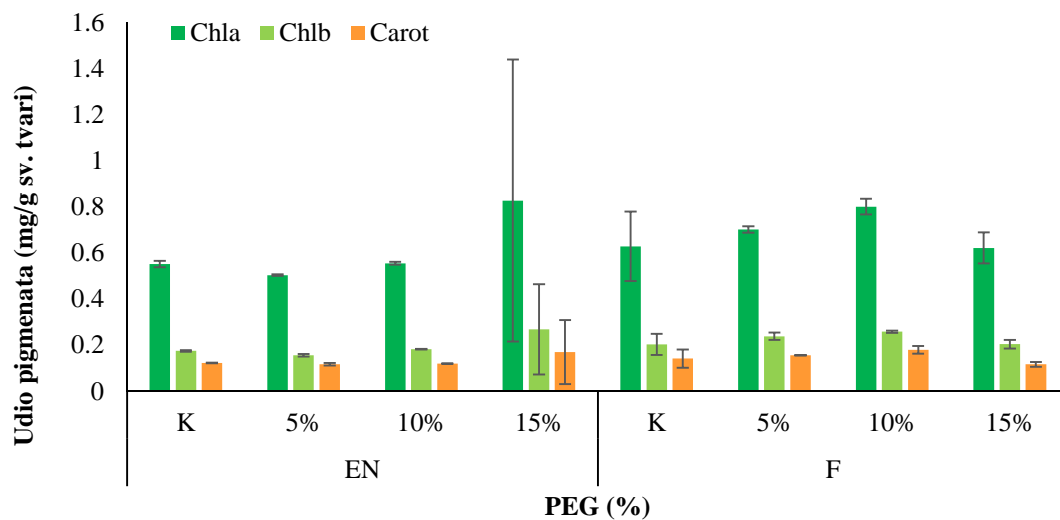
malondialdehida statistička analiza napravljena uzevši u obzir i korijen i izdanak zajedno. Kod sorte El Nino rezultati su pokazali statistički značajno povećanje (Kruskal-Wallis ANOVA $H_{3,16} = 9,82$, $p = 0,02$) sadržaja malondialdehida samo u tretmanu 15% PEG-om u odnosu na kontrolu i u odnosu na 5% PEG ($p = 0,045$). S druge strane, kod genotipa Felix očigledno je povećanje sadržaja malondialdehida ali ono nije bilo statistički značajno (Kruskal-Wallis $H_{3,16} = 1,92$, $p = 0,59$). Zbog toga što je velika varijabilnost utvrđena između odgovora na povećanje koncentracije PEG-a u korijenu i izdanku, statistička analiza nije pokazala značajnu razliku između tretmana.



Slika 8. Udio malondialdehida ($\mu\text{g/g}$ svježe tvari) u izdanku pri različitim koncentracijama polietilen glikola (PEG, %). * ($p < 0,05$) označavaju statistički značajno povećanje sadržaja MDA u odnosu na kontrolu.

3.3.4. Razina koncentracije fotosintetskih pigmenata

Srednje vrijednosti količine pigmenata prikazane su na Slici 9. Prema vrijednostima koncentracija fotosintetskih pigmenata nije utvrđena statistički značajna razlika između tretmana (Kruskal-Wallis ANOVA $H_{3,24} = 1,98$, $p = 0,58$ za Felix; $H_{3,24} = 0,7$, $p = 0,86$ za El Nino) kod obje sorte. Međutim, u tretmanu s 15% PEG-om kod sorte El Nino utvrđene su 50%, 53% i 38% veće vrijednosti koncentracija klorofila *a*, klorofila *b* i karotenoida u odnosu na kontrolu.



Slika 9. Udio (mg/g svježe tvari) klorofila *a* (Chla), klorofila *b* (Chlb) i karotenoida (Carot) dviju sorti ozime pšenice El Nino (EN) i Felix (F) pri različitim koncentracijama polietilen glikola (PEG, %). K označava kontrolni tretman.

4. Rasprava

Mnogi abiotički čimbenici mogu utjecati na ukupnu klijavost sjemenki, uniformnost klijanja i rast klijanaca, a suša je jedan od glavnih koja uzrokuje niz morfoloških, fizioloških i biokemijskih promjena u fazi klijanja sjemena te rasta i razvoja biljaka. Klijavost sjemenki je svojstvo koje pokazuje koliko će se biljaka razviti od ukupnog broja sjemenki stavljenih na naklijavanje. Prihvatljiva klijavost sjemenki je uglavnom veća od 85%, što je slučaj kod obje istraživane sorte ozime pšenice. Međutim, sorta El Nino je imala značajno manju klijavost u odnosu na sortu Felix u kontrolnim uvjetima. Klijanje sjemena je važna faza razvoja biljaka u kojoj dolazi do nekoliko značajnih fizioloških i biokemijskih promjena, poput povećane aktivnosti respiracije, sinteze proteina iz pohranjene i *de novo* sintetizirane mRNA i mobilizacije pričuvnih tvari (Shu i sur. 2015). Sam izraz klijavost se često koristi na pogrešan način, budući da se miješa s rastom klijanaca koji započinje nakon završetka klijanja. Proces klijanja sastoji se od tri procesa, imbibicije, procesa aktivacije i intra-seminalnog rasta koji završava s izlaskom embrija (Bentsinka i Koornneef 2008). U praktičnom smislu, teško je utvrditi početak i kraj svakog od tih procesa jer se odvijaju u višestaničnom tkivu na molekularnoj i staničnoj razini. Stoga je preciznost u određivanju točnog trenutka početka procesa klijanja pomoću nekog molekularnog ili staničnog kriterija zamijenjena makroskopskim kriterijima, kao što je izlazak embrija, omogućujući precizniju usporedbu između primjerice različitih sorti iste vrste (Ranal i Santana 2006). Rezultati ovog istraživanja su pokazali da postoji značajna razlika između dvije sorte ozime pšenice prema ukupnoj klijavosti, prosječnom vremenu klijanja i indeksu stope klijavosti pod utjecajem različitih koncentracija PEG-a. Bolja ukupna klijavost, više vrijednosti indeksa stope klijavosti, i niže vrijednosti prosječnog vremena klijanja sorte Felix ukazuju na brže klijanje sjemenki Felixa. Ova dinamika klijanja sorte Felix ukazuje na bolju energiju klijanja, odnosno vigor sjemena. Dakle, sjeme sorte Felix ima veći potencijal u odnosu na sjeme sorte El Nino. Osim toga, brže klijanje utječe na ujednačeniji rast klijanaca što posljedično utječe i na veću otpornost biljaka na okolišne uvjete jer razvijenije biljke pokazuju bolju otpornost. Prema tome, prema mjerenim parametrima klijavosti sorta Felix je manje osjetljiva na sušu induciranu primjenom polietilen glikola. Također, razlike između pojedinih sorti pšenice opisane su i u radu Španić i sur. (2017) gdje su pojedine sorte pšenice pokazale viši postotak klijavosti u uvjetima suše inducirane PEG-om u odnosu na druge sorte. Povećanjem koncentracije PEG-a postotak klijavosti progresivno se smanjivao kod obje sorte pšenice te

je takav obrazac ponašanja primijećen i u drugim radovima koji se bave problematikom suše inducirane PEG-om (Ahmad i sur. 2015).

Rezultati praćenja rasta klijanaca ozime pšenice su pokazali da zalijevanje različitim koncentracijama otopine polietilen glikola uzrokuje zamjetno smanjenje rasta korijena i izdanka kod obje istraživane sorte. Redukcija rasta najznačajnija je pri višim koncentracijama PEG-a, osobito kod sorte El Nino. Ovi su rezultati u skladu s onima mnogih autora (Španić i sur. 2017; Ali i sur. 2014; Bayoumi i sur. 2008) koji su utvrdili da PEG uzrokuje smanjenje rasta kroz svoj osmotski učinak, što je ekvivalentno smanjenju aktivnosti vode. Povećanjem koncentracije PEG-a, koji nema mogućnost prolaska kroz biološke membrane, smanjuje se vodni potencijal okolnog medija. To dovodi do smanjena turgora i usporavanja rasta (Ali i sur. 2014). Prema Bayoumiju (2008) smanjeni rast izdanka i korijena posljedica je usporavanja stanične diobe i smanjenja elongacije stanica što može dovesti do lignifikacije korijena koja omogućava biljkama da uđu u fazu niske aktivnosti čekajući povoljne uvjete za nastavak rasta i razvoja.

Postoji međuzavisnost rasta i razvoja stabljike i korijena. Stabljika se oslanja na korijen za usvajanje vode i hranjivih tvari, dok korijenje ovisi o produktima fotosinteze iz nadzemnog dijela biljke (Pevalek-Kozlina 2004). Primjerice, omjer stabljike i korijena se povećava kako biljke stare što pokazuje da stabljika ima veći prioritet za nakupljanje produkata fotosinteze nego korijenje. Prema dobivenim rezultatima dolazi do smanjenja omjera stabljike i korijena povećanjem koncentracije polietilen glikola što ukazuje da korijen ima prednost u korištenju produkata fotosinteze u postojećim uvjetima (vodnog deficita). Naime, korijen ima važnu ulogu u tolerantnosti biljaka na sušu. Pojačanim rastom i često većom biomasom u sušnim uvjetima u odnosu na izdanak, korijen osigurava biljci dopiranje do dubljih slojeva tla u kojima je veća vjerojatnost postojanja još uvijek raspoložive vode (Kereša i sur. 2008). Prema tome, duljina korijena se smatra važnim obilježjem odabira sorti otpornih na sušu.

Poznato je da su sadržaj i kvaliteta proteina među najvažnijim parametrima koji određuju kvalitetu sjemena pšenice. Povećanjem suše inducirane PEG-om u izdanku obje sorte ne dolazi do značajnih promjena sadržaja ukupnih proteina, dok u korijenu sadržaj proteina raste i to značajnije kod sorte El Nino. Sadržaj proteina u biljkama mijenja se kvalitativno i kvantitativno u uvjetima suše (Feki i Brini 2016). U uvjetima suše može doći do smanjenja sadržaja nekih proteina kao posljedice inhibicijskih učinaka sušnog stresa na proces transkripcije. S druge strane, suša inducira transkripciju gena za brojne proteine koji su

uključeni u proces adaptacije i tolerancije, kao što su dehidrini, akvaporini i „heat shock“ proteini i antioksidacijski enzimi (Hassan i sur. 2015; Kosova i sur. 2014).

Kako bi se prilagodile poveanoj nestašici vode, biljke imaju sposobnost osmotske regulacije, odnosno smanjenja osmotskog potencijala u stanici aktivnim nakupljanjem odredenih osmolita, što omogućuje da se procesi koji ovise o turgoru nastave do neke mjere i u stresnim uvjetima (Kereša i sur. 2008). Prolin predstavlja jednu od važnijih tvari koja se akumulira u tkivima biljaka izloženih suši (Marchska i sur. 2013; Changhai i sur. 2010). Također, dobro je poznata činjenica da se sadržaj slobodnog prolina u biljnim tkivima povećava kao odgovor na sušne uvjete, pa tako i na sušu induciranu PEG-om (Dehnavi i sur. 2017; Chaves i sur. 2013; Bayoumi i sur. 2008). Rezultati u ovom istraživanju su pokazali povećanje sadržaja slobodnog prolina u obje sorte ozime pšenice povećanjem suše inducirane PEG-om. Zanimljivo je to da u je u kontrolnim uvjetima razina prolina u korijenu sorte El Nino bila niža nego u korijenu sorte Felix, ali je sadržaj prolina u izdanku bio niži kod sorte Felix što se slaže s već prethodno utvrdenim da sorta Felix ima bolji potencijal rasta klijanaca. Povećanjem koncentracije PEG-a, nekoliko puta veća količina slobodnog prolina nakuplja se u izdanku i korijenu sorte El Nino. Razna su objašnjenja nakupljanja prolina u tkivima biljaka, a neka od njih odnose se na to da u sušnim uvjetima dolazi do povećane sinteze proteina, smanjene oksidacije prolina u glutamat te povećane degradacije proteina u prolin (Dehnavi i sur, 2017). Prema Rahdariju (2012) do povećanja sadržaja slobodnog prolina dolazi zbog toga što je on kompatibilni osmolit koji uklanja slobodne molekule kisika nastale kao posljedica sušnog stresa te tako sudjeluje u zaštiti makromolekula od oštećenja. Također, povećanje sadržaja prolina može biti povezano s njegovom ulogom u zaštiti proteina od denaturacije, očuvanju strukture i aktivnosti enzima (Chaves i sur. 2003).

Sadržaj malondialdehida posredno predstavlja mjeru razine lipidne peroksidacije. Povišenjem koncentracije PEG-a dolazi do povišenja razine MDA u tkivima klijanaca. To povišenje nekoliko je puta veće u izdanku obje sorte ozime pšenice, nego u korijenu. Munns i James (2003) svojim su istraživanjem potvrdili da se u sušnim uvjetima dolazi do narušavanja integriteta stanične membrane uslijed povećanog stvaranja ROS-a i visoke razine lipidne peroksidacije. Slično potvrđuju Ali i sur. (2018) koji povezuju povećanje sadržaja MDA s povećanim sadržajem ROS-a, točnije vodikova peroksida. Uspoređujući međusobno dvije sorte, primjetan je veći sadržaj MDA u izdanku Felixa. Niža razina lipidne

peroksidacije u izdanku sorte El Nino može biti rezultat utvrđenog većeg nakupljanja prolina koji ima zaštitnu funkciju.

Fotosintetska aktivnost izrazito je osjetljiva na sušu (Jaleel i sur. 2009). Koncentracija klorofila koristi se za karakterizaciju stanja fotosintetskog aparata (Ali i sur. 2018) te se promjenama u sadržaju fotosintetskih pigmenata može pratiti utjecaj suše na proces fotosinteze. Trend smanjenja ili povećanja sadržaja klorofila *a*, klorofila *b* i karotenoida pripisuje se različitim razinama tolerancije na sušu ispitivane sorte pšenice (Ali i sur. 2018). Povišenje stresa izazvanog sušom prati povećana razina karotenoida o čemu govore mnogi autori (Dehnavi i sur. 2017; Piwowarczyk i sur. 2013; Lim i sur. 2012). Smatra se da su karotenoidi odgovorni za zaštitu od slobodnih radikala akumuliranih u stresnim uvjetima, stoga povišena razina karotenoida označava toleranciju na stres. Karotenoidi štite fotosintetski aparat pomažući u dispereziji energije (Abid i sur. 2018; Dehnavi i sur. 2017). U ovom istraživanju nisu utvrđene značajne promjene koncentracije fotosintetskih pigmenata kod obje sorte.

5. Zaključak

Genetska varijabilnost unutar vrste je značajna za proučavanje mehanizama tolerancije biljaka na sušu. Rezultati ovog istraživanja istaknuli su značajne razlike između dvije sorte izložene sušnom stresu. Smanjena klijavost i energija klijanja te smanjeni rast klijanaca sorte El Nino ukazuje na veću osjetljivost El Nino na sušu induciranu PEG-om.

Praćenjem pokazatelja fizioloških promjena utvrđeno je da do izraženijih promjena dolazi u tkivu sorte El Nino u odnosu na sortu Felix. Veća akumulacija proteina i prolina u korijenu sorte El Nino ukazuje da dolazi do aktivacije mehanizama obrane od suše inducirane PEG-om, međutim ti mehanizmi nisu dovoljni da bi spriječili štetan utjecaj koji se očituje povišenom razinom lipidne peroksidacije. Fiziološke promjene ukazuju također na veću osjetljivost sorte El Nino na sušu induciranu PEG-om.

Dakle, u fazi klijanja i ranog rasta klijanaca sorta Felix pokazala je veći potencijal tolerancije na sušu uzrokovanu PEG-om.

6. Literatura

Abid, M., Hakeem, A., Shao, Y., Liu, Y., Zahoor, R., Fan, Y., Suyu, J., Ata-Ul-Karim, S. T., Tian, Z., Jiang, D., Snider, J. L., Dai, T. (2018) Seed osmopriming invokes stress memory against post-germinative drought stress in wheat (*Triticum aestivum*L.). *Environmental and Experimental Botany* 145: 12-20.

Ahmad, Z., Ahmad Waraich, E., Ahmad, R., Iqbal, M. A., Awan, M. I. (2015) Studies on Screening of Maize (*Zea mays* L.) Hybrids under Drought Stress Conditions. *Journal of advanced botany and zoology* 2 (4): 1-5.

Ali, A., Arshad, M., Saqlan Naqvi, S. M., Ahmad, M., Sher, H., Fatima, S., Kazi, G. A., Rasheed, A., Mujeeb-Kazi, A. (2014) Exploitation of synthetic-derived wheats through osmotic stress responses for drought tolerance improvement. *Acta Physiologie Plantarum* 36 (9): 2453-2465.

Baloch, M. J., Dunwell, J., Khakwani, A. A., Dennett, M., Jatoi, W. A., Channa, S. A. (2012) Assessment of wheat cultivars for drought tolerance via osmotic stress imposed at early seedling growth stages. *Journal of Agricultural Research*, 50 (3): 299-310.

Bates, L. S., Waldren, R. P., Teare, I. D. (1973) Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant Soil* 39: 205-207.

Bayoumi, T.Y., Manal, M. H., Metwali, E. M. (2008) Exploitation of synthetic-derived wheats through osmotic stress responses for drought tolerance improvement. *African Journal of Biotechnology* 7 (14): 2341-2352

Bentsinka, L., Koornneef, M. (2008) Seed Dormancy and Germination. *The Arabidopsis Book*, 1-18.

Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.

Changhai S., Baodi D., Yunzhou Q. (2010) Physiological regulation of high transpiration efficiency in winter wheat under drought conditions. *Plant Soil Environ* 56 (7):340–347.

Chaves, M. M., Maroco, J. P., Pereira, J. S. (2003) Understanding plant responses to drought - from genes to the whole plant. *Functional Plant Biology* 30: 239-264.

- Dehnavi, M. M., Zare, T., Khajeeyan, R., Merajipoor, M. (2017) Drought and Salinity Impacts on Bread Wheat in a Hydroponic Culture: A Physiological Comparison. *Journal of Plant Physiology and Breeding* 7 (1): 61-74.
- Djibril, S., Mohamed, O. K., Diaga, D., Diegane, D., Abaya, B. F., Maurice, S., Alain, B. (2005) Growth and development of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) Seedlings under drought and salinity stresses. *African Journal of Biotechnology* 4 (9): 968-972.
- Drezner, G., Dvojković, K., Španić, V. EL NINO; sorta ozime pšenice priznata u Republici Hrvatskoj (EL NINO; winter wheat variety recognized in Republic of Croatia). Rješenje Ministarstva poljoprivrede Republike Hrvatske. Klasa: UP/I-320-20/16-05/123 ; Ur.broj: 525-09/1158-16-2. Zagreb 18. listopada 2016. godine
- Duman I. (2006) Effects of seed priming with PEG or K₃PO₄ on germination and seedling growth in lettuce. *Pak J Biol Sci* 11: 923–8.
- Feki, K., Bini, F. (2016) Role of proteins in alleviating drought stress in plants. U: Ahmad, P. (ur.) *Water stress and crop plants: A sustainable approach*. © 2016 John Wiley & Sons, Ltd. str. 165-176.
- Gill, S., S., Tuteja, N. (2010) Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol Bioch* 48: 909-930.
- Hare P.D. Cress W.A., Van Staden J. (1998) Dissecting the roles of osmolyte accumulation during stress. *Plant, Cell and Environment* 21: 535–553.
- Hassan, N. M., El-Bastawisy, Z. M., EL-Sayed, A.K., Ebeed, H. T., Nemat Alla, M.M. (2015) Roles of dehydrin genes in wheat tolerance to drought stress. *Journal of Advanced Research* 6: 179-188.
- Hellal. F. A., El-Shabrawi, H. M., Abd El-Hady, M., Khatab, I. A., El- Sayes, S. A. A., Abdelly, C. (2018) Influence of PEG induced drought stress on molecular and biochemical constituents and seedling growth of Egyptian barley cultivars. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology* 16 (1): 203-212.
- Hoagland, D. R., Arnon, D. I. (1950) The water-culture method for growing plants without soil. *Circular. California Agricultural Experiment Station* Vol. 347 (2): 1-32.
- Ibrahim M., Zeid N., El-Semary A. (2001) Response of two differentially drought tolerant cultivars of maize to drought stress. *Pakistan J Biol Sci* 4: 779–84.

Jaleel, C.A., P. Manivannan, A. Wahid, M. Farooq, R. Somasundaram and R. Panneerselvam, (2009) Drought stress in plants: a review on morphological characteristics and pigments composition. *Int. J. Agric. Biol.*, 11: 100–105.

Jones HG, Jones MB (1989) Introduction: some terminology and common mechanisms. U: Jones, H. G., Flowers, T. J., Jones, M. B. (ur) *Plants under stress: Biochemistry, Physiology and Ecology and their Application to Plant Improvement*. Cambridge University Press, Cambridge, 1-10.

Kader, M. A. (2005.) A Comparison of Seed Germination Calculation Formulae and the Associated Interpretation of Resulting Dana. *Journal & Proceedings of the Royal Society of New South Wales* 138, 65–75.

Kereša, S., Barić M., Šarčević, H., Habuš Jerčić, I., Vujić, V. (2008) Tolerance to drought stress of Croatian winter wheat genotypes at seedling stage. *Cereal Research Communications* 36: 1039-1042.

Kereša, S., Barić, M., Horvat, M., Habuš Jerčić, I. (2008) Mehanizmi tolerantnosti biljaka na sušu i njihova genska osnova kod pšenice. *Sjemenarstvo* 25(1): 35-45.

Khaled, A. G. A. , Motawea, M. H., Said, A.A. (2015) Identification of ISSR and RAPD markers linked to yield traits in bread wheat under normal and drought conditions, *J. Genet. Eng. Biotechnol.* 13: 243–252.

Khan, M. A., Weber, M. J. (2008) *Ecophysiology of high Salinity Tolerant Plants*. Springer Science Business Media. ISBN 97814020 4017 47. - knjiga-treba poglavlje

Kosová, K., Vitámás, P., Prášil, I. T. (2014) Wheat and barley sehydrins under cold, drought, and salinity - what can LEA-II proteins tell us about plant stress response? *Frontiers in Plant Science* 5: 1-6.

Lichtenthaler, H. K. (1987) Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Method Enzymol* 148: 350-382.

Lim, J. H., Park, J. K., Kim, B. K., Jeong, J. W., Kim, H. J. (2012) Effect of salinity stress on phenolic compounds and carotenoids in buckwheat (*Fagopyrum esculentum* M.) sprout. *Food Chemistry* 135: 1065-1070.

Loreti, E., van Veen, H., Pereta, P. (2016) Plant responses to fooding stress. *Curr. Opin. Plant Biol.* 33: 64-71.

Mahajan S, Tuteja N (2005) Cold, salinity and drought stresses: An overview. *Arch Biochem Biophys* 444: 139–158.

Marcińska, I., Czyczyło-Mysza, I., Skrzypek, E., Filek, M., Grzesiak, S., Grzesiak, M. T., Janowiak, F., Tomasz, H., Dziurka, M., Nowakowska, A., Quarrie, S. A. (2013) Impact of osmotic stress on physiological and biochemical characteristics in drought-susceptible and drought resistant wheat genotypes. *Acta Physiologiae Plantarum* 35: 451-461.

Marusteri, M., Bacarea, V. (2010) Kako odabrati pravi test za procjenu statističke značajnosti razlike između skupina? *Biochemia Medica* 20 (1): 15-32.

Mohammadkhani, N., Heidari, R. (2008) Water Stress Induced by Polyethylene Glycol 6000 and Sodium Chloride in Two Maize Cultivars. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 11 (1): 92-97.

Munns, R., James, R. A., (2003) Screening methods for salinity tolerance: a case study with tetraploid wheat. *Plant and Soil* 253: 201-218

Pahlich E (1993) Larcher's definition of plant stress: a valuable principles for metabolic adaptability research. *Rev Bras Fisiol Veg* 5(2): 209-216.

Pevalek-Kozlina, B. (2004): *Fiziologija bilja, Profil, Zagreb.*

Piwowarczyk, B., Kamińska, I., Rybiński, W. (2014) Influence of PEG Generated Osmotic Stress on Shoot Regeneration and Some Biochemical Parameters in Lathyrus Culture. *Czech J. Genet. Plant Breed.* 50 (2): 77-83.

Rahdari, P., Tavakoli, S., Hosseini S. M. (2012) Studying of salinity stress effect on germination, proline, sugar, protein, lipid and chlorophyll content in Purslane (*Portulaca oleracea* L.) leaves. *Journal of Stress Physiology and Biochemistry* 8 (1): 182-193.

Ranal, M. A., Garcia de Santana, D. (2006) How and why to measure the germination process? *Revista Brasil. Bot* 29 (1): 1-11.

Shu K., Meng Y. J., Shua H. W., Liu W. G., Du J. B., Liu J., Yang W. Y. (2015) Dormancy and germination: How does the crop seed decide? *Plant Biol* 17: 1104.

Srivastava, A. K., Pasala, R., Minhas, P. S., Suprasanna, P. (2016) Plant bioregulators for sustainable agriculture Integrating redox signaling as a possible Unifying Mechanism. *Adv. Agron. Elsevier Inc.* 137, 237–278.

Šanić, V., Ižaković M., Marček, T. (2017) Wheat germination and seedlings under PEG-induced conditions. *Agronomski glasnik* 3: 99-110.

Tasir S. Per, Nafees A. Khan, Palakolanu Sudhakar Reddy, Asim Masood, Mirza Hasanuzzaman, M. Iqbal R. Khan, Naser A. Anjum (2017) Approaches in modulating proline metabolism in plants for salt and drought stress tolerance: Phytohormones, mineral nutrients and transgenics. *Plant Physiology and Biochemistry* 115: 126-140.

Verma, S., Dubey, R. S. (2003) Leads toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants. *Plant Sci* 164: 645-655.

Yancey P.H., Clark M.E., Hand S.C., Bowlus R.D., Somero G.N. (1982) Living with Water Stress: Evolution of Osmolyte Systems. *Science*, 217: 1214-1222.

Zhang, J., Krikham, M. B. (1994) Drought-Stress-Induced Changes in Activities of Superoxide Dismutase, Catalase, and Peroxidase in Wheat Species. *Plant Cell Physiol.* 35(5): 785-791.

Web 1. <http://www.sci-news.com/genetics/science-draft-sequence-wheat-genome-02069.html> (11. 7. 2018.)

Web 2. FAO, 2011. Crop prospects and food situation. food and agriculture organization. Global Information and Early Warning System. Trade and Markets Division. <http://www.fao.org/home/en/> (11. 7. 2018.)