UTJECAJ SUMPOROVODIKA NA VIGOR SJEMENA SUNCOKRETA (Helianthus annuus L.) PRI SUŠNOM STRESU

Serini, Andreja

Master's thesis / Diplomski rad

2015

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of agriculture / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Poljoprivredni fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:151:303086

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek - Repository of the Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek

zir.nsk.hr

Image not found or type unknown

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

POLJOPRIVREDNI FAKULTET U OSIJEKU

Andreja Serini, apsolventica

Diplomski studij Povrćarstvo i cvjećarstvo

UTJECAJ SUMPOROVODIKA NA VIGOR SJEMENA SUNCOKRETA (*Helianthus annuus* L.) PRI SUŠNOM STRESU

Diplomski rad

Osijek, 2015.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

POLJOPRIVREDNI FAKULTET U OSIJEKU

Andreja Serini, apsolventica

Diplomski studij Povrćarstvo i cvjećarstvo

UTJECAJ SUMPOROVODIKA NA VIGOR SJEMENA SUNCOKRETA (*Helianthus annuus* L.) PRI SUŠNOM STRESU

Diplomski rad

Povjerenstvo za ocjenu i obranu diplomskog rada:

1. prof.dr.sc. TihanaTeklić, predsjednik
2. doc.dr.sc. Miroslav Lisjak, mentor
3. doc.dr.sc. Tomislav Vinković, član

Osijek, 2014.

SADRŽAJ

1. UVOD 1

1.1. Suncokret (*Helianthus annuus* L.) 1

1.1.1. Podrijetlo i sistematika suncokreta 1

1.1.2. Morfološka svojstva 1

1.1.3. Hranidbena vrijednost suncokreta 3

1.2. Sumpor 4

1.2.1. Sumporovodik (H_2S) 5

1.3. Cilj istraživanja 6

2. PREGLED LITERATURE 7

3. MATERIJALI I METODE 14

3.1. Postavljanje pokusa 14

3.2. Određivanje energije klijanja i standardne klijavosti 14

3.3. Određivnje mase klijanaca 14

3.3.1 Određivanje sadržaja vodik peroksida 15

3.3.2.Određivanje intenziteta lipidne peroksidacije 16

3.3.3. Određivanje sadržaja prolina 17

3.4. Obrada podataka 18

4. REZULTATI 19

5. RASPRAVA 34

6. ZAKLJUČAK 43

7. POPIS LITERATURE 44

8. SAŽETAK 48

9. SUMMARY 49

10. POPIS TABLICA 50

11. POPIS SLIKA 51

12. POPIS GRAFIKONA 52

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA 53

BASIC DOCUMENTATION CARD 54

1. UVOD

1.1. Suncokret (*Helianthus annuus* L.)

1.1.1. Podrijetlo i sistematika suncokreta

Suncokret (*Helianthus annuus* L.) je jednogodišnja ratarska kultura koja pripada porodici *Asteraceae* (*Tablica 1*). Ovu drevnu ukrasnu biljku Indijanci su kultivirali 3000 godina prije Krista, na području Sjeverne Amerike, točnije Arizone i Novog Meksika. Suncokret se brzo proširio po cijelom američkom kontinentu. Španjolci su 1510. godine prenijeli ovu kulturu u Europu i tako je prvi suncokret zasađen u botaničkom vrtu u Madridu. U našoj zemlji 1934. godine pojavom prvih tvornica ulja u Čepinu i Zagrebu, suncokret polako dobiva sve veću značajnost. Ozbiljnija proizvodnja suncokreta u Republici Hrvatskoj započela je 1970.-te godine.

Suncokret danas zauzima važno mjesto u ljudskoj, ali i životinjskoj ishrani. Primarna svrha uzgoja ove kulture je proizvodnja biljnoga ulja, koje sadrži visoku energetsku i biološku vrijednost te pripada najfinijim i visokokvalitetnim biljnim uljima. Suncokretovo ulje također se koristi u industrijskoj proizvodnji sapuna, boja, biljnih masti, majoneza, margarina, za konzerviranje različitih proizvoda te kao bio-gorivo za dizel motore (Vratarić i sur., 2004.).

Tablica 1. Sistematika suncokreta (*Helianthus annuus* L.) (Vratarić i sur., 2004.)

TAKSONOMIJA	
CARSTVO	*Plantae*
PODCARSTVO	*Magnoliophyta*
RAZRED	*Magnoliopsida*
RED	*Asterales*
PORODICA	*Asteraceae*
ROD	*Helianthus*
VRSTA	*Helianthus annuus L.*

1.1.2. Morfološka svojstva

Suncokret, kao kultivirana vrsta, je jednogodišnja zeljasta biljka. Promjene u morfološkim svojstvima uvelike su ovisna o okolini i genotipu. Korijen suncokreta je dobro razvijen, sastoji se od glavnog korijena koji je vretenast, te od velikog broja bočnoga korijenja. Neprekidno raste tijekom cijele vegetacije, u dubinu oko 3-4 m, a u

širinu 1,2 m, ovisno o tipu tla, količini vlage u tlu i opskrbljenosti hranjivima. Poprilično je otporan na sušu, jer tada korijen prodire dublje u tlo, te ima veliku moć upijanja. Raste 2 do 2,5 puta brže od nadzemnog dijela, a svoj maksimum dostiže u vrijeme nalijevanja sjemena. Kod suncokreta (*Slika 1*) se može javiti i adventivno korijenje na donjem dijelu stabljike, kao dopuna primarnom korijenu u apsorpciji vode.



Slika 1. Suncokret (*Helianthus annuus* L.)

Izvor: http://vapakol.ru/wp-content/uploads/2012/07/podsolnechnik-226x300.jpg

Stabljika je u ranom stadiju razvoja krhka i tanka, lako se lomi, a s razvojem postaje deblja i grublja, te na kraju vegetacije odrveni. Visina stabljike u našim uvjetima varira od 150 do 220 cm, a debljina između 2-5 cm. Kod uljnih tipova suncokreta stabljika se u pravilu ne grana, već ima samo jednu glavicu na vrhu. Na poprečnom presjeku stabljika je okrugla, a površina joj je pokrivena dlačicama.

Listovi su jednostavni, srcoliki sa zašiljenim vrhom. Lisna peteljka je gruba, najčešće dužine kao i plojka 5-50 cm. Srcolika plojka je krupna s nazubljenim rubovima, a najveće plojke se nalaze na sredini stabljike. Listovi na stabljici smješteni su naizmjenično, osim najniža dva do tri para koji su smješteni nasuprotno.

Na vrhu stabljike nalaze se cvjetovi suncokreta koji su sakupljeni u cvat ili glavicu. Kod uljanih tipova promjer glavice se kreće od 15 do 25 cm, a kod neuljanih tipova suncokreta i do 40 cm. Glavica može bit konkavnog ili konveksnog oblika, a u početku njenog razvoja štite je sitni trouglasti zeleni listići, tvoreći višeslojni zaštitni omotač. Cvat se sastoji osnove na kojoj se nalaze dva tipa cvjetova: cjevasti (fertilni) i jezičasti

(sterilni). Cjevasti su cvjetovi smješteni po cijeloj površini unutrašnjosti glavice, te su dvospolni, a jezičasti cvjetovi imaju pet izduženih i sraslih latica, zakržljali tučak, smještenih po obodu glavice. Ovi cvjetovi su izrazito žute boje, te služe za privlačenje kukaca. Suncokret cvjeta od lipnja do rujna.

Plod suncokreta, najčešće nazivamo sjeme ili zrno, no on je zapravo jednosjemena roška (*achenium*), koji se sastoji od ljuske, perisperma i klice sa supkama.

Sjemenke mogu biti ovalnog, izduženog ili okruglastog oblika, duljine oko 0,7-2,3 cm i širine 0,4-1,3 cm. Ovisno o sortimentu, masa 1000 sjemenki kreće se od 30 do 200 g, dok su osnovne boje sjemenki: crna, smeđa, siva ili bijela. (Vratarić i sur., 2004.).

1.1.3. Hranidbena vrijednost suncokreta

Kao što je već navedeno, suncokret se često koristi u ljudskoj i životinjskoj ishrani, a primarna svrha uzgoja je za industrijsku proizvodnju ulja. Suncokret ima vrlo visoku prehrambenu i biološku vrijednost (*Tablica 2*). Prema sadržaju esencijalnih masnih kiselina i aminokiselina, ocjenjuje se biološka vrijednost sjemena, jer one sprječavaju brojna oboljenja, prvenstveno ona koja se javljaju u krvožilnom sustavu. Zrno suncokreta je bogato sencijalnim aminokiselinama poput cisteina, triptofana i metionina.

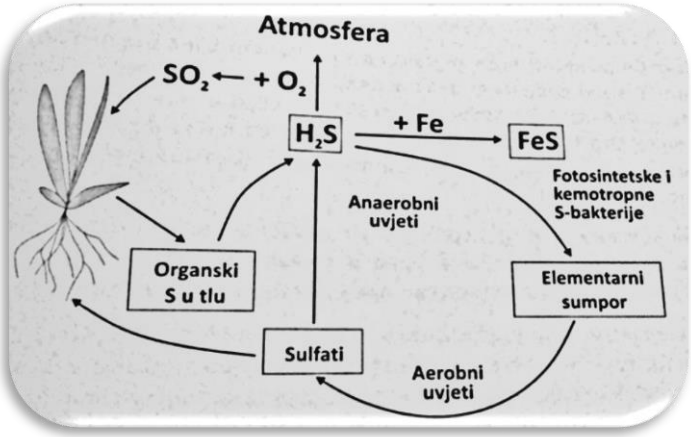
Nadalje, suncokret je važna medonosna biljka, jer u fazi cvatnje proizvede oko 70 kg/ha peludnog zrna, te oko 40 kg/ha nektara. Također, nakon ekstrakcije ostaje sačma, a koristi se kao kvalitetno krmivo za ishranu stoke. List suncokreta sadrži oko 22 % karotina i 13 % bjelančevina, dok glave suncokreta imaju 20-27 % pektina. (Vratarić i sur., 2004.)

Tablica 2. Hranidbena vrijednost suncokreta (Vratarić i sur., 2004.)

SASTOJAK	%
Ulje	43
Bjelančevine	18
Celuloza	26
Nedušićne tvari	10
Minerali	3

1.2. Sumpor

Sumpor je strukturni element bjelančevina putem kojih se u dovoljnim količinama unosi u organizam te ulazi u građu aminokiselina cisteina, cistina i metionina. Može se unositi i kao anorganski sumpor u sulfatnom i sulfidnom obliku. Kao kemijski element, S je vrlo rasprostranjen u prirodi (*Slika 2*), a u tlu potječe iz matičnih stijena. U njima se nalazi u sulfidnom obliku gdje se oslobađa i oksidira prilikom njihovog raspadanja. Najznačajnije sumporne bakterije koje vrše oksidaciju su *Baggiatoa, Thiobacillus thioxidans, Thiotrix* i dr. Sumpor se u vremenu novije i naprednije industrije akumulira u tlu iz atmosfere, gdje se nalazi u vidu SO_2 ili sumporovodika (H_2S). (Vukadinović i Vukadinović, 2011.)



Slika 2. Ciklus sumpora u prirodi (Vukadinović i Vukadinović, 2011.)

Prema Vukadinović i Vukadinović (2011.) ukupni sadržaj sumpora 0,05-0,4 %, imaju tla umjerenog klimatskog područja. Najveći dio sumpora nalazi se u organskoj tvari (60-90 % ukupnog S), kod prozračnih i ocjeditih tala. Nepoželjan višak sumpora uzrokuje zakiseljavanje tla što dovodi do izumiranja šuma u Europi. Nasuprot tome, nedostatak sumpora događa se u tlima koja su siromašna humusom te na karbonatnim tlima, bogatim željezom i humusom, čija je mineralizacija vrlo niska. Nadalje, u područjima sa velikom količinom oborina, godišnje se može isprati oko 100 kg S ha^{-1}, jer je sulfatni anion lako pokretljiv.

Vukadinović i Vukadinović (2011.) objašnjavaju da najviše potrebe za sumporom izražavaju kulture kupusa, luka i cvjetače (45 kg S ha^{-1}). Biljke usvajaju sumpor kao anion SO_4^{2-}, a on se u tom obliku kao mineralna rezerva, nalazi u protoplazmi biljaka. Prilikom ugradnje u organsku tvar, potrebna je redukcija sumpora no njegov

mehanizam usvajanja još nije u cijelosti razjašnjen. Usvajanje sumpora počinje vezanjem SO_4^{2-} na pirifosforilnu grupu ATP-a, odnosno uz pomoć sulfattransferaze i formiranjem APS (adenozin-fosforilsulfat) uz pomoć enzima ATP-sulforilaze. Sumpor se usvaja u obliku tog kompleksa, te se kao aktivna molekula (PAP = fosfoadenazinfosfat), reducira u biljci do –SH skupine koju prihvaća acetilserin, a za novo unošenje sulfatnog aniona, kompleks prenositelj–SH se mora regenerirati. Cistein je primarni proizvod kod usvajanja sumpora, zbog toga što se acetilserin raspada na cistein i octenu kiselinu. Olakšanom difuzijom se također može vršiti usvajanje sumpora, i to u obliku kompleksa sa permeazama, koje se nalaze u plazmalemi i njezinoj površini. Sumpor ima važnu fiziološku ulogu, jer je on sastavni dio mnogih organskih spojeva. Vukadinović i Vukadinović (2011.) navode kako S gradi estere sumporne kiseline ($R\text{-}SO_3H$) u biljkama, neophodne za sintezu cisteinske kiseline. Sumpor sadrže vitamini biotin (vitamin H), tiamin (vitamin B_1), te razni antibiotici. Sumpor također sudjeluje u građi raznih enzima (proteaze, ureaze i dr.), sekundarnih biljnih tvari (glikozidi i senfna ulja). On sudjeluje u oksido-redukcijskim procesima, održava ionsku ravnotežu u protoplazmi, te biljkama osigurava određenu otpornost prema suši i niskim temperaturama.

1.2.1. Sumporovodik (H_2S)

U normalnim uvjetima sumporovodik je plin gotovo isto tako otrovan kao i cijanovodik, a četiri puta je otrovniji od ugljik-monoksida. Značajnije količine sumpora dobivaju se oksidacijom H_2S. Može se reći da je od svih sulfida najznačajniji sumporovodik, koji se otapa u vodi te nastaje sulfidna kiselina koja je kisele pH reakcije (Filipović i Lipanović, 1995.). Do nedavno se ovaj plin smatrao fitotksinom, međutim, dokazano je da ima vrlo važnu ulogu biljnim stanicama. U uvjetima biotskog i abiotskog stresa, uloga sumporovodika (H_2S) ima veliku značajnost. Mlado lišće i mlade biljke sadrže više koncentracije sumporovodika od starijih. Wang (2012.), Rennenberg i sur. (1983.) navode kako je u životnom ciklusu biljaka H_2S važan makronutrijent, jer utječe na vigor sjemena, rast biljaka, prinos usjeva, itd. Poboljšana organogeneza korijena i klijavost sjemena egzogenom aplikacijom sumporovodika je zabilježena kod nekoliko biljnih vrsta. Dokazano je i da fumigacija sumporovodikom također povećava toleranciju na smrzavanje izdanaka te štiti biljku od osmotskog stresa.

1.3. Cilj istraživanja

1. Utvrditi utjecaj primiranja sjemena s otopinama NaHS (donorom H_2S) rastućih koncentracija na pokazatelje vigora sjemena, energiju klijanja, standardnu klijavost te ukupnu masu klijanaca kod suncokreta sorte Luka, naklijavanih na više razina osmotskog stresa.

2. Utvrditi na koje molekularne pokazatelje stresa primiranje sjemena s otopinama NaHS značajno utječe.

3. Utvrditi da li postoje razlike u pokazateljima vigora sjemena i molekularnim pokazateljima stresa s obzirom na razinu osmotskog stresa pri naklijavanju.

4. Utvrditi da li postoje razlike u pokazateljima vigora sjemena i molekularnim pokazateljima stresa s obzirom na koncentraciju otopine NaHS pri određenoj razini osmotskog stresa.

5. Utvrditi koja koncentracija otopine NaHS korištena u primiranju sjemena pozitivno djeluje na smanjenje štetnog efekta osmotskog stresa.

Osnovna hipoteza istraživanja je da H_2S značajno utječe na ukupnu klijavost, energiju klijanja i mase klijanaca suncokreta naklijavanog na više razina osmotskog stresa. Analize pokazatelja rasta (energija klijanja, standardna klijavost, mase klijanaca) također bi trebale dati odgovor na pitanje da li tretman sjemena donorom H_2S može povećati vigor sjemena u uvjetima osmotskog stresa. Nadalje, analize sadržaja slobodnog prolina, inteziteta lipidne peroksidacije, te vodikovog peroksida u hipokotilima bi trebale dati uvid u koje se mehanizme zaštite od oksidativnog stresa uključuje H_2S kao stanična signalna molekula.

2. PREGLED LITERATURE

Biljke su najčešće, tijekom svog životnog ciklusa izložene djelovanju različitih utjecaja vanjske sredine, koju obilježava veći broj čimbenika kao što su temperatura, vlažnost zraka i zemljišta, magnetizam, prirodna radioaktivnost, itd. Dubravec i Regula (1995.) objašnjavaju da se na određen način, čimbenici vanjske sredine odražavaju na stupanj inteziteta, oblikovanja i manifestacije nasljednih potencijala. Na pojedine utjecaje vanjske sredine biljke reagiraju nejednakim intezitetom. One posjeduju određenu otpornost prema okolišnim čimbenicima, a svaka otpornost ima kompleksno značenje. Na intezitet njezinog podnošenja, s jedne strane utječu biološka svojstva biljke, a s druge niz faktora koji su djelovali u određenom momentu tijekom životnog procesa biljke.

Otpornost prema suši je svojevrsna osobina biljaka da podnose visoke temperature i nedostatak vode. Nedostatak vode može se pojaviti u tlu ali i zraku. Otpornost biljaka prema suši ovisi o njihovim morfološkim, anatomskim i fiziološkim svojstvima, odnosno o sposobnosti prilagodbe u takvim uvjetima. Otpornost na sušu ima dinamički značaj koji se razvija kao proces tijekom ontogeneze. Veliki značaj također imaju koloidno-kemijska svojstva protoplazme: elastičnost, viskozitet, količina vezane vode, itd. Sumporovodik se pokazao djelotvornim kod otpornosti biljaka na stres uzrokovan sušom (Dubravec i Regula, 1995.). To potvrđuju Jin i sur. (2011.), te navode da se u takvim uvjetima povećava produkcija endogenog H_2S, koja se nakon dodatka vode smanjuje.

Shan i sur. (2011.) navode da u usporedbi s ne tretiranim biljkama, predtretman s H_2S je smanjio sadržaj malondialdehida (MDA), kao produkta lipidne peroksidacije i gubitak elektrolita uzrokovanim nedostatkom vode kod biljaka pšenice (*Triticum aestivum* L.). Oštećenje pa i samo uginuće biljaka može biti različito pod utjecajem suše. Naime, kod nedostatka vode dolazi do hidrolize bjelančevina i mijenja se koloidno svojstvo protoplazme. Nadalje, dolazi do izmjene prometa ugljikohidrata i bjelančevina, te se mijenja aktivnost oksidacijskih enzima. Kod povećanja suše fosforilacija šećera se usporava pa dolazi do smanjenja sadržaja fosforno-organskih spojeva. Smanjenje ATP-a ukazuje na slabiju akumulaciju i transformaciju energije, te dolazi do porasta sadržaja šećera. Kod dužeg trajanja suše bjelančevine se hidroliziraju, a prijenos asimilata je vrlo usporen. Također, utjecaj suše se može dovesti i do

pojačane transpiracije biljaka, što dovodi do nesklada između usvajanja i gubitka vode, čiji je rezultat poremećaj prometa tvari (Dubravec i Regula, 1995.).

Sumporovodik u biljci ima zadaću signalne molekule. Prema Hancock i sur. (2011.) postoji nekoliko reaktivnih spojeva za koje se smatra da sudjeluju u staničnoj signalizaciji. U takve spojeve spadaju reaktivne kisikove jedinke (ROS), kao što su vodik peroksid, superoksidni radikal, hidroksilni radikal itd., te reaktivne dušikove jedinke (RNS) kao što su dušik oksid radikal, peroksinitrit itd. Donedavno se smatralo da je H_2S fitotoksičan, no danas većina dokaza ukazuje na činjenicu da H_2S također može imati signalnu ulogu i da po funkciji koju obavlja u stanici treba biti rangiran uz RNS i ROS. Pri visokim koncentracijama sumporovodik inhibira enzime poput citokrom c oksidaze, no pri nižim koncentracijama djeluje na pozitivan način. Postoji nekoliko kriterija prema kojima se ROS i RNS ocjenjuju kao signalizacijske komponente. Signalizacijske molekule moraju se proizvoditi u slučaju potrebe, te se kretati prema mjestu djelovanja, gdje će biti prepoznate i nakon toga izazvati stanične odgovore. Signalne molekule često tvore mrežu unakrsnog provođenja signala, pa iz tog razloga postoje fiziološki putevi koji uklanjaju signalne molekule nakon prestanka potrebe za njihovim djelovanjem.

Lisjak i sur. (2012.) su istraživali utjecaj donora H_2S na pojedine fiziološke procese i njegovo signalno djelovanje u interakciji s NO signalnim putevima na dvije kulture: *Arabidopsis thaliana* L. i *Capsicum annuum* L. Istraživani su utjecaji na mehanizme regulacije rada puči te utjecaj na antioksidativnu aktivnost u uvjetima solnog stresa. U istraživanjima su korištena dva donora različite brzine otpuštanja H_2S, NaHS (brzo otpuštajući donor) i GYY4137 (sporo otpuštajući donor). Zaključeno je da oba korištena donora inhibiraju zatvaranje puči regulirano ABA signalnim putevima. Dokazano je i da H_2S smanjuje akumulaciju NO koji utječe na zatvaranje puči. Različito djelovanje donora NO i H_2S, dokazano je kod reakcije biljaka na solni stres, pa je uslijed toga utvrđena pojačana antioksidativna aktivnost u listu biljaka tretiranih sa NaHS, koja je bila veća nego pri tretmanima s sporootpuštajućim donorom GYY4137.

Lee i sur. (2011.) u svom istraživanju navode da sintetizirani donor H_2S, GYY4137, pokazuje produženo djelovanje otpuštanja sumporovodika, te njegova razgradnja može trajati i do 7 dana, dok podudarna molekula bez sumpora ne pokazuje nikakvo biološko

djelovanje. Zbog svog kemijskog svojstva, donor NaHS otpušta dvostruko višu koncentraciju H_2S od GYY4137 i djeluje tek unutar jednog sata kada je sav H_2S otpušten i supstrat potrošen.

Prema Fu i sur. (2013.) sumporovodik je važna signalna molekula koja je uključena u nekoliko procesa otpornosti biljaka od sušnog stresa i stresa izazvanog teškim metalima, no malo su poznate uloge H_2S u odgovorima na stres koji je izazvan niskim temperaturama. U ovom istraživanju dokazano je da se razina H_2S povećala zbog stresa uvjetovanog niskim temperaturama. Također je došlo do povećanja aktivnosti H_2S sintetaze (L-/D-cistein desulfohidraza, L/DCD), te do povećanja ekspresije L/DCD gena kod *Vitis vinifera* L. Kako bi se utvrdio utjecaj egzogenog H_2S na biljke, sadnice su bile tretirane sa NaHS i hipotaurinom (HT-sakupljač H_2S) na 4 °C. Rezultati su pokazali visoku aktivnost superoksid dismutaze, pojačanu ekspresiju VvICE1 i VvCBF3 gena, te nisku razinu superoksid radikala, niski sadržaj malondialdehida (MDA) i slabiju propusnost stanične membrane. Nasuprot tome, zbog navedenog stresa tretman HT prikazuje suprotno djelovanje. S obzirom na ove rezultate, postoji vjerovatnost izravne uključenosti H_2S u provođenju signala kod ovakvog tipa stresa.

Evolucija aerobnih metaboličkih procesa, kao što su disanje i fotosinteza, dovela je posljedično do pojačanog stvaranja reaktivnih kiskovih jedinki (ROS) u mitohondrijima, kloroplastima i peroksidazama. Pojačana akumulacija ROS može oksidativno oštetiti proteine, DNA i lipide. Međutim, brojna istraživanja potvrđuju da ROS funkcioniraju kao signalne molekule u biljkama te su uključene u regulaciju razvoja i odgovora na obranu od patogena (Apel i sur., 2004.).

Kada fiziološki putevi u biljci između organela nisu usklađeni, elektroni visoke energije ioniziraju elementarni kisik (O_2) tvoreći reaktivne kisikove jedinke (ROS) kao što su singletni kisik ($^1O_2$), vodik peroksid (H_2O_2), superoksid ($\bullet O_2^-$) i hidroksil radikal ($\bullet$OH). U uvjetima stresa, njihova količina u biljci se značajno povećava. Proizvodnja ROS u kloroplastima javlja se uslijed nemogućnosti usvajanja CO_2, a to dovodi do pojačanih reduktivnih uvjeta zbog curenja elektrona iz elektronskog transportnog lanca. U uvjetima stresa u mitohondrijima također dolazi do istog. Procesom fotorespiracije stvara se H_2O_2 u peroksizomima zbog oksidacije glikolata. Također, vrlo su važni sustavi detoksikaciju od ROS različitim antioksidansima za kao što su: askorbinska kiselina (AsA), glutation (GSH) i ROS sakupljački enzimi poput superoksid dismutaze

(SOD), askrobat peroksidaze (APX), katalaze (CAT), glutation peroksidaze (GPX), glutation reduktaze (GR), gvajakol peroksidaze (GPOD) i peroksiredoksina (PrXR) (Miller, 2010.).

Pozitivan učinak osmoprimiranja dovodi do staničnih, substaničnih i molekularnih promjena u sjemenu i do povećanja vigora sjemena tijekom klijanja te je usko povezan s učincima blagog abiotskog stresa (nedostatka vode, izazvanog stresa zbog visokih i niskih temperatura, saliniteta). Osmoprimiranje je tehnika tretiranja sjemena kojom se djelomično ili u potpunosti, sjeme hidrira s vodom ili različitim osmotskim solima poput $CaCl_2$, $CaSO_4$, NaCl, kroz određeno vrijeme nakon čega se suši prije izbijanja radikule i same sjetve (McDonald, 2000.).

Kaya i sur. (2006.) su istraživali utjecaj predsjetvenih tretmana sjemena suncokreta (*Helianthus annuus* L.). te utvrđivali čimbenike odgovorne za prerano klijanje i rast sadnica zbog visoke zaslanjenosti ili osmotskog stresa. Sjeme primirano destiliranom vodom odnosno otopinom KNO_3, se ocjenjivalo na toleranciju u uvjetima povećanog prisustva soli (NaCl) i na osmotski stres (PEG). Rezultati su pokazali da je klijanje sjemena kasnilo u obje varijante stresa su utvrđene razlike između pojedinih tretmana. Klijavost, korijen i duljina izdanka bili su veći, ali prosječno vrijeme klijavosti i postotak nenormalnih klijanaca, su bili niži na NaCl nego na PEG istog osmotskog potencijala. Klijavost sjemena je zadržana pri svim koncentracijama NaCl, ali ne i na -1,2 MPa otopine PEG. Zaključeno je da je inhibicija klijanja istim potencijalom otopina NaCl i PEG izazvana više osmotskim učinkom otopine nego toksičnošću soli.

Prema Wang (2011.), H_2S potiče klijanje i ublažava stanična oštećenja u uvjetima solnog stresa. Autor u svom istraživanju navodi kako se povećava ukupna enzimatska aktivnosti i razina transkripata za pojedine antioksidacijske enzime, uključujući i superoksid dismutazu (SOD), katalazu (CAT), gvajakol peroksidazu (POD), te askrobat peroksidazu, što rezultira ublažavanjem oksidativnog oštećenja. Rezultati ovog istraživanja pokazuju da 100 μM otopine NaHS i SNP (natrijev nitroprusid, NO donor), značajno umanjuju inhibiciju klijanja sjemena lucerne (*Medicago sativa*), a kasnije i inhibiciju rasta sadnica pri solnom stresu od 100 mM NaCl. Autor također navodi da je zaštitna uloga NaHS možda povezana s induciranjem endogenog NO.

Lipidna peroksidacija je glavni molekularni mehanizam uključen u oksidativna oštećenja staničnih struktura i u toksične procese koji dovode do stanične smrti. Smatra

se da je ona posljedica toksičnosti i reaktivnosti metabolita koji se proizvode u različitih fizioloških procesima. Lipidna peroksidacija je složen proces koji se javlja u biljkama i životinjama. To uključuje stvaranje i širenje lipidnih radikala, unos kisika, premještanje dvostrukih veza u nezasićenim lipidima, te eventualno uništavanje membranskih lipida uz proizvodnju raznih produkata razgradnje, uključujući alkohole, ketone, aldehide, alkane i estere (Repetto i sur., 2012.; Dianzani i Barerra, 2008.).

Bor, i sur. (2003.) su istraživali promjene u lipidnoj peroksidaciji, te moguću ulogu antioksidativnog sustava u toleranciji na solni stres kod kultivirane vrste repe (cv.) *Beta vulgaris* cv. *ansa* i na njezinoj divljoj podvrsti *Beta vulgaris* subsp. *maritima* L. *Arcang*., koja je relativno tolerantna na solni stres. Sadnice repe stare 40 dana, su bile 12 dana izložene solnom stresu na 0, 150 i 500 mM NaCl. Kod *Beta vulgaris* subsp. *maritima* L. *Arcang.*, razina lipidne peroksidacije je bila niža te su aktivnosti superoksid dismutaze (SOD), peroksidaze (POX), askorbat peroksidaze (APOX), katalaze (CAT) i glutation reduktaze (GR) bile svojstveno više nego kod *Beta vulgaris* cv. *ansa*. U usporedbi s tom kultiviranom vrstom, lipidna peroksidacija je također bila niža, a SOD, POX, APOX, CAT i GR aktivnosti opet su bile više kod *Beta maritima* L. na 150 i 500 mM NaCl. Ovi rezultati ukazuju na mogućnost da divlje sorte repe, tolerantne na zaslanjenost imaju bolji mehanizam zaštite od oksidativnog oštećenja, održavajući višu nasljednu i induciranu aktivnost antioksidativnih enzima.

Nadalje, u posljednje vrijeme posebna pozornost daje se biljkama koje su se suočile s ekstremnim uvjetima na prirodnom staništu, jer većina njihovih mehanizama za toleranciju, mogli bi biti važan alat u genetskom inženjeringu biljaka tolerantnih na stres (Asada, 1992.).

Yars i sur. (2008.) su istraživali različite promjene inducirane solnim stresom u antioksidativnim enzimima poput katalaze (CAT), askrobat peroksidaze (APX) i glutation reduktaze (GR), te ukupni sadržaj klorofila, lipidne peroksidacije kao i sadržaj malondialdehida u listovima zelenog graha (*Phaseolus vulgaris* L.). Istraživanje se provodilo na genotipu Gevas sirsk 57 (GS57) i na kultiviranoj sorti Fransiz 4F-89. Biljke su bile podvrgnute trima razinama soli (0, 50 i 100 mM NaCl) u kontroliranim klimatskim uvjetima, u trajanju od 7 dana. Kultivirana sorta 4F-89 (osjetljiva na sol) pokazala je pad aktivnosti glutation reduktaze (GR) na svim razinama solnog stresa, dok je genotip GS57 (tolerantan) pokazao slabi pad GR na 50

mM NaCl, ali i povećanje na 100 mM NaCl. Uslijed povećanja solnog stresa, aktivnosti katalaze (CAT) i askrobat peroksidaze (APX) su se povećale u obje sorte. Aktivnosti CAT i APX su bile više kod tolerantnte sorte (GS57) u usporedbi s ne tolerantnom (F4-89). U obje sorte je također došlo do povećanja koncentracije malondialdehida (MDA) uslijed povećanja saliniteta, s višim razinama kod F4-89. Povišena koncentracija NaCl izazvala je smanjen sadržaj klorofila u kultiviranoj sorti F4-89, ali ne i u GS57.

Prolin se akumulira u mnogim biljnim vrstama, također kao odgovor na okolišni stres. Prolin može djelovati kao signalna molekula za modeliranje mitohondrijskih funkcija, utječe na poliferaciju stanica, smrt stanica, te potiče određenu genetsku ekspresiju koja može biti neophodna za oporavak biljaka od stresa. Pretpostavlja se da pojačana akumulacija slobodnog prolina može povećati toleranciju na okolišni stres (Szabados i sur., 2010.).

Kheder (2003.) objašnjava ulogu signalizacije prolina u uvjetima solnoga stresa na biljci *Pancratium maritimum* L. (morski narcis). Solni stres je rezultirao smanjenjem rasta i sadržaja proteina, osobito pri 300 mM NaCl, što dovodi do povećane akumulacije slobodnog prolina. U lišću, ubikvitin locira oštećene proteine uzrokovane solnim stresom za degradaciju putem proteosoma. Takva promjena je također pod utjecajem prolina, čak i u lišću koje nije bilo izloženu stresu. Solni stres, naročito u korijenu, je rezultirao smanjenjem ubikvitinskih konjuganata, no taj učinak je bio poništen dodavanjem egzogenog prolina. U uvjetima jakog stresa dolazi do inhibicije rada antioksidativnih enzima katalaze i peroksidaze, međutim, prolin značajno potpomaže u održavanju njihove aktivnosti. Autor zaključuje da prolin poboljšava toleranciju *Pancratium maritimum* L., štiteći molekularni sustav odgovoran za razgradnju proteina te povećavajući ekspresiju gena odgovornih za sintezu zaštitnih proteina u uvjetima solnog stresa.

Vodik peroksid (H_2O_2) je svestrana molekula koja može biti uključena u nekoliko staničnih procesa i u stresnim i u normalnim uvjetima (Quan i sur., 2008.). Vodik peroksid se proizvodi i akumulira u uvjetima stresa te povećane koncentracije u stanici također mogu izazvati oksidativni stres u biljkama. Dokazano je da H_2O_2 isto djeluje kao signalna molekula pa je kontrola njegove koncentracije kritična za homeostazu stanica (Hernandez i sur., 2001.).

Hernandez i sur., (2009.) su istraživali različite uloge vodik peroksida i antioksidativne mehanizme u uvjetima duljeg i kraćeg razdoblja solnoga stresa, kod biljaka kupusa (*Brassica oleracea* L.). Analizirane su zona elongacije i diferencijacije te potpuno diferencirana zona korijena, zbog preciznijeg razumijevanja utjecaja solnog stresa na korijen. Pri najvišoj razini soli (80 mM NaCl), akumulacija vodik peroksida zabilježena je u obje zone korijena. Na subcelularnoj razini, mitohondriji su proizveli više H_2O_2 kod biljaka tretiranih sa NaCl. Također je došlo do drastičnog smanjenja antioksidativne aktivnosti kod kratkog trajanja solnog stresa, no proporcionalno s dužinom trajanja stresa rasla je aktivnost katalaze i peroksidaze. Askorbat je progresivno akumuliran i zadržao je redoks status, dok se akumulacija glutationa u prva 24 sata, pri tretmanu sa NaCl naglo povećala, no njegova koncentracija i redoks status su nakon toga naglo. Zaključeno je da je pojačana akumulacija askorbata i zadržavanje njegovog redoks stanja ključna za rast i razvoj korijena kupusa u uvjetima stresa.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Postavljanje pokusa

Sjeme suncokreta (*Helianthus annuus* L.) sorte *"Luka"* (proizvođač: Poljoprivredni institut Osijek) je prije naklijavanja imbibirano u otopinama donora sumporovodika, NaHS (natrij hidrogen sulfid). Po 850 sjemenki je odbrojeno u staklenke s poklopcem te imbibirano u 500 mL otopine NaHS koncentracija od: 100 μM, 500 μM, 1000 μM i 1500 μM. Sjeme je imbibirano u navedenim otopinama 2 sata, nakon čega je osušeno na filter papiru pri sobnoj temperaturi narednih 36 sati.

Po 4 filter papira su navlažena s 250 mL vode, odnosno otopina PEG-6000 u koncentracijama od 2,5 %, 5 % i 10 %, osmotskog potencijala -0,19 MPa, -0,499 MPa, -1,483, MPa**,** ovisno o varijanti tretmana. 50 sjemenki po ponavljanju je naklijavano po metodi između filter papira te je pokus postavljen u 4 ponavljanja.

Navlaženi filter papiri su nakon postavljanja sjemenki smotani u tuljke, prebačeni u najlonske vrećice te zatvoreni zbog sprječavanja gubitka vlage. Pet dana prije naklijavanja sjeme je inkubirano pri temperaturi od 7 °C, prema ISTA metodi (ISTA rules 2015.). Nakon toga sjeme je postavljeno na naklijavanje u klimatiziranu prostoriju pri temperaturi od 30 °C uz osvjetljenje od 8 sati odnosno pri 20 °C u mraku (16 sati).

3.2. Određivanje energije klijanja i standardne klijavosti

Četvrti dan od dana postavljanja pokusa je izbrojano isklijalo sjeme, te je iz tih podataka izračunata energija klijanja (EK) u postotcima, u odnosu prema ukupnom broju sjemenki postavljenih na naklijavanje za svaki primijenjeni tretman. Deseti dan od dana postavljanja pokusa prebrojavanjem isklijanih, zdravih i normalno razvijenih klijanaca (*Slika 3*) utvrđena je standardna klijavost (SK) u postotcima prema ukupnom broju sjemenki postavljenih na naklijavanje za svaki primijenjeni tretman.

3.3. Određivanje mase klijanaca

Nakon određivanja SK, izvagane su ukupne mase klijanaca, nakon čega su od klijanaca odvojeni hipokotili te pohranjeni na -80 °C. Na dan analize, tkivo hipokotila je izmacerirano tekućim dušikom u tarioniku do finog praha, te su odvagane adekvatne mase macerata biljnog tkiva za pojedinu analizu na vagi s četiri decimale.

Sve molekularne analize obuhvaćale su spektrofotometrijsko određivanje koncentracije određenih metabolita. Mjerenja su obavljena na aparatu Varian Cary 50 UV-VIS Spectrophotometer uz programsku podršku Cary WinUV software (Varian Inc.).



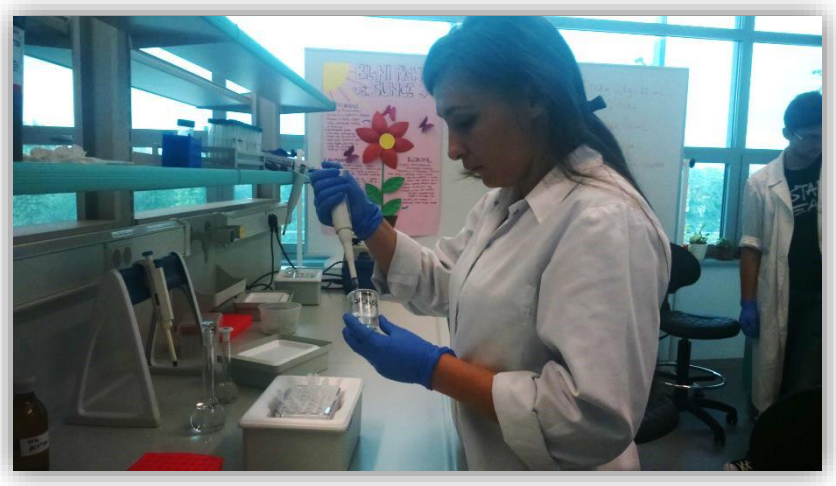
Slika 3. Klijanci suncokreta sorte „*Luka"* stari osam dana
Foto: Andreja Serini

3.3.1. Određivanje sadržaja vodikovog peroksida

Posrednim mjerenjem koncentracije titanovog peroksida koji se taloži kada se ekstaktru tkiva doda titanov oksisulfat u sulfatnoj kiselini i otopina amonijevog hidroksida, određena je koncentacija vodikovog peroksida (Mukherjee i Choudhouri, 1983.).

Tkivo za analizu je pripremljeno u tekućem dušiku maceracijom do finog praha i odvagano 0,2 g po uzorku u Epppendorf epruvete od 2 mL. Uzorcima je dodano po 1 ml 80 %-tnog hladnog acetona. Za slijepu probu, u posebnu epruvetu također je dodan 1 mL hladnog acetona, bez tkiva. Na vrtložnoj treskalici uzorci su dobro homogenizirani te stavljeni na centrifugiranje 3 minute na 1000 RCF pri temperaturi od 4 °C. U drugu epruvetu od 2 mL odvojen je supernatant i dodano je 0,4 mL titan-sulfata i 0,5 mL amonijevog hidroksida. Dodavanje kemikalije je obavljeno u hladnom bloku na -20 °C. Uzorci su dobro promješani na vrtložnoj treskalici i zbog taloženja centrifugirani 10 minuta na 15000 RCF pri 4 °C. Supernatant je dekantiran, a talog otopljen dodavanjem 1 mL 2M sulfatne kiseline (*Slika 4*). Uzorci su promješani na vrtložnoj treskalici do izbistrivanja otopine te su ponovno centrifugirani 10 minuta na 15000 RCF pri temperaturi od 4 °C. Nakon zadnjeg centrifugiranja, bistri dio je mikropipetom prebačen u kivetu sa suženim dnom za spektrofotometar te je izmjerena apsorbanca na 415 nm. Slijepom probom je određena

nula, a koncentracija vodikovog peroksida (HP) je izračunata koristeći ekstincijski koeficijent 1,878 mM cm^{-1}, a konačni rezultati izraženi u nM HP g^{-1} Sv.T..



Slika 4. Otapanje supernatanta s 2M H_2SO_4 kod određivanja sadržaja vodikovog peroksida
Foto: Andreja Serini

3.3.2. Određivanje intenziteta lipidne peroksidacije

Određujući u uzorku specifične produkte raspadanja lipida koji reagiraju sa tiobarbiturnom kiselinom (TBARS) mjeri se lipidna peroksidacija, prema metodi Heath i Packer (1968.) uz neke izmjene.

U Epppendorf epruvete od 2 mL, odvagano je po 0,2 g macerata tkiva hipokotila. Uzorcima je dodano po 0,1 mL 0,1 %-tnog TCA (trikloroctena kiselina) pripremljene otapanjem u destiliranoj vodi. Nakon toga uzorci su centrifugirani 5 minuta na 6000 RCF na temperaturi od 4 °C. Supernatant je odvojen u epruvetu sa čepom na navoj od 1,5 mL i uzorcima je dodano po 0,5 mL 0,5 %-tne tiobarbiturne kiseline (TBA) u 20 %-tnoj TCA, koja je ranije pripremljena u omjeru 1:2 u destiliranoj vodi. Slijepa proba je pripremljena od 1,5 mL 0,5 % TBA u 20 % TCA. Uzorci su dobro promješani na vrtložnoj treskalici (*Slika 5*), nakon čega su stavljeni u vodenu kupelj pri temperaturi od 95 °C u vremenu od 30 minuta, bez miješanja. Potapanjem u hladnu vodu na 15 minuta, uzorci su ohlađeni i centrifugirani 15 minuta na 18000 RCF pri 4 °C. Nakon toga uzorci su presipani u kivetu sa suženim dnom te je provedeno mjerenje apsorbance. Slijepom probom je određena nula i mjerena je specifična i nespecifična apsorbanca na 532 i 600 nm, a krajnji rezultat predstavlja njihovu razliku. Koncentracija produkata lipidne peroksidacije (TBARS) izračunata je pomoću ekstincijskog faktora 155 mM cm^{-1} i izražena u nM g^{-1} Sv.T.



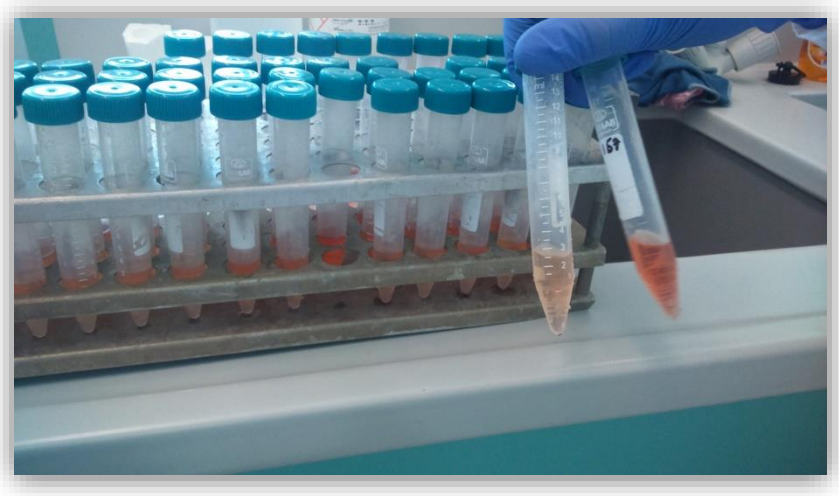
Slika 5. Određivanje intenziteta lipidne peroksidacije

Foto: Andreja Serini

3.3.3. Određivanje sadržaja slobodnog prolina

U hipokotilu klijanaca suncokreta, koncentracija slobodnog prolina određena je metodom prema Bates i sur. (1973.).

Za određivanje sadržaja prolina (PRO) odvagano je po 0,25 g macerata u plastične epruvete od 15 mL. Uzorcima je dodano po 5 mL 3 % sulfosalicilne kiseline te su uzorci dobro promješani na vrtložnoj trekalici i centrifugirani 15 minuta na 4000 RCF. Nakon toga odpipetiran je po 1 mL filtrata (supernatanta) te je takvom dijelu uzorka dodano po 1 mL kiselog ninhidrin reagensa i 1 mL ledene octene kiseline. Uzorci su ponovno promješani na vrtložnoj treskalici i inkubirani 1h na 100 °C u vodenoj kupelji. Nakon inkubacije (*Slika 6*), reakcija je prekinuta prenošenjem uzoraka na hladni blok. Prolin je ekstrahiran sa po 4 mL toluena uz snažno miješanje 15-20 sekundi na vrtložnoj treskalici. Nakon što su se epruvete zagrijale na sobnu temperaturu, ekstrahirani prolin zajedno sa toluenskim slojem izdvojen je na površinu nakon čega je prebačen automatskom pipetom u kivetu za spektrofotometar. Čistim toluenom je podešena nula, a za stupnjeve transmisije pripremljeni su standardi točno poznatih koncentracija prolina. Za pripremu standarda pripremljen je osnovni standard koncentracije 20 µg mL^{-1} od kojeg su pripremljena razrjeđenja s koncentracijama 0, 1, 2, 4, 8, 10, 12, 16 i 20 µg PRO mL^{-1}. Standard 0 predstavljao je 100 %-tnu transmisiju. Mjerenja su obavljena na 520 nm te je pomoću navedenih standarda izrađena standardna krivulja iz koje je dobivena funkcija za izračun količine prolina prema podacima o apsorbanci uzoraka. Konačan sadržaj slobodnog prolina u biljnom tkivu je izražen u µg g^{-1} svježe mase biljnog tkiva (Sv.T.).



Slika 6. Inkubirani i ohlađeni uzorci kod utvrđivanja sadržaja slobodnog prolina
Foto: Andreja Serini

3.4. Obrada podataka

Istraživanje je provedeno kao dvofaktorijelni pokus u četiri ponavljanja sa po 50 klijanaca po ponavljanju.

Svi utvrđeni rezultati su analizirani uobičajenim metodama statističke obrade podataka pomoću SAS Software 9.1.3, programske podrške (2002.-2003., SAS Institute Inc., Cary, USA) i Microsoft Office Excell 2010. Korištene su slijedeće statističke metode: analiza varijance (ANOVA), statistički testovi značajnosti utjecaja primijenjenih tretmana – F test i Fisher's LSD test (eng. Least Significant Difference).

4. REZULTATI

Prema F testu, u prosjeku za sve razine osmotskog stresa u klijanju, osmoprimiranje sjemena s NaHS je značajno utjecalo na sve ispitivane parametre vigora sjemena, energiju klijanja (*P*=0,0010), standardnu klijavost (*P*=0,0012), broj ne isklijanih sjemenki (*P*=0,0393), broj mrtvih sjemenki (*P*=0,0084) te na ukupnu masu klijanaca (*P*<0,0001) (*Tablica 3*).

Tablica 3. Značajnost utjecaja osmoprimiranja sjemena s rastućim koncentracijama NaHS (Bez primiranja; H_2O; 100 µM NaHS; 500 µM NaHS; 1000 µM NaHS; 1500 µM NaHS) i više razina osmotskog stresa u klijanju (H_2O; 2,5 % PEG; 5 % PEG; 10 % PEG) te njihovih interakcija na energiju klijanja (EK), standardnu klijavost (SK), broj ne isklijanih sjemenki (NI), broj mrtvih sjemenki (MS) (%) i masu klijanaca (mK) (g).

FAKTOR	VARIJANTA	EK (%)	SK (%)	NI (%)	MS (%)	mK (g)
Osmoprimiranje	Bez primiranja	70^{BC}	78^{BC}	14^{AB}	9^{A}	$17,93^{B}$
	H_2O	65^{C}	75^{C}	16^{A}	9^{A}	$16,22^{C}$
	100 µM NaHS	72^{AB}	83^{AB}	10^{BC}	7^{AB}	$18,50^{B}$
	500 µM NaHS	74^{AB}	87^{A}	8^{C}	5^{B}	$20,38^{A}$
	1000 µM NaHS	75^{AB}	81^{AB}	12^{C}	8^{AB}	$17,17^{BC}$
	1500 µM NaHS	76^{A}	85^{A}	10^{BC}	5^{B}	$18,25^{B}$
	F test	4,63	4,53	2,48	3,38	8,00
	P	**0,0010**	**0,0012**	**0,0393**	**0,0084**	**<0,0001**
Stres u klijanju	H_2O	79^{A}	84^{A}	10	6^{B}	$25,07^{A}$
	2,5 % PEG	75^{A}	81^{AB}	13	6^{B}	$18,58^{B}$
	5 % PEG	76^{A}	83^{A}	10	7^{B}	$16,81^{C}$
	10 % PEG	58^{B}	77^{B}	12	10^{A}	$11,84^{D}$
	F test	30,25	2,94	1,30	4,47	182,68
	P	**<0,0001**	**0,0388**	0,2805	**0,0062**	**<0,0001**
Osmoprimiranje x Stres u klijanju	F test	1,36	1,01	1,16	1,06	2,37
	P	0,1888	0,4557	0,3207	0,4118	**0,0080**

*Podaci su prosjek četiri ponavljanja; ANOVA, F test; prosjeci označeni različitim slovom se razlikuju prema LSD testu (^{A,B,C}; *P*=0,05).

LSD testom su utvrđene značajne razlike između pojedinih varijanti osmoprimiranja sjemena te je sjeme osmoprimirano vodom imalo značajno najniži postotak energije klijanja (65 %) i standardne klijavosti (75 %) koji se nije značajno razlikovao od varijante bez primiranja (EK 70 %; SK 78 %). Također, pri ove dvije varijante je utvrđen i najveći postotak ne isklijanih sjemenki (H_2O 16 %; bez primiranja 14 %) te mrtvog sjemena (9 %). Osmoprimiranje sjemena s rastućim koncentracijama NaHS je rezultiralo proporcionalnim povećanjem energije klijanja koja se kretala od 72 (100 µM NaHS) do 76 % (1500 µM NaHS) te se utvrđene vrijednosti pri različitim koncentracijama primijenjenog donora H_2S

nisu međusobno statistički značajno razlikovale. Veće vrijednosti standardne klijavosti su također utvrđene pri tretmanima s NaHS s time da se standardna klijavost pri 100 i 1000 μM NaHS nije značajno razlikovala od one utvrđene kod ne primiranog sjemena. Tretman s 500 μM NaHS rezultirao je najvećom standardnom klijavošću (87 %), najmanjim brojem ne isklijanih sjemenki (8 %), najmanjim postotkom mrtvog sjemena (5 %) te najvećom ukupnom masom klijanaca (20,38 g). Postotak mrtvog sjemena pri prethodno navedenoj varijanti se nije značajno razlikovao od postotka utvrđenog pri tretmanu s najvišom koncentracijom donora H_2S. Značajno najniže mase klijanaca su utvrđene u tretmanima s 1000 μM NaHS (17,17 g) i vodom (16,22 g) te se nisu međusobno statistički značajno razlikovale.

F testom je utvrđen značajni utjecaj osmotskog stresa na sve ispitivane parametre vigora sjemena, osim na postotak ne isklijanih sjemenki (EK $P<0,0001$; SK $P=0,0388$; MS $P=0,0062$; mK $P<0,0001$).

Prema LSD testu, utvrđena energija klijanja pri varijanti naklijavanja voda (79 %) te 2,5 i 5 % PEG (75 i 76 %), energija klijanja se nije statistički značajno razlikovala. U varijanti gdje je sjeme suncokreta naklijavano na 10 % PEG, utvrđen je značajno najniži postotak klijavosti (58 %). Slični su rezultati dobiveni i kod standardne klijavosti gdje se postotak standardne klijavost utvrđen pri 10 % PEG (77 %) nije značajno razlikovao od onog utvrđenog pri 2,5 % PEG (81 %). Najveći postotak mrtvog sjemena utvrđen je očekivano pri 10 % PEG (10 %) dok se utvrđene vrijednosti navedenog parametra pri ostalim tretmanima nisu značajno razlikovale (H_2O 6 %; 2,5 % PEG 6 %; 5 % PEG 7 %). Pad mase klijanaca pratio je povećanje razine osmotskog stresa te su se utvrđene vrijednosti u svim varijantama statistički značajno razlikovale (H_2O 25,07 g; 2,5 % PEG 18,58 g; 5 % PEG 16,81 g; 10 % PEG 11,84 g).

F testom je utvrđena značajnost interakcije osmoprimiranje x stres u klijanju samo za masu klijanaca ($P=0,0080$) dok na ostale ispitivane parametre vigora interakcija ispitivana dva faktora nije značajno utjecala.

U prosjeku za sve razine osmotskog stresa u klijanju, prema F testu, osmoprimiranje sjemena nije statistički značajno utjecalo na razinu lipidne peroksidacije ($P=0,6074$), sadržaj vodikovog peroksida ($P=0,1896$) te na količinu slobodnog prolina ($P=0,0918$) (*Tablica 4*). Prema F testu, osmotski stres u klijanju je značajno utjecao na sve ispitivane pokazatelje stresa (TBARS, HP, PRO $P<0,0001$). Također je utvrđen značajan utjecaj

interakcije osmoprimiranje x stres na razinu lipidne peroksidacije (P<0,0001) i sadržaj vodikovog peroksida (P<0,0001) dok na sadržaj slobodnog prolina interakcija ispitivanih faktora nije značajno utjecala.

Tablica 4. Značajnost utjecaja osmoprimiranja sjemena s rastućim koncentracijama NaHS (Bez primiranja; H_2O; 100 µM NaHS; 500 µM NaHS; 1000 µM NaHS; 1500 µM NaHS) i više razina osmotskog stresa u klijanju (H_2O; 2,5 % PEG; 5 % PEG; 10 % PEG) te njihovih interakcija na razinu lipidne peroksidacije (TBARS), sadržaj vodikovog peroksida (HP) (nmol g^{-1} Sv.T.) i prolina (PRO) (µmol g^{-1} Sv.T.), u hipokotilima klijanaca.

FAKTOR	VARIJANTA	TBARS	HP	PRO
Osmoprimiranje	Bez primiranja	6,775	0,098	2,648
	H_2O	6,940	0,108	2,289
	100 µM NaHS	6,547	0,100	2,156
	500 µM NaHS	6,874	0,096	2,080
	1000 µM NaHS	6,369	0,096	2,134
	1500 µM NaHS	6,569	0,098	2,342
	F test	0,72	1,54	1,98
	P	0,6074	0,1896	0,0918
Stres u klijanju	H_2O	$5,006^{C}$	$0,095^{B}$	$0,544^{D}$
	2,5 % PEG	$4,442^{C}$	$0,094^{B}$	$1,410^{C}$
	5 % PEG	$6,974^{B}$	$0,083^{C}$	$2,496^{B}$
	10 % PEG	$10,293^{A}$	$0,125^{A}$	$4,649^{A}$
	F test	157,38	36,84	216,44
	P	**<0,0001**	**<0,0001**	**<0,0001**
Osmoprimiranje x Stres u klijanju	F test	7,91	10,35	1,79
	P	**<0,0001**	**<0,0001**	0,0527

*Podaci su prosjek četiri ponavljanja; ANOVA, F test; prosjeci označeni različitim slovom se razlikuju prema LSD testu (^{A,B,C}; P=0,05).

LSD testom je utvrđena značajno najviša razina lipidne peroksidacije je utvrđena pri varijanti gdje je sjeme suncokreta naklijavano na 10 % PEG (10,293 nmol g^{-1} Sv.T.). Lipidna peroksidacija utvrđena u tretmanu s 5 % PEG (6,974 nmol g^{-1} Sv.T.) je bila značajno niža od one utvrđene pri 10 % PEG te značajno viša od onih kod kontrole (H_2O 5,006 nmol g^{-1} Sv.T.) i 2,5 % PEG (4,442 nmol g^{-1} Sv.T.), koje se nisu međusobno statistički značajno razlikovale. U varijanti gdje je sjeme suncokreta naklijavano pri 5% PEG je utvrđena značajno najniža koncentracija vodikovog peroksida u hipokotilima klijanaca (0,083 nmol g^{-1} Sv.T.).

Najviše vodikovog peroksida su akumulirale stanice hipokotila kod suncokreta naklijavanog pri 10 % PEG (0,125 nmol g^{-1} Sv.T.). Sadržaj vodikovog peroksida kod kontrole (H_2O 0,095 nmol g^{-1} Sv.T.) i 2,5% PEG (0,094 nmol g^{-1} Sv.T.) se nije statistički

značajno razlikovao. Rast sadržaja slobodnog prolina u hipokotilima je pratio povećanje razine osmotskog stresa u klijanju te su se utvrđene vrijednosti prolina pri svim varijantama značajno razlikovale (H_2O 0,554 μmol g^{-1} Sv.T.; 2,5 % PEG 1,410 μmol g^{-1} Sv.T.; 5 % PEG 2,496 μmol g^{-1} Sv.T.: 10 % PEG 4,649 μmol g^{-1} Sv.T.).

Prema F testu, kod ne primiranog tj. suhog sjemena osmotski stres u klijanju je značajno utjecao samo na masu klijanaca (P<0,0001), dok na ostale ispitivane parametara nije utvrđen statistički značajan utjecaj (*Tablica 5*).

U navedenoj varijanti osmoprimiranja, LSD testom je utvrđena značajno najviša masa klijanaca kod suncokreta naklijavanog na vodi (28,29 g). Mase klijanaca utvrđene pri tretmanima 2,5 % PEG (16,21 g) i 5 % PEG (15,78 g) se nisu značajno razlikovale. Varijanta 10 % PEG je očekivano rezultirala značajno najnižom masom klijanaca (11,45 g) koja se nije značajno razlikovala od mase utvrđene na 5 % PEG.

Prema F testu, kod varijante osmoprimiranja sjemena suncokreta vodom (H_2O), primijenjene varijante osmotskog stresa su značajno utjecale na energiju klijanja (P=0,0060) i masu klijanaca (P=0,0005), dok na standardnu klijavost, postotak ne isklijanih sjemenki i mrtvo sjeme, navedeni faktor nije značajno utjecao.

Prema LSD testu, značajno najnižu energiju klijanja (50 %) je imalo sjeme pri varijanti 10 % PEG, dok se vrijednosti energije klijanja utvrđene pri ostalim varijantama osmotskog stresa i kod kontrole, nisu međusobno značajno razlikovale (H_2O 70 %; 2,5 % PEG 72 %; 5 % PEG 66 %). Pri spomenutoj varijanti osmoprimiranja sjemena pad mase klijanaca pratio je povećanje razine osmotskog stresa te je značajno najniža masa utvrđena pri najvišoj razini stresa (10,59 g), dok se mase utvrđene kod kontrole (21,16 g) i 2,5 % PEG (18,44 g) te 2,5 % PEG i 5 % PEG (14,71 g) nisu međusobno značajno razlikovale.

Pri varijanti osmoprimiranja sjemena s 100 μM NaHS inducirani osmotski stres u klijanju je značajno utjecao na energiju klijanja (P=0,0004) i masu klijanaca (P<0,0001) dok na ostale ispitivane parametre vigora sjemena nije utvrđen značajan utjecaj.

U prethodno navedenoj varijanti osmoprimiranja, najveći postotak energije klijanja je utvrđen u varijanti gdje je sjeme suncokreta naklijavano na vodi (86 %) te se ova vrijednost nije značajno razlikovala od utvrđene pri tretmanu s 5 % PEG (76 %) koja se nadalje nije značajno razlikovala od energije klijanja utvrđene pri 2,5 % PEG (73 %).

Tablica 5. Značajnost utjecaja osmotskog stresa u klijanju (H_2O; 2,5 % PEG; 5 % PEG; 10 % PEG) na energiju klijanja (EK), standardnu klijavost (SK), broj ne isklijanih sjemenki (NI), broj mrtvih sjemenki (MS) (%) i masu klijanaca (mK) (g) po varijantama osmoprimiranja sjemena s rastućim koncentracijama NaHS (Bez primiranja; H_2O; 100 µM NaHS; 500 µM NaHS; 1000 µM NaHS; 1500 µM NaHS).

Bez primiranja					
VARIJANTA	**EK (%)**	**SK (%)**	**NI (%)**	**MS (%)**	**mK (g)**
H_2O	80	83	10	7	$28,29^{A}$
2,5 % PEG	65	71	22	7	$16,21^{B}$
5 % PEG	72	82	7	12	$15,78^{BC}$
10 % PEG	62	75	16	10	$11,45^{C}$
F test	1,79	1,03	2,03	0,97	25,97
P	0,2033	0,4150	0,1637	0,4396	**<0,0001**
H_2O					
H_2O	70^{A}	78	13	10	$21,16^{A}$
2,5 % PEG	72^{A}	80	14	7	$18,44^{AB}$
5 % PEG	66^{A}	71	21	9	$14,71^{B}$
10 % PEG	50^{B}	72	17	12	$10,59^{C}$
F test	6,87	0,82	0,73	1,62	12,89
P	**0,0060**	0,5052	0,5534	0,2362	**0,0005**
100 µM NaHS					
H_2O	86^{A}	90	7	4	$26,13^{A}$
2,5 % PEG	73^{B}	82	12	7	$18,81^{B}$
5 % PEG	76^{AB}	86	7	8	$16,98^{B}$
10 % PEG	54^{C}	76	15	10	$12,11^{C}$
F test	13,62	2,77	1,49	3,07	60,45
P	**0,0004**	0,0875	0,2682	0,0688	**<0,0001**
500 µM NaHS					
H_2O	83^{A}	89	9	2^{B}	$28,02^{A}$
2,5 % PEG	81^{A}	85	10	6^{AB}	$20,56^{B}$
5 % PEG	74^{A}	91	6	4^{B}	$19,66^{B}$
10 % PEG	60^{B}	82	9	10^{A}	$13,28^{C}$
F test	8,53	1,75	0,74	4,40	71,05
P	**0,0026**	0,2108	0,5463	**0,0263**	**<0,0001**
1000 µM NaHS					
H_2O	74^{A}	83	10	8	$22,26^{A}$
2,5 % PEG	82^{A}	84	11	6	$18,02^{B}$
5 % PEG	83^{A}	85	10	6	$17,47^{B}$
10 % PEG	63^{B}	73	16	12	$10,92^{C}$
F test	7,50	1,63	0,69	1,13	31,49
P	**0,0044**	0,2335	0,5780	0,3744	**<0,0001**
1500 µM NaHS					
H_2O	82^{A}	83	12	6	$24,58^{A}$
2,5 % PEG	79^{A}	84	10	7	$19,44^{B}$
5 % PEG	84^{A}	85	12	3	$16,28^{C}$
10 % PEG	63^{B}	88	7	5	$12,70^{D}$
F test	7,12	0,60	0,58	0,71	54,14
P	**0,0053**	0,6262	0,6370	0,5669	**<0,0001**

*Podaci su prosjek četiri ponavljanja; ANOVA, F test; prosjeci označeni različitim slovom se razlikuju prema LSD testu (^{A,B,C}; P=0,05).

Značajno najniža energija klijanja je dobivena pri najvišoj razini osmotskog stresa (54 %). Pad mase klijanaca je, kao i kod svih ostalih varijanti osmoprimiranja sjemena, pratio povećanje razine osmotskog stresa te je značajno najviša masa utvrđena u kontroli (H_2O 26,13 g) a značajno najniža pri 10 % PEG (12,11 g). Mase klijanaca u varijantama 2,5 % PEG (18,81 g) i 5 % PEG (16,98 g) se nisu međusobno značajno razlikovale. Pri varijanti osmoprimiranja sjemena s 500 μM NaHS, F testom je utvrđen značajan utjecaj razine osmotskog stresa na energiju klijanja (P=0,0026), postotak mrtvog sjemena (P=0,0263) te na masu klijanaca (P<0,0001) dok na standardnu klijavost i broj ne isklijanih sjemenki primijenjeni tretmani nisu značajno utjecali.

Pri varijanti osmoprimiranja sjemena s 500 μM NaHS, LSD testom je utvrđena značajno najniža energija klijanja pri najvišoj razini osmotskog stresa, 10 % PEG te je iznosila 60 %. Vrijednosti energije klijanja pri ostale tri varijante stresa u klijanju se nisu međusobno značajno razlikovale (H_2O 83 %; 2,5 % PEG 81; 5 % PEG 74 %). Najviši postotak mrtvog sjemena (10 %) je zabilježen na najvećoj razini osmotskog stresa te se nije značajno razlikovao od vrijednosti utvrđene kod varijante 2,5 % PEG (6 %). Također, postoci mrtvog sjemena utvrđeni u varijantama 2,5 % PEG, 5 % PEG (4 %) te kod kontrole (2 %), se nisu međusobno značajno razlikovali.

Pri koncentracijama 1000 i 1500 μM NaHS korištenog u osmoprimiranju sjemena suncokreta, F testom je utvrđen značajan utjecaj razine osmotskog stresa na energiju klijanja i masu klijanaca (1000 μM NaHS: EK P=0,0044, mK P<0,0001; 1500 μM NaHS: EK P=0,0053, mK P<0,0001) dok na ostale ispitivane pokazatelje vigora sjemena nije utvrđen statistički značajan utjecaj.

Pri obje spomenute koncentracije osmoprimiranja sjemena s NaHS (1000 i 1500 μM), LSD testom je utvrđena značajno najniža energija klijanja pri najvišoj razini osmotskog stresa (63 %) dok se vrijednosti dobivene na prve dvije razne stresa te kod kontrole, nisu međusobno značajno razlikovale (1000 μM NaHS: H_2O 74 %, 2,5 % PEG 82 %, 5 % PEG 83 %; 1500 μM NaHS: H_2O 82 %, 2,5 % PEG 79 %, 5 % PEG 84 %). Također kao što je i prije spomenuto, pad mase klijanaca je pratio povećanje razine osmotskog stresa. Značajno najviša masa je utvrđena u kontroli (1000 μM NaHS: H_2O 22,26 g; 1500 μM NaHS: H_2O 24,58 g) a značajno najniža pri 10 % PEG (1000 μM NaHS: 10,92 g; 1500 μM NaHS: 12,70 g). Pri osmoprimiranju sjemena s 1000 μM NaHS, mase klijanaca u varijantama 2,5 % PEG (18,02 g) i 5 % PEG (14,47 g) se nisu međusobno značajno razlikovale, dok su u

varijanti osmoprimiranja s 1500 μM NaHS utvrđene značajne razlike u masi klijanaca na spomenute dvije razine stresa (2,5 % PEG 19,44 g; 5 % PEG 16,28 g).

U svim varijantama osmoprimiranja sjemena, F testom je utvrđen značajan utjecaj osmotskog stresa na razinu lipidne peroksidacije, sadržaj vodikovog peroksida te akumulaciju prolina (*Tablica 6*).

Kod sjemena koje nije prethodno osmoprimirano, značajno najveća razina lipidne peroksidacije je utvrđena na najvišoj razini stresa (10,832 nmol g^{-1} Sv.T.) dok su najniže vrijednosti lipidne peroksidacije utvrđene u klijancima naklijavanim pri 2,5 % PEG (4,201 nmol g^{-1} Sv.T.) i 5 % PEG (4,814 nmol g^{-1} Sv.T.) te se ove vrijednosti nisu međusobno statistički značajno razlikovale. Razina lipidne peroksidacije utvrđena kod kontrole (7,252 nmol g^{-1} Sv.T.) je bila značajno viša od vrijednosti utvrđenih na prve dvije razine osmotskog stresa. Sadržaj vodikovog peroksida kod kontrole (0,121 nmol g^{-1} Sv.T.) i pri 5 % PEG (0,114 nmol g^{-1} Sv.T.) se nije statistički značajno razlikovao isto kao što nisu utvrđene ni značajne razlike u vrijednostima spomenutog parametra između tretmana 5 % PEG (0,077 nmol g^{-1} Sv.T.) i 10 % PEG (0,080 nmol g^{-1} Sv.T.). Značajno najveća akumulacija prolina zabilježena je pri najvišoj razini osmotskog stresa (5,950 μmol g^{-1} Sv.T.), a značajno najmanja kod kontrole (0,462 μmol g^{-1} Sv.T.) i 2,5 % PEG (1,168 μmol g^{-1} Sv.T.) te se ove vrijednosti nisu međusobno značajno razlikovale.

U varijanti osmoprimiranja s vodom značajno najveća razina lipidne peroksidacije je utvrđena pri 10 % PEG (12,565 nmol g^{-1} Sv.T.) dok se vrijednosti lipidne peroksidacije utvrđene kod kontrole te preostale dvije razine solnog stresa nisu značajno razlikovale (H_2O 4,729 nmol g^{-1} Sv.T.; 2,5 % PEG 5,097 nmol g^{-1} Sv.T.; 5 % PEG 5,368 nmol g^{-1} Sv.T.). Sadržaj vodikovog peroksida utvrđen kod kontrole (0,101 nmol g^{-1} Sv.T.) i 5 % PEG (0,112 nmol g^{-1} Sv.T.) se međusobno nije statistički značajno razlikovao, dok je značajno najviša vrijednost navedenog pokazatelja stresa utvrđena pri 10 % PEG (0,136 nmol g^{-1} Sv.T.), a značajno najniža pri 2,5 % PEG (0,082 nmol g^{-1} Sv.T.). Povećanje sadržaja akumuliranog prolina pratilo je povećanje razine osmotskog stresa te su hipokotili klijanaca na najvišoj razini osmotskog stresa akumulirali značajno najviše prolina (4,654, μmol g^{-1} Sv.T.) dok se sadržaj prolina kod kontrole (0,548 μmol g^{-1} Sv.T.) i pri 2,5 % PEG (1,354 μmol g^{-1} Sv.T.) nije značajno razlikovao.

Tablica 6. Značajnost utjecaja osmotskog stresa u klijanju (H_2O; 2,5 % PEG; 5 % PEG; 10 % PEG) na razinu lipidne peroksidacije (TBARS), sadržaj vodikovog peroksida (HP) (nmol g^{-1} Sv.T.) i prolina (PRO) (µmol g^{-1} Sv.T.), u hipokotilima klijanaca, po varijantama osmoprimiranja sjemena s rastućim koncentracijama NaHS (Bez primiranja; H_2O; 100 µM NaHS; 500 µM NaHS; 1000 µM NaHS; 1500 µM NaHS).

Bez primiranja			
VARIJANTA	**TBARS**	**HP**	**PRO**
H_2O	$7,252^{B}$	$0,121^{A}$	$0,462^{C}$
2,5 % PEG	$4,201^{C}$	$0,077^{B}$	$1,168^{C}$
5 % PEG	$4,814^{C}$	$0,114^{A}$	$3,011^{B}$
10 % PEG	$10,832^{A}$	$0,080^{B}$	$5,950^{A}$
F test	32,07	10,95	23,77
P	**<0,0001**	**0,0009**	**<0,0001**
H_2O			
H_2O	$4,729^{B}$	$0,101^{B}$	$0,548^{C}$
2,5 % PEG	$5,097^{B}$	$0,082^{C}$	$1,354^{C}$
5 % PEG	$5,368^{B}$	$0,112^{B}$	$2,602^{B}$
10 % PEG	$12,565^{A}$	$0,136^{A}$	$4,654^{A}$
F test	34,82	15,11	39,04
P	**<0,0001**	**0,0002**	**<0,0001**
100 µM NaHS			
H_2O	$4,701^{B}$	$0,097^{B}$	$0,632^{C}$
2,5 % PEG	$4,668^{B}$	$0,092^{B}$	$1,414^{BC}$
5 % PEG	$8,400^{A}$	$0,083^{B}$	$2,251^{B}$
10 % PEG	$8,420^{A}$	$0,126^{A}$	$4,328^{A}$
F test	14,85	4,73	29,97
P	**0,0002**	**0,0211**	**<0,0001**
500 µM NaHS			
H_2O	$5,939^{B}$	$0,103^{B}$	$0,491^{D}$
2,5 % PEG	$4,172^{C}$	$0,100^{B}$	$1,241^{C}$
5 % PEG	$7,519^{B}$	$0,050^{C}$	$2,412^{B}$
10 % PEG	$9,864^{A}$	$0,130^{A}$	$4,175^{A}$
F test	18,25	23,68	45,32
P	**<0,0001**	**<0,0001**	**<0,0001**
1000 µM NaHS			
H_2O	$4,114^{C}$	$0,071^{B}$	$0,637^{C}$
2,5 % PEG	$4,370^{C}$	$0,112^{A}$	$1,711^{B}$
5 % PEG	$6,969^{B}$	$0,067^{B}$	$1,896^{B}$
10 % PEG	$10,022^{A}$	$0,132^{A}$	$4,291^{A}$
F test	47,75	11,88	87,69
P	**<0,0001**	**0,0007**	**<0,0001**
1500 µM NaHS			
H_2O	$3,303^{C}$	$0,075^{C}$	$0,495^{D}$
2,5 % PEG	$4,143^{C}$	$0,102^{B}$	$1,569^{C}$
5 % PEG	$8,773^{B}$	$0,071^{C}$	$2,805^{B}$
10 % PEG	$10,055^{A}$	$0,146^{A}$	$4,497^{A}$
F test	94,37	37,60	148,29
P	**<0,0001**	**<0,0001**	**<0,0001**

*Podaci su prosjek četiri ponavljanja; ANOVA, F test; prosjeci označeni različitim slovom se razlikuju prema LSD testu (^{A,B,C}; P=0,05).

Kod sjemena osmoprimiranog s 100 μM NaHS, LSD testom su utvrđene značajno najviše razine lipidne peroksidacije pri varijantama osmotskog stresa 5 % PEG (8,400 nmol g^{-1} Sv.T.) i 10 % PEG (8,420 nmol g^{-1} Sv.T.) koje se međusobno nisu značajno razlikovale. Najniža razina navedenog pokazatelja stresa u biljkama je utvrđena pri 2,5 % PEG (4,701 nmol g^{-1} Sv.T.) te se nije značajno razlikovala od vrijednosti utvrđene kod kontrole (4,668 nmol g^{-1} Sv.T.). Značajno najviša akumulacija vodikovog peroksida je utvrđena pri 10 % PEG (0,126 nmol g^{-1} Sv.T.), dok se vrijednosti utvrđene kod kontrole (0,097 nmol g^{-1} Sv.T.) te preostale dvije razine stresa (2,5 % PEG 0,092 nmol g Sv.T.; 5 % PEG 0,083 nmol g^{-1} Sv.T.) nisu međusobno značajno razlikovale. Značajno najviši sadržaj slobodnog prolina pri ovoj varijanti osmoprimiranja je utvrđen kod klijanaca na 10 % PEG (4,328 μmol g^{-1} Sv.T.) dok se vrijednosti utvrđene kod kontrole (0,632 μmol g^{-1} Sv.T.) i pri 2,5 % PEG (1,414 μmol g^{-1} Sv.T.) kao ni one utvrđene na 2,5 i 5 % PEG (2,251 μmol g^{-1} Sv.T.) nisu statistički značajno razlikovale.

Pri varijanti osmoprimiranja sjemena s 500 μM NaHS najveća lipidna peroksidacija je utvrđena u varijanti osmotskog stresa 10 % PEG (9,864 nmol g^{-1} Sv.T.), a najniža u varijanti 2,5 % PEG (4,172 nmol g^{-1} Sv.T.). Razine lipidne peroksidacije utvrđene u kontroli (5,939 nmol g^{-1} Sv.T.) te pri 5 % PEG (7,519 nmol g^{-1} Sv.T.) se nisu međusobno statistički značajno razlikovale. Značajno najviša akumulacija vodikovog peroksida pri navedenoj varijanti osmoprimiranja je utvrđena na najvišoj razini osmotskog stresa (0,130 nmol g^{-1} Sv.T.) dok su najmanje vodikovog peroksida akumulirali klijanci suncokreta naklijavani pri 5 % PEG (0,050 nmol g^{-1} Sv.T.). Vrijednosti sadržaja vodikovog peroksida u stanicama hipokotila kod kontrolnih klijanaca (0,103 nmol g^{-1} Sv.T.) te pri 2,5 % PEG (0,100 nmol g^{-1} Sv.T.) se nisu međusobno značajno razlikovale. Povećanje sadržaja slobodnog prolina je, kao i u ostalim varijantama osmoprimiranja, bilo proporcionalno porastu razine osmotskog stresa te su se pri svim varijantama stresa u klijanju, dobivene vrijednosti statistički značajno razlikovale (H_2O 0,491 μmol g^{-1} Sv.T.; 2,5 % PEG 1,241 μmol g^{-1} Sv.T.; 5 % PEG 2,412 μmol g^{-1} Sv.T.; 10 % PEG 4,175 μmol g^{-1} Sv.T.).

Kod sjemena osmoprimiranog s 1000 odnosno 1500 μM NaHS značajno najviša razina lipidne peroksidacije je utvrđena također pri 10 % PEG (1000 μM NaHS 10,022 nmol g^{-1} Sv.T.; 1500 μM 10,055 nmol g^{-1} Sv.T.). Pri obje varijante osmoprimiranja sjemena niže vrijednosti lipidne peroksidacije su utvrđene kod kontrole te pri najnižoj razini osmotskog stresa (1000 μM NaHS: H_2O 4,114 nmol g^{-1} Sv.T., 2,5 % PEG 4,370 nmol g^{-1} Sv.T.; 1500 μM NaHS: H_2O 3,303 nmol g^{-1} Sv.T., 2,5 % PEG 4,143 nmol g^{-1} Sv.T.) te se ove

vrijednosti nisu međusobno značajno razlikovale. Hipokotili suncokreta u varijanti osmoprimiranja s 1000 μM NaHS su pri varijantama stresa 2,5 % PEG (0,112 nmol g^{-1} Sv.T.) i 10 % PEG (0,132 nmol g^{-1} Sv.T.) akumulirali značajno više vodikovog peroksida u usporedbi s varijantama kontrola (0,071 nmol g^{-1} Sv.T.) i 5 % PEG (0,067 nmol g^{-1} Sv.T.). Varijanta naklijavanja 10 % PEG je rezultirala značajno najvećim sadržajem prolina (4,291 μmol g^{-1} Sv.T.) dok je kod kontrolnih biljaka utvrđena najniža akumulacija navedene aminokiseline (0,637 μmol g^{-1} Sv.T.). Sadržaj prolina akumuliran u hipokotilima u varijanti 2,5 % PEG (1,711 μmol g^{-1} Sv.T.) i 5 % PEG (1,896 μmol g^{-1} Sv.T.) se nije statistički značajno razlikovao. Pri varijanti osmoprimiranja sjemena s 1500 μM otopinom NaHS, značajno najviše vodikovog peroksida su sadržavali hipokotili u varijanti naklijavanja 10 % PEG (0,146 nmol g^{-1} Sv.T.) a najniže vrijednosti su utvrđene u kontroli (0,075 nmol g^{-1} Sv.T.) i pri 5 % PEG (0,071 nmol g^{-1} Sv.T.), te se međusobno nisu statistički značajno razlikovale. Sadržaj slobodnog prolina se povećavao povećanjem razine osmotskog stresa te su se pri svim varijantama dobivene vrijednosti statistički značajno razlikovale (H_2O 0,495 μmol g^{-1} Sv.T.; 2,5 % PEG 1,569 μmol g^{-1} Sv.T.; 5 % PEG 2,805 μmol g^{-1} Sv.T.; 10 % PEG 4,497 μmol g^{-1} Sv.T.).

F testom je utvrđen značajan utjecaj osmoprimiranja sjemena na energiju klijanja (*P*=0,0462) te masu klijanaca (*P*=0,0002) naklijavanih u prisustvu vode (*Tablica 7*). Nadalje, na razini osmotskog stresa 5 % PEG, primijenjeni tretmani sjemena donorom H_2S su značajno utjecali na sve analizirane pokazatelje vigora sjemena (EK *P*=0,0444; SK *P*=0,0395; NI *P*=0,0215; mK *P*=0,0042), osim na postotak mrtvog sjemena. Na najnižoj i najvišoj razini osmotskog stresa (2,5 % i 10 % PEG), osmoprimiranje sjemena nije značajno utjecalo ni na jedan analizirani pokazatelj.

Kod sjemena naklijavanog na vodi, LSD testom su utvrđene značajne razlike između pojedenih varijanti osmoprimiranja sjemena te su tretmani s 100, 500 i 1500 μM NaHS rezultirali značajnim većom energijom klijanja (100 μM NaHS 86 %; 500 μM NaHS 83 %; 1500 μM NaHS 82 %) u usporedbi s varijantom gdje je sjeme osmoprimirano s vodom (70 %) odnosno s 1000 NaHS (74 %) te se ove dvije vrijednosti nisu međusobno značajno razlikovale. Energija klijanja kod suhog sjemena (80 %) postavljenog na naklijavanje se nije značajno razlikovala u usporedbi s preostalim varijantama osmoprimiranja. Značajno najveća masa klijanaca je utvrđena u varijanti bez primiranja (28,29 g) i kod tretmana s 500 μM NaHS (28,02 g) koja se nije značajno razlikovala od mase klijanaca pri varijanti osmoprimiranja s 100 μM NaHS (26,13 g).

Tablica 7. Značajnost utjecaja osmoprimiranja sjemena s rastućim koncentracijama NaHS (Bez primiranja; H_2O; 100 µM NaHS; 500 µM NaHS; 1000 µM NaHS; 1500 µM NaHS) na energiju klijanja (EK), standardnu klijavost (SK), broj ne isklijanih sjemenki (NI), broj mrtvih sjemenki (MS) (%) i masu klijanaca (mK) (g), po varijantama osmotskog stresa u klijanju (H_2O; 2,5 % PEG; 5 % PEG; 10 % PEG).

H_2O					
VARIJANTA	**EK (%)**	**SK (%)**	**NI (%)**	**MS (%)**	**mK (g)**
Bez primiranja	80^{ABC}	83	10	7	$28,29^{A}$
H_2O	70^{C}	78	13	10	$21,16^{D}$
100 µM NaHS	86^{A}	90	7	4	$26,13^{AB}$
500 µM NaHS	83^{AB}	89	9	2	$28,02^{A}$
1000 µM NaHS	74^{BC}	83	10	8	$22,26^{CD}$
1500 µM NaHS	82^{AB}	83	12	6	$24,58^{BC}$
F test	2,84	1,93	0,47	2,39	8,79
P	**0,0462**	0,1382	0,7956	0,0789	**0,0002**
2,5 % PEG					
Bez primiranja	65	71	22	7	16,21
H_2O	72	80	14	7	18,44
100 µM NaHS	73	82	12	7	18,81
500 µM NaHS	81	85	10	6	20,56
1000 µM NaHS	82	84	11	6	18,02
1500 µM NaHS	79	84	10	7	19,44
F test	2,00	1,04	1,24	0,09	1,54
P	0,1271	0,4244	0,3321	0,9933	0,2262
5 % PEG					
Bez primiranja	72^{BC}	82^{AB}	7^{B}	12	$15,76^{BC}$
H_2O	66^{C}	71^{B}	21^{A}	9	$14,71^{C}$
100 µM NaHS	76^{ABC}	86^{A}	7^{B}	8	$16,98^{B}$
500 µM NaHS	74^{ABC}	91^{A}	6^{B}	4	$19,66^{A}$
1000 µM NaHS	83^{AB}	85^{A}	10^{B}	6	$17,47^{AB}$
1500 µM NaHS	84^{A}	85^{A}	12^{B}	3	$16,28^{BC}$
F test	2,88	2,98	3,52	2,61	5,14
P	**0,0444**	**0,0395**	**0,0215**	0,0605	**0,0042**
10 % PEG					
Bez primiranja	62	75	16	10	11,45
H_2O	50	72	17	12	10,59
100 µM NaHS	54	76	15	10	12,11
500 µM NaHS	60	82	9	10	13,28
1000 µM NaHS	63	73	16	12	10,92
1500 µM NaHS	63	88	7	5	12,70
F test	1,39	2,08	1,17	1,57	1,10
P	0,2761	0,1150	0,3633	0,218	0,3949

*Podaci su prosjek četiri ponavljanja; ANOVA, F test; prosjeci označeni različitim slovom se razlikuju prema LSD testu (^{A,B,C}; P=0,05).

U varijanti gdje je sjeme osmoprimirano vodom, utvrđena je značajno najniža masa klijanaca (21,16 g) koja se nije statistički značajno razlikovala od mase klijanaca pri varijanti 1000 µM NaHS (22,26 g). Pri varijanti osmotskog stresa u klijanju, 5 % PEG,

osmoprimiranje sjemena suncokreta s NaHS je rezultiralo povećanjem energije klijanja za sve koncentracije primijenjenog donora H_2S (100 μM NaHS 76 %; 500 μM NaHS 74 %; 1000 μM NaHS 83 %; 1500 μM NaHS 84 %) te se dobivene vrijednosti nisu međusobno statistički značajno razlikovale. Najniža energija klijanja je utvrđena u varijanti primiranja s vodom (66 %) te se nije značajno razlikovala od vrijednosti dobivenih u varijantama bez primiranja (72 %) te pri 100 μM NaHS i 500 μM NaHS. Značajno najniža standardna klijavost je utvrđena u varijanti osmoprimiranja vodom (71 %) te se nije značajno razlikovala od one utvrđene u varijanti bez primiranja (82 %).

Osmoprimiranje sjemena različitim koncentracijama NaHS je rezultiralo povećanjem standardne klijavosti (100 μM NaHS 86 %; 500 μM NaHS 91 %; 1000 μM NaHS 85 %; 1500 μM NaHS 85 %) te se ove vrijednosti međusobno nisu značajno razlikovale. Značajno najviši postotak ne isklijanih sjemenki je utvrđen u varijanti naklijavanja u prisustvu vode (21 %) dok se ostale dobivene vrijednosti nisu međusobno statistički značajno razlikovale te su se kretale u rasponu od 6 - 12 %, ovisno o varijanti osmoprimiranja. Najmanja masa klijanaca (14,71 g) pri spomenutoj varijanti osmotskog stresa, je utvrđena pri varijanti osmoprimiranja s vodom te se nije značajno razlikovala od masa utvrđenih u varijanti bez primiranja (15,76 g) te pri najvećoj korištenoj koncentraciji NaHS (16,28 g). Najveća masa klijanaca je utvrđena u varijanti 500 μM NaHS (19,66 g) te se nije značajno razlikovala od mase klijanaca naklijavanih pri 1000 μM NaHS (17,47 g).

U varijanti naklijavanja sjemena na vodi, F testom je utvrđen značajan utjecaj varijanti osmoprimiranja sjemena na razinu lipidne peroksidacije (P<0,0001), sadržaj vodikovog peroksida (P<0,0001) i slobodnog prolina (P=0,0287) (*Tablica 8*).

Prema LSD testu, kod u varijanti naklijavanja sjemena na vodi, najviša razina lipidne peroksidacije (7,252 nmol g^{-1} Sv.T.) je zabilježena kod ne primiranog sjemena. Klijanci dobiveni iz sjemena osmoprimiranog s 1500 μM NaHS su imali najnižu razinu lipidne peroksidacije (3,303 nmol g^{-1} Sv.T.) koja se nije značajno razlikovala od one utvrđene pri varijanti osmoprimiranja s 1000 μM NaHS (4,114 nmol g^{-1} Sv.T.), a koja se pak nadalje nije značajno razlikovala od razina utvrđenih u varijantama voda i 100 μM NaHS (100 μM NaHS 4,701 nmol g^{-1} Sv.T.; H_2O 4,729 nmol g^{-1} Sv.T.).

Tablica 8. Značajnost utjecaja osmoprimiranja sjemena s rastućim koncentracijama NaHS (Bez primiranja; H_2O; 100 μM NaHS; 500 μM NaHS; 1000 μM NaHS; 1500 μM NaHS) na razinu lipidne peroksidacije (TBARS), sadržaj vodikovog peroksida (HP) (nmol g^{-1}

Sv.T.) i prolina (PRO) (µmol g^{-1} Sv.T.), u hipokotilima klijanaca, po varijantama osmotskog stresa u klijanju (H_2O; 2,5 % PEG; 5 % PEG; 10 % PEG).

H_2O			
VARIJANTA	**TBARS**	**HP**	**PRO**
Bez primiranja	7,252^{A}	0,121^{A}	0,462^{B}
H_2O	4,729^{C}	0,101^{B}	0,548^{AB}
100 µM NaHS	4,701^{C}	0,097^{B}	0,631^{A}
500 µM NaHS	5,939^{B}	0,103^{B}	0,491^{B}
1000 µM NaHS	4,114^{CD}	0,071^{C}	0,637^{A}
1500 µM NaHS	3,303^{D}	0,075^{C}	0,495^{B}
F test	14,85	13,19	3,26
P	**<0,0001**	**<0,0001**	**0,0287**
2,5 % PEG			
Bez primiranja	4,201	0,077^{C}	1,168^{C}
H_2O	5,097	0,082^{C}	1,354^{BC}
100 µM NaHS	4,668	0,092^{BC}	1,414^{BC}
500 µM NaHS	4,172	0,100^{AB}	1,241^{C}
1000 µM NaHS	4,370	0,112^{A}	1,711^{A}
1500 µM NaHS	4,143	0,102^{AB}	1,569^{AB}
F test	0,81	6,26	4,44
P	0,5585	**0,0016**	**0,0082**
5 % PEG			
Bez primiranja	4,814^{C}	0,114^{A}	3,011^{A}
H_2O	5,368^{BC}	0,112^{A}	2,602^{AB}
100 µM NaHS	8,400^{A}	0,083^{AB}	2,251^{BC}
500 µM NaHS	7,519^{A}	0,050^{C}	2,412^{ABC}
1000 µM NaHS	6,969^{AB}	0,067^{BC}	1,896^{C}
1500 µM NaHS	8,773^{A}	0,071^{BC}	2,805^{AB}
F test	6,69	6,11	3,26
P	**0,0011**	**0,0018**	**0,0285**
10 % PEG			
Bez primiranja	10,832^{AB}	0,080^{B}	5,950
H_2O	12,565^{A}	0,136^{A}	4,654
100 µM NaHS	8,420^{C}	0,126^{A}	4,328
500 µM NaHS	9,864^{BC}	0,130^{A}	4,175
1000 µM NaHS	10,022^{BC}	0,132^{A}	4,291
1500 µM NaHS	10,055^{BC}	0,146^{A}	4,497
F test	4,94	11,05	1,50
P	**0,0051**	**<0,0001**	0,2376

*Podaci su prosjek četiri ponavljanja; ANOVA, F test; prosjeci označeni različitim slovom se razlikuju prema LSD testu (^{A,B,C}; *P*=0,05).

Sadržaj vodikovog peroksida utvrđen kod kontrole (0,101 nmol g^{-1} Sv.T.), 100 µM NaHS (0,097 nmol g^{-1} Sv.T.) i 500 µM NaHS (0,103 nmol g^{-1} Sv.T.) se međusobno nije statistički značajno razlikovao, dok je značajno najveća vrijednost navedenog pokazatelja stresa utvrđena pri varijanti bez primiranja (0,212 nmol g^{-1} Sv.T.). Niži sadržaj vodikovog

peroksida utvrđen je pri najvišim razinama osmotskog stresa (1000 μM NaHS 0,071 nmol g^{-1} Sv.T.; 1500 μM NaHS 0,075 nmol g^{-1} Sv.T.) te se ove vrijednosti nisu statistički značajno razlikovale. Najviše slobodnog prolina akumulirali su hipokotili klijanaca u varijantama osmoprimiranja sjemena s 1000 μM NaHS (0,637 μmol g^{-1} Sv.T.) i 100 μM NaHS (0,631 μmol g^{-1} Sv.T.) te se ove vrijednosti nisu značajno razlikovale. Najniži sadržaj prolina je utvrđen u varijanti bez primiranja (0,462 μmol g^{-1} Sv.T.), zatim pri varijanti osmoprimiranja s 500 μM NaHS (0,491 μmol g^{-1} Sv.T.) i varijanti 1500 μM NaHS (0,495 μmol g^{-1} Sv.T.) te se ove vrijednosti nisu međusobno značajno razlikovale.

Na razini osmotskog stresa 2,5 % PEG, osmoprimiranje sjemena je značajno utjecalo na sadržaj vodikovog peroksida (P=0,0016) i slobodnog prolina (P=0,0082).

Prema LSD testu, pri varijanti naklijavanja sjemena suncokreta pri 2,5 % PEG značajno najviše vodikovog peroksida su akumulirali klijanci suncokreta čije sjeme je bilo osmoprimirano s 1000 μM NaHS (0,112 nmol g^{-1} Sv.T.) te nije bilo značajne razlike u usporedbi s tretmanima 500 μM NaHS (0,100 nmol g^{-1} Sv.T.) i 1500 μM NaHS (0,102 nmol g^{-1} Sv.T.). Manji sadržaj vodikovog peroksida je utvrđen pri varijantama bez primiranja (0,077 nmol g^{-1} Sv.T.), voda (0,082 nmol g^{-1} Sv.T.) te 100 μM NaHS (0,092 nmol g^{-1} Sv.T.) te se navedene vrijednosti nisu značajno razlikovale. Značajno najviši sadržaj slobodnog prolina je utvrđen kod klijanaca čije je sjeme tretirano s 1000 μM NaHS (1,711 μmol g^{-1} Sv.T.) i nije se značajno razlikovao od onog utvrđenog pri 1500 μM NaHS (1,569 μmol g^{-1} Sv.T.). Varijanta bez primiranja i varijanta osmoprimiranja sjemena s 500 μM NaHS su rezultirale najnižim sadržajem prolina u hipokotilima (bez primiranja 1,168 μmol g^{-1} Sv.T.; 500 μM NaHS 1,241 μmol g^{-1} Sv.T.) i nisu se značajno razlikovale u usporedbi s vrijednostima utvrđenih u varijantama voda (1,354 μmol g^{-1} Sv.T.) i 100 μM NaHS (1,414 μmol g^{-1} Sv.T.).

U varijanti naklijavanja sjemena na osmotskom stresu pri 5 % PEG, utvrđen je značajan utjecaj osmoprimiranja sjemena na sve ispitivane parametre (TBARS P=0,0011; HP P=0,0018; PRO P=0,0285).

Pri spomenutoj razini osmotskog stresa, LSD testom je utvrđena niža lipidna peroksidacija u svim varijantama osmoprimiranja s NaHS (100 μM NaHS 8,400 nmol g^{-1} Sv.T.; 500 μM NaHS 7,519 nmol g^{-1} Sv.T.; 1000 μM NaHS 6,969 nmol g^{-1} Sv.T.; 1500 μM NaHS 8,773 nmol g^{-1} Sv.T.) u usporedbi s ne primiranim sjemenom (4,814 nmol g^{-1} Sv.T.) odnosno primiranim vodom (5,368 nmol g^{-1} Sv.T.). Vrijednosti lipidne peroksidacije utvrđene pri

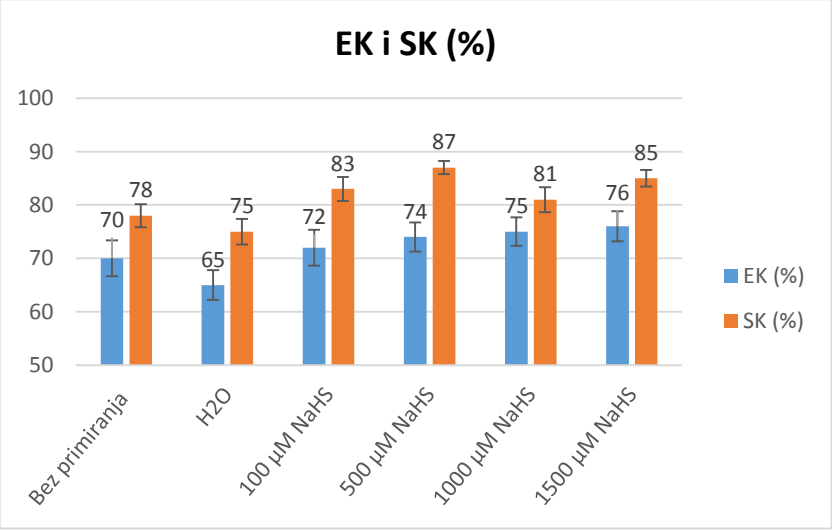
svim varijantama osmoprimiranja s NaHS se nisu međusobno značajno razlikovale isto kao što se nisu međusobno značajno razlikovale vrijednosti utvrđene kod ne primiranog i sjemena primiranog vodom. Povećana akumulacija vodikovog peroksida u klijancima suncokreta je utvrđena u varijantama bez primiranja (0,114 nmol g^{-1} Sv.T.) i primiranja vodom (0,112 nmol g^{-1} Sv.T.) te se ove vrijednosti nisu značajno razlikovale. Sadržaj vodikovog peroksida utvrđen na razinama 500 μM NaHS (0,050 nmol g^{-1} Sv.T.) 1000 μM NaHS (0,0673 nmol g^{-1} Sv.T.) i 1500 μM NaHS (0,071 nmol g^{-1} Sv.T.) se nije značajno razlikovao. Najviši sadržaj slobodnog prolina je utvrđen kod ne primiranog sjemena (3,011 μmol g^{-1} Sv.T.) i nije se značajno razlikovao od varijanti voda (2,602 μmol g^{-1} Sv.T.) i 1500 μM NaHS (2,805 μmol g^{-1} Sv.T.). Najniži sadržaj slobodnog prolina u klijancima je utvrđen u varijanti osmoprimiranja s 1000 μM NaHS (1,896 μmol g^{-1} Sv.T.) te se nije značajno razlikovao od vrijednosti utvrđenih pri 100 μM NaHS (2,251 μmol g^{-1} Sv.T.) i 500 μM NaHS (2,412 μmol g^{-1} Sv.T.).

Na najvišoj razini osmotskog stresa, pri 10 % PEG, utvrđen je značajan utjecaj osmoprimiranja sjemena suncokreta na razinu lipidne peroksidacije (P=0,0051) te na akumulaciju vodikovog peroksida (P<0,0001), dok na sadržaj prolina spomenuti tretmani nisu značajno utjecali.

Prema LSD testu, najviše razine lipidne peroksidacije su utvrđene u klijancima dobivenih iz sjemena primiranog vodom (12,565 nmol g^{-1} Sv.T.) i kod ne primiranog sjemena (10,832 nmol g^{-1} Sv.T.) te se međusobno nisu značajno razlikovale. Osmoprimiranje s NaHS je smanjilo razinu lipidne peroksidacije te se dobivene vrijednosti, bez obzira na korištenu koncentraciju otopine NaHS, nisu međusobno značajno razlikovale (100 μM NaHS 8,420 nmol g^{-1} Sv.T.; 500 μM NaHS 9,864 nmol g^{-1} Sv.T., 1000 μM NaHS 10,022 nmol g^{-1} Sv.T.; 1500 μM NaHS 10,055 nmol g^{-1} Sv.T.). Značajno najniža akumulacija vodikovog peroksida je zabilježena kod ne primiranog sjemena (0,080 nmol g^{-1} Sv.T.). Sadržaj vodikovog peroksida u hipokotilima klijanaca pri svim ostalim varijantama osmoprimiranja se nije međusobno značajno razlikovao (H_2O 0,136 nmol g^{-1} Sv.T. 100 μM NaHS 0,126 nmol g^{-1} Sv.T.; 500 μM NaHS 0,130 nmol g^{-1} Sv.T.; 1000 μM NaHS 0,132 nmol g^{-1} Sv.T.; 1500 μM NaHS 0,146 nmol g^{-1} Sv.T.).

5. RASPRAVA

Standardna klijavost i energija klijanja su glavni pokazatelji fiziološke kvalitete sjemena te neizostavni parametri za određivanje norme sjetve u cilju postizanja željenog sklopa biljaka u polju pa su kao takvi naišli na široku primjenu u praksi. Osmoprimiranje je tehnika tretiranja sjemena kojom se djelomično ili u potpunosti, sjeme hidrira s vodom ili različitim osmotskim solima ($CaCl_2$, $CaSO_4$, NaCl, KNO_3) kroz određeno vrijeme nakon čega se suši prije izbijanja radikule i same sjetve (McDonald, 2000.). Osim soli, čiji se pozitivni efekat na vigor prvenstveno temelji na osmotskoj vrijednosti otopine, sjeme se može primirati i različitim otopinama gdje osim osmotskog djelovanja imamo istaknuto i pozitivno djelovanje elemenata u njihovu sastavu (npr. različiti fiziološki aktivni spojevi poput hormona, aminokiselina, različite molekule koje se uključuju u puteve prijenosa staničnog signala – ROS (reaktivne kisikove jedinke), RNS (reaktivne dušikove jedinke), RSS (reaktivne sumporne jedinke), H_2O_2 itd. Oni se već u ranim fazama mogu direktno uključiti u metaboličke procese u sjemenu koji prethode klijanju te pozitivno utjecati na oslobađanje energije iz pohranjenih zaliha, poboljšavanju iskorištenja nutritivnih elemenata poticanju antioksidativnih mehanizama u uvjetima stresa, itd.



Grafikon 1. Utjecaj varijanti osmoprimiranja sjemena suncokreta s rastućim koncentracijama NaHS na postotak energije klijanja (EK) i standardne klijavosti (SK). Prikazani rezultati su prosjek za sve varijante osmotskog stresa u klijanju.

U ovom istraživanju, u kojem su klijanci suncokreta bili naklijavani u uvjetima osmotskog stresa, ispitivan je utjecaj različitih koncentracija donora sumporovodika (NaHS) na pokazatelje vigora sjemena i fiziološke pokazatelje stresa. Iz *grafikona 1* je vidljivo da su u

prosjeku za sve varijante osmotskog stresa, tretmani s NaHS, povećali dva osnovna pokazatelja vigora sjemena, energiju klijanja i standardnu klijavost u prosjeku za 8 % u usporedbi s ne primiranim sjemenom te sjemenom primiranim u vodi. Tako je najviša vrijednost energije klijanja utvrđena pri najvećoj koncentraciji NaHS (76 %), dok je najviša vrijednost standardne klijavosti utvrđena pri 500 μM primijenjenog NaHS.

Zhang i suradnici (2010.) u svojim istraživanjima na pšenici, ispituju utjecaj tretmana sjemena s NaHS u uvjetima osmotskog stresa uzrokovanog primjenom 25 % PEG-6000 u trajanju od 4 dana. Navode da osim povećanja klijavosti, NaHS utječe i na povećanje produkcije unutarstaničnog H_2S. Paralelno uz ispitivanje djelovanja NaHS, istraživan je i utjecaj ostalih spojeva koji sadrže sumpor poput S_2^-, SO^{2-}_4, SO^{2-}_3, HSO^-_4, kao i sam Na^+ te utvrđuju da nijedan navedeni spoj koji sadrži sumpor ne poboljšava klijavost toliko značajno kao NaHS (*Slika 7*). Također upućuju i na činjenice da H_2S može stimulativno djelovati na aktivnost amilaze i esteraze – dva ključna enzima u fiziološkim procesima razgradnje organskih zaliha, što prethodi klijanju. Na temelju rezultata svojih istraživanja, autori zaključuju da H_2S ima zaštitnu ulogu u sjemenkama pšenice u uvjetima osmotskog stresa.

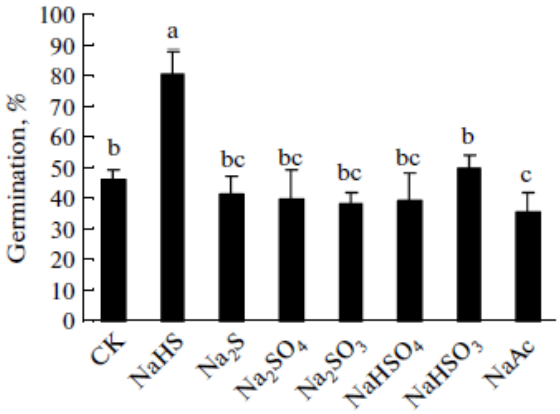
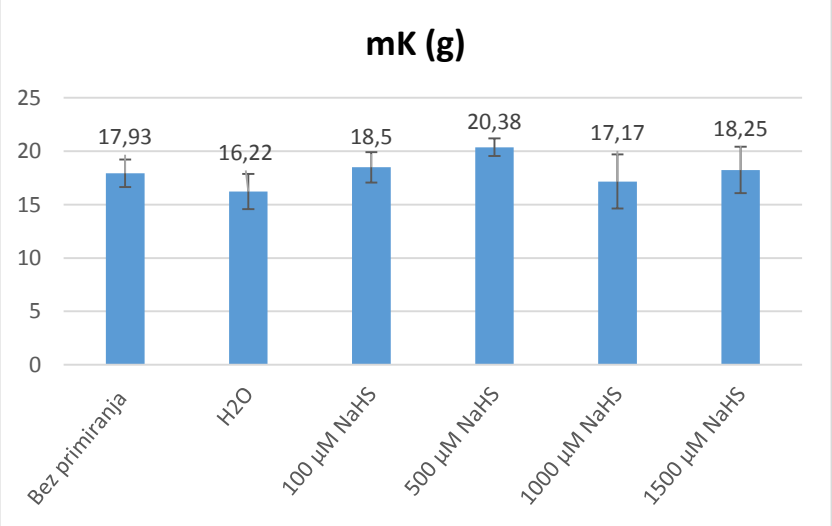


Fig. 1. The protective role of NaHS on seeds germination under osmotic stress.
Seeds were cultured in 25% PEG-6000-containing water (CK), 0.6 mM NaHS, 0.6 mM Na_2S, 0.6 mM Na_2SO_4, 0.6 mM Na_2SO_3, 0.6 mM $NaHSO_4$, 0.6 mM $NaHSO_3$, or 0.6 mM CH_3COONa (NaAc). After 48 h, the germination rate was measured. For each treatment, 50 seeds were used and the germination percentage represented the mean number of germinated seeds from three independent experiments. One-way ANOVA was used for comparisons between the means. Vertical bars represent the SD of the mean ($n = 4$). Different letters show significant differences at $P < 0.01$.

Slika 7. Zaštitna uloga NaHS u klijanju sjemena u uvjetima osmotskog stresa (Zhang i sur. 2010.)

Fališevac (2014.) u svom istraživanju provedenom na klijancima krastavca dobivenim iz sjemena različitih godina deklaracije, objašnjava kako je najstarije sjeme krastavca iz proizvodne godine 2009./2010. imalo značajno nižu standardnu klijavost i energiju klijanja kod varijante osmoprimiranja sjemena s NaHS. U varijanti gdje je sjeme bilo imbibirano u otopini GYY4137 a koji je umjetno sintetizirani, sporo otpuštajući donor H_2S, nije utvrđena značajna razlika u energiji klijanja i standardnoj klijavosti s obzirom na godinu deklaracije sjemena. Tako je kod najstarijeg sjemena utvrđen vrlo visok postotak za navedena dva parametra te autor zaključuje kako GYY4137 kao može povećati vigor kod starijeg sjemena što upućuje da je osim samog prisustva H_2S bitna i brzina njegova otpuštanja, a time i vrijeme tj. trajanje njegovog djelovanja. Autor također navodi kako povećana akumulacija svježe mase hipokotila i korijena kod klijanaca krastavca nakon osmoprimiranja sjemena s H_2S te naklijavanja u otopini NaCl niske koncentracije, upućuje na mogućnost kumulativnog efekta ova dva tretmana.

U prosjeku za sve razine osmotskog stresa u klijanju u našem pokusu, utvrđene su značajne razlike u masama klijanaca između pojedinih varijanti osmoprimiranja sjemena (*Grafikon 2*). Imbibicija sjemena u otopinama NaHS je u prosjeku rezultirala povećanjem mase klijanaca za približno 8 %, u usporedbi s masama klijanaca u varijantama voda, odnosno suho sjeme. Pri 500 µM NaHS je utvrđena najveća masa hipokotila (20,38 g), dok je značajno najniža masa klijanaca (16,22 g) utvrđena opet kod sjemena primiranog vodom.

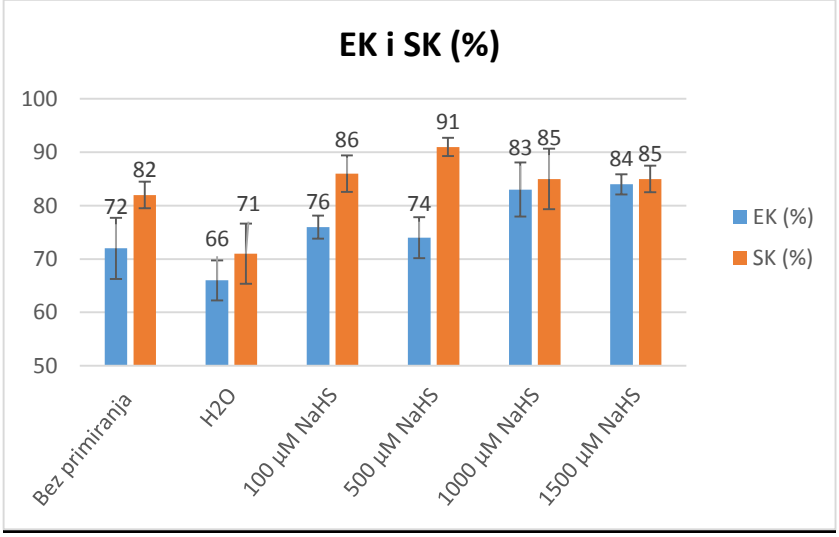


Grafikon 2. Masa klijanaca u gramima (g) prikazana po varijantama osmoprimiranja sjemena suncokreta. Prikazani rezultati su prosjek za sve varijante osmotskog stresa u klijanju.

Rezultati ukazuju da u prosjeku za sve varijante stresa, osmoprimiranje sjemena s 500 µM NaHS pozitivno utječe na povećanje standardne klijavosti i mase hipokotila (*Grafikon 1 i 2*).

Zbog kemijskog svojstva da inaktivira slobodnu vodu, PEG se često primjenjuje u istraživanjima odnosa biljaka prema vodi, osobito za simulaciju sušnih uvjeta (osmotski stres). Osmotski potencijal vodenih otopina PEG-a 6000 je u direktnoj vezi s njegovom koncentracijom (Michel i Kaufmann, 1973.). Osmotski potencijal 5 % otopine PEG 6000 koji smo koristili u našim istraživanjima, iznosi -0,499 MPa što je približno ekvivalentno sili vezanja vode za čestice tla koja iznosi 5 atm. Navedena vrijednost je blizu gornje granice lako pristupačne vode u tlu te ova koncentracija još uvijek ne bi trebala predstavljati značajan osmotski stres za većinu biljaka. Točka venuća za većinu biljaka našeg klimata nastupa kada je voda u tlu vezana silom od približno 15 atm (Caldwell 1967.), što odgovara osmotskom potencijalu 10 % PEG 6000, a koji iznosi -1,483 MPa.

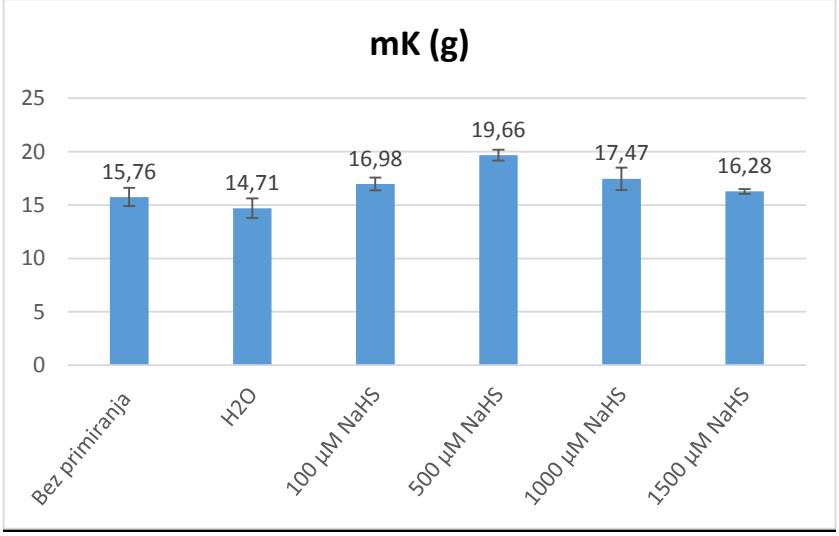
Na razini osmotskog stresa 5 % PEG osmoprimiranje sjemena suncokreta s NaHS je rezultiralo povećanjem energije klijanja za sve koncentracije primijenjenog donora H_2S, s time da je tretman 1500 µM NaHS rezultirao s najvišim postotkom energije klijanja (84 %) (*Grafikon 3*). Imbibicija sjemena u otopinama NaHS je u prosjeku rezultirala povećanjem vrijednosti standardne klijavosti, naročito u tretmanu 500 µM NaHS, gdje je utvrđena značajno najviša standardna klijavost (91 %).



Grafikon 3. Utjecaj varijanti osmoprimiranja sjemena suncokreta s rastućim koncentracijama NaHS na postotak energije klijanja (EK) i standardne klijavosti (SK) kod klijanaca naklijavanih pri 5 % PEG.

Na spomenutoj razini stresa, kod klijanaca dobivenih iz sjemena imbibiranog u vodi su ponovno utvrđene značajno najniže vrijednosti ispitivanih parametara (EK 66 %; SK 71 %).

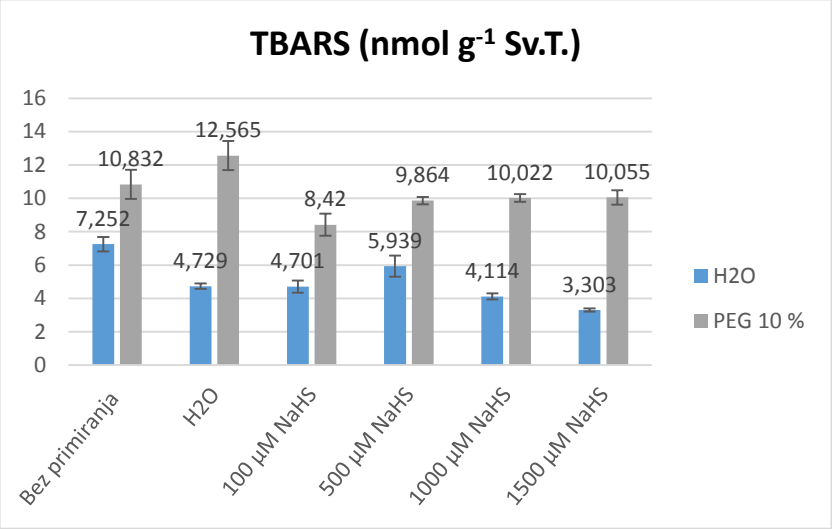
Prabhjot i sur. (2002.) proučavaju utjecaj osmotskog stresa na klijanje, rast i sadržaj topivih šećera u sjemenu stočnog sirka (*Sorghum bicolor* L. Moench). U uvjetima osmotskog stresa, uzrokovanog primjenom 0,75M manitola što je ekvivalentno osmotskom tlaku od -1,86 MPa, klijanje se značajno smanjilo, dok je u kontroli (destilirana voda) dostignuta maksimalna razina klijanja. U usporedbi s kontrolom masa svježe tvari je također bila smanjena u uvjetima osmotskog stresa. Radić i sur. (2007.) proučavaju utjecaj suše na razvoj klijanaca kod različitih genotipova kukuruza. Osmotski stres je uzrokovan primjenom PEG 6000 (osmotskog potencijala: -0.1 MPa, -0.3 MPa, -0.6 MPa, -0.9 MPa.). Ispitivanja su pokazala razliku između genotipova u otpornosti na sušu. Također, ispitivanjem je utvrđeno da s povećanjem koncetracije PEG, povećava se i negativan utjecaj na klijavost sjemena i porast klice. Maghsoudi i Arvin (2010.) su u pokusu s pšenicom (*Triticum aestivum* L.) ispitivali utjecaj osmotskog stresa izazvanog primjenom 10 % i 20 % PEG te utvrdili značajno smanjenje postotka klijavosti, brzine rasta te dužine i mase klijanaca u tretmanima s PEG u odnosu na destiliranu vodu. U našim istraživanjima pri 5 % PEG, osmoprimiranje sjemena s 500 µM NaHS je rezultiralo značajnim povećanjem mase klijanaca (19,66 g) u odnosu na sve ostale tretmane, osim 1000 µM NaHS čija se masa (17,47 g) nije značajno razlikovala od utvrđene u prethodno spomenutom tretmanu (*Grafikon 4*).



Grafikon 4. Utjecaj varijanti osmoprimiranja sjemena suncokreta s rastućim koncentracijama NaHS naklijavanih pri 5 % PEG na masu klijanaca u gramima (g).

Iz svega navedenog, vidljivo je da osmoprimiranje sjemena s 500 µM NaHS pozitivno utječe na standardnu klijavost i masu klijanaca naklijavanih pri blagom osmotskom stresu (*Grafikon 3 i 4*).

Kod klijanaca naklijavanih na vodi najveća razina lipidne peroksidacije zabilježena je kod sjemena koje nije bilo prethodno primirano, dok su u prosjeku, tretmani s NaHS smanjili razinu lipidne peroksidacije te je najniža vrijednost utvrđena pri najvećoj koncentraciji korištenog NaHS (3,303 nM g^{-1} Sv.T.) (*Grafikon 5*).



Grafikon 5. Utjecaj varijanti osmoprimiranja sjemena suncokreta s rastućim koncentracijama NaHS na intenzitet lipidne peroksidacije (nmol g^{-1} Sv.T.) kod klijanaca naklijavanih pri 10 % PEG i na vodi.

Špoljarević i sur. (2014.) u svom istraživanju prikazuju rezultate fiziološkog odgovora u klijancima soje u uvjetima osmotskog stresa. Uz vodu kao kontrolu, primijenjene su dvije razine osmotskog stresa, otopine 5 % PEG 6000 (-0,5 bara) i 10 % PEG 6000 (-1,48 bara) kao medij za klijanje sjemena. Sadržaj slobodnog prolina, ukupnih fenola i intenzitet lipidne peroksidacije u tkivu hipokotila klijanaca soje se povećao pri višoj koncentraciji otopine PEG 6000. Nadalje, Galić (2014.) u svom istraživanju provedenom na krastavcu (*Cucumis sativus* L.) također navodi da je lipidna peroksidacija u hipokotilima klijanaca bila značajno smanjena pri tretmanu sjemena s GYY4137 dok je efekt NaHS vjerojatno izostao zbog hlapljive prirode tog spoja. H_2S se pokazao djelotvornim i kod otpornosti biljaka na stres uzrokovan sušom. Christou i sur. (2011.) su pri hidroponskom uzgoju jagode (Fragaria x ananassa var. Camarosa) tretirali korijen biljaka s 10 mM NaHS te ispitivali toleranciju na naknadno izlaganje toplinskom i osmotskom stresu. Predtretman korijena s NaHS je rezultirao nižom razinom lipidne peroksidacije, u odnosu na jagode

koje su izložene toplinskom stresu bez predtretmana navedenim donorom. Shan i sur. (2011.) dolaze do zaključka da predtretman s H_2S (1 mM NaHS) smanjuje sadržaj malondialdehida (MDA) i otpuštanje elektrolita, uzrokovanim nedostatkom vode kod biljaka pšenice (*Triticum aestivum* L.).

U našem istraživanju, pri najvišoj razini osmotskog stresa (10 % PEG) osmoprimiranje sjemena s NaHS je u prosjeku smanjilo razinu lipidne peroksidacije u usporedbi s vrijednostima utvrđenih kod klijanaca dobivenih iz ne primiranog i sjemena primiranog vodom te je najniža vrijednost (8,42 nM g^{-1} Sv.T. $^{-1}$) navedenog pokazatelja stresa utvrđena pri 100 µM.

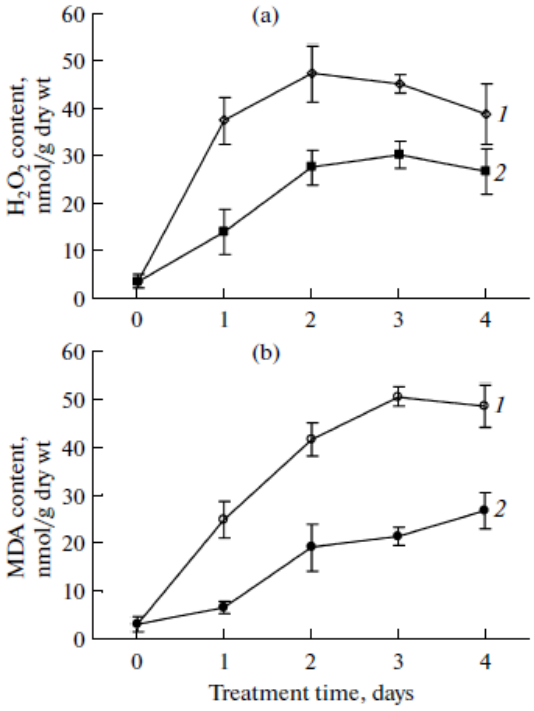


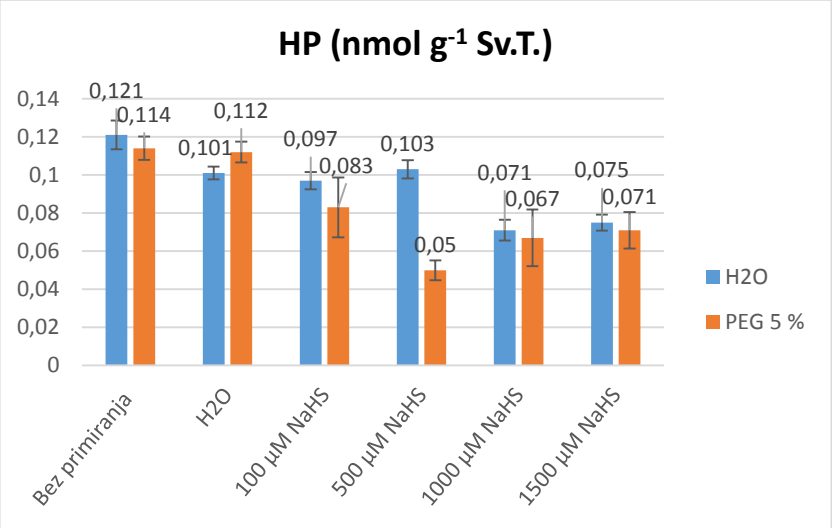
Fig. 3. Effects of H_2S donor NaHS on the contents of (a) H_2O_2 and (b) MDA in seeds.
Seeds were treated without (*1*) or with 0.6 mM NaHS (*2*) for 4 days under 25% PEG stress. Values are the means ±SD ($n = 6$). Every experiment was repeated at least three times.

Slika 8. Efekt NaHS na sadržaj vodikovog peroksida (a) i razinu lipidne peroksidacije (b) u sjemenu (Zhang i sur. 2010.)

Pojačana akumulacija vodikovog peroksida je potvrđena u uvjetima bilo kojeg tipa abiotskog stresa. Hernandez i sur. (2009.) su istraživali akumulaciju vodik peroksida i antioksidativne mehanizme uslijed različitog trajanja solnoga stresa, kod biljaka kupusa (*Brassica oleracea* L.). Pri najvišoj razini soli (80 mM NaCl), akumulacija vodik peroksida

zabilježena je i u zoni elongacije i u zoni diferencijacije korijena. Zhang i suradnici (2010.) također potvrđuju smanjenu akumulaciju vodikovog peroksida i niže razine lipidne peroksidacije u sjemenu pšenice naklijavanim u uvjetima osmotskog stresa, pri tretmanima s NaHS (*Slika 8*). Na temelju analiziranih parametara, autori zaključuju da se u sjemenu tretiranom s NaHS u neutralizaciju vodikovog peroksida uključuju enzimi katalaza i askorbat-peroksidaza (CAT i APX), pošto je utvrđena pojačana ekspresija gena koji kodiraju ova dva enzima. Također, smanjena aktivnost LOX (lipoksigenaze) inducirana s H_2S rezultirala je i smanjenom lipidnom peroksidacijom. Autori zaključuju da u uvjetima osmotskog stresa, H_2S regulira antioskidativni status u stanici, što dokazuje brza stimulacija fizioloških mehanizama koji rezultiraju povećanjem antioksidativnog kapaciteta.

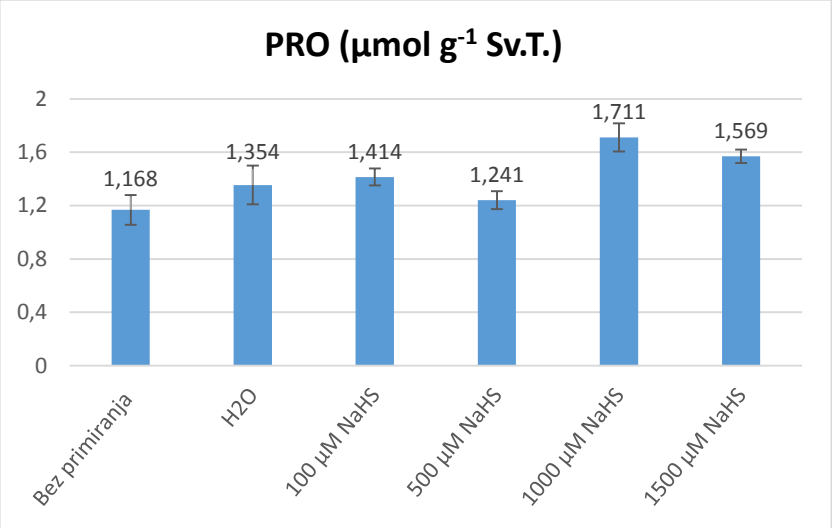
U našim istraživanjima, u klijancima suncokreta, čije sjeme je prethodno primirano otopinama NaHS a potom naklijavano na vodi, utvrđen je smanjen sadržaj vodikovog peroksida te je najniža vrijednost zabilježena pri najvišim koncentracijama otopina NaHS (1000 µM NaHS 0,071 nmol g^{-1} Sv.T.; 1500 µM NaHS 0,075 nmol g^{-1} Sv.T.) (*Grafikon 6).*



Grafikon 6. Utjecaj varijanti osmoprimiranja sjemena suncokreta s rastućim koncentracijama NaHS na sadržaj vodikovog peroksida (nmol g^{-1} Sv.T.) kod klijanaca naklijavanih pri 5 % PEG i na vodi.

Szekely i sur. (2008.) u svojim istraživanjima provedenim na mutantima uročnjaka Atp5cs1 koji pokazuje smanjenu sposobnost akumulacije prolina, navode moguću antioksidativnu ulogu ove aminokiseline. Autori u navedenom istraživanju navode da je intenzitet lipidne peroksidacije pratio porast sadržaja vodikovog peroksida, uz smanjenje sadržaja slobodnog prolina, što može značiti „trošenje“ prolina u procesima zaštite od

oksidacijskog stresa ili da manji sadržaj slobodnog prolina rezultira većom koncentracijom vodikovog peroksida i intenzivnijom peroksidacijom lipida.



Grafikon 7. Utjecaj varijanti osmoprimiranja sjemena suncokreta s rastućim koncentracijama NaHS na sadržaj slobodnog prolina (µmol g^{-1} Sv.T.) kod klijanaca naklijavanih pri 2,5 % PEG.

U našim istraživanjima, pri 2,5 % PEG, sadržaj slobodnog prolina u klijancima suncokreta u prosjeku se povećavao s povećanjem koncentracija donora H_2S (*Grafikon 7*). Klijanci suncokreta u varijanti bez primiranja su imali najniži sadržaj slobodnog prolina (1,168 µmol g^{-1} Sv.T.) dok je primiranje sjemena s 1000 µM NaHS i 1500 µM NaHS je rezultiralo povećanjem sadržaja slobodnog prolina u klijancima (1,569 µmol g^{-1} Sv.T.; 1,711 µmol g^{-1} Sv.T.). Dobiveni rezultati upućuju na stimulativno djelovanje H_2S na akumulaciju slobodnog prolina u stanici.

6. ZAKLJUČAK

1. U prosjeku za sve varijante osmotskog stresa, primiranje sjemena s NaHS je povećalo dva osnovna pokazatelja vigora sjemena, energiju klijanja i standardnu klijavost te je najviša vrijednost energije klijanja utvrđena pri najvećoj korištenoj koncentraciji NaHS, dok je najviša vrijednost standardne klijavosti utvrđena pri 500 μM primijenjenog NaHS.

2. Na razini osmotskog stresa 5 % PEG osmoprimiranje sjemena suncokreta s NaHS je rezultiralo povećanjem energije klijanja za sve koncentracije primijenjenog donora H_2S s najvišim postotkom energije klijanja pri tretmanu s 1500 μM NaHS, dok je značajno najviša standardna klijavost utvrđena u tretmanu s 500 μM NaHS.

3. Imbibicija sjemena u otopinama NaHS je u prosjeku rezultirala povećanjem mase klijanaca suncokreta.

4. Pri najvišoj razini osmotskog stresa (10 % PEG) osmoprimiranje sjemena s NaHS je u prosjeku smanjilo razinu lipidne peroksidacije u usporedbi s vrijednostima utvrđenih kod klijanaca dobivenih iz ne primiranog i sjemena primiranog vodom, što upućuje na zaštitnu ulogu H_2S pri osmotskom stresu.

5. U klijancima suncokreta, čije sjeme je prethodno primirano otopinama NaHS, a potom naklijavano na vodi, utvrđen je smanjen sadržaj vodikovog peroksida te je najniža vrijednost zabilježena pri najvišim koncentracijama otopina NaHS (1000 μM NaHS i 1500 μM NaHS).

6. Sadržaj slobodnog prolina u klijancima suncokreta, pri osmotskom stresu 2,5 % PEG, u prosjeku se povećavao s povećanjem koncentracija donora H_2S, stoga zaključujemo da H_2S stimulativno djeluje na akumulaciju slobodnog prolina u stanici u uvjetima blagog osmotskog stresa. Rezultati upućuju na moguću zaštitnu ulogu H_2S u uvjetima osmotskog stresa, što rezultira povećanjem vigora sjemena.

7. POPIS LITERATURE

1. Apel, K., Hirt, H. (2004.): Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. Annu. Rev. Plant Biology 55: 373–99
2. Asada, K. (1992.): Ascorbate peroxidase: A hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. Physiologia Plantarum, 85: 235–241.
3. Bates, L.S., Waldern, R.P., Teare, I.D. (1973.): Rapid determination of free prolin for water stress studies. Plant and Soil 39, 205-207.
4. Bor, M., Özdemir, F., Türkan, I. (2003.): The effect of salt stress on antioxidants in leaves of sugar beet *Beta vulgaris* L. and wild beet *Beta maritima* L. Plant science 164, 77-84.
5. Caldwell, M. M. (1976.): Root extension and water absorption. Springer Berlin Heidelberg. In Water and plant life, (63-85).
6. Christou, A., Manganaris, G. A., Papadopoulos, I., & Fotopoulos, V. (2013). Hydrogen sulfide induces systemic tolerance to salinity and non-ionic osmotic stress in strawberry plants through modification of reactive species biosynthesis and transcriptional regulation of multiple defence pathways. Journal of experimental botany, 64(7), 1953-1966.
7. Dianzani, M., Barrera, G. (2008.): Pathology and physiology of lipid peroxidation and its carbonyl products: Free radical pathophysiology. Transworld Research Network: Kerala, India, ISBN: 978-81-7895-311-3, 19.
8. Dubravec, K. i Regula, I. (1995.): Fiziologija bilja. Školska knjiga, Zagreb. 212, 219-220.
9. Fališevac, B. (2014.): Diplomski rad: Interakcija sumporovodika i natrij klorida u klijanju sjemena krastavca (*Cucumis sativus* L.). Poljoprivredni fakultet u Osijeku, Osijek, 47 str. Mentor: Miroslav Lisjak.
10. Filipović, I., Lipanović, S. (1995.): Opća i anorganska kemija II. dio: kemijski elementi i njihovi spojevi. Školska knjiga, Zagreb. 709-712.
11. Fu, P., Wang, W., Hou, L., Liu, X. (2013.): Hydrogen sulfide is involved in the chilling stress response in Vitis vinifera L. Acta Societatis Botanicorum Poloniae 82, 259-302.
12. Galić, V. (2014.): Diplomski rad: Fiziološki odgovor klijanaca krastavca (*Cucumis sativus* L.) na tretmane sjemena donorima sumporovodika (H_2S). Poljoprivredni fakultet u Osijeku, Osijek 50 str. Mentor: Miroslav Lisjak.

13. Hancock J.T., Lisjak M., Teklić T., Wilson I.D., Whiteman M. (2011.): Hydrogen sulphide and signalling in plants. CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources 6(12).
14. Heath, R.L., (1968.): Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I-Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. Archives of Biochemistry and Biophysics 125, 189-198.
15. Hernandez, J.A., Ferrer M.A., Jimenez A., Barcelo A.R., Sevilla F. (2001.): Antioxidant systems and O_2 and H_2O_2 production in the apoplast of pea leaves. Its relation with salt-induced necrotic lesons in minor veins. Plant Physiology 127, 817–831.
16. Hernandez, M., Fernandez-Garcia, N., Diaz-Vivancos, P., Olmos E., (2009.): A different role for hydrogen perokside and the antioxidative system under short and long salt stress in *Brassica oleracea* roots. Jorunal of Experimental Botany 61(2), 521-535.
17. Jin, Z.P., Shen, J.J., Qiao, Z.J., Yang, G.D., Wang, R., Pei, Y.X. (2011.): Hydrogen sulfide improves drought resistance in *Arabidopsis thaliana*, Biochemical and Biophysical Research Communications 414, 481–486.
18. Kaya M.D., Okcu G., Atak M., Cikili Y., Kolsarici O. (2006.): Seed treatments to overcome salt and drought stress during germination in sunflower (Helianthus annuus L.). European Journal of Agronomy 24(4), 291-410.
19. Kheder, A.H.A., Mohammad, A.A., Amal, A.A.W., Quick, W.P., Abogadallah, G.M. (2003.): Proline induces the expression of salt stress responsive proteins and may improve the adaptation of *Pancratium maritimum* L. to salt stress. Journal of Experimental Botany 54 (392) 2553-2562.
20. Lee, Z.W., Zhou, J., Chen, C.Z., Zhao, Y., Tan, C.H., Moore, P.K., Deng, L.W. (2011.): The slow releasing hydrogen sulfide donor, GYY4137 exhibits novel anti cancer effects *In vitro* and *In vivo*. Pone Journal 6(6).
21. Lisjak, M. (2012.): Interakcije H_2S i NO u prijenosu signala u listovima uročnjaka (*Arabidopsis thaliana* L.) i paprike (*Capsicum annuum* L.). Sveučilište J.J. Strossmayera, Poljoprivredni fakultet Osijek, Doktorski rad, str. 120.
22. Lisjak, M., Špoljarević, M., Agić, D., Andrić, L. (2009.): Praktikum iz fiziologije bilja. Poljoprivredni fakultet u Osijeku, Osijek.

23. Maghsoudi K., Arvin M. J. (2010.): Salicylic acid and osmotic stress effects on seed germination and seedling growth of wheat (*Triticum aestivum L.*) cultivars. Plant Ecophysiology 2 (7-11).
24. McDonald, M.B. (2000.): Seed priming. In: Seed Technology and Biological Basic. Sheffield Academic Press, England 9, 287-325.
25. Michel B. E., Kaufmann M. R. (1973.): The Osmotic Potential of Polyethylene Glycol 6000. Plant Physiol. (1973) 51, 914-916.
26. Miller, G., Suzuki, N., Ciftci-Yilmaz, S., Mittler, R. (2010.): Reactive oxigen species homeostasis and signalling during drought and salinity stress. Plant, Cell and Environment 33, 453-467.
27. Mukherjee, S.P., Choudhouri, M.A. (1983): Implications of water stress-induced changes in the levels of endogenous ascorbic acid and hydrogen peroxide in Vigna seedlings. Physiologia Plantarum 58, 166- 170.
28. Prabhjot, K. G., Arun, D. S., Prabhjeet, S., Sukdev, S. B. (2002.): Osmotic stress-induced changes in germination, growth and soluble sugar content of *Sorghum bicolor* (L.) moench seeds. Bulg. J. Plant Physiol.,28(3–4), 12–25.
29. Quan LJ., Zhang B., Shi W.W., Li H.Y. (2008.): Hydrogen peroxide in plants: a versatile molecule of the reactive oxygen species network. Journal of Integrative Plant Biology 50, 2–18.
30. Radić V., Vujaković M., Marjanović Jeromela A. (2007.): Uticaj suše na razvoj klijanaca kod različitih genotipova kukutuza (*Zea mays L.*). Journal of Agricultural Sciences Vol. 52, No 2, 131-136.
31. Rennenberg H., Filner P.,(1983.) Developmental changes in the potential for H2S emission in cucurbit plants. Plant Physiology. 71: 269–275.
32. Repetto, M., Semprine, J., Boveris, A. (2012.): Lipid Peroxidation: Chemical mechanism, biological implications and analytical determination. Biochemistry, Genetics and Molecular Biology, ISBN 978-953-51-0716-3: 3-4.
33. Shan, C.J., Zhan, S.L., Li, D.F., Zhao, Y.Z., Tian, X.L., Zhao, X.L., Wu, Y.X., Wei, X.Y., Liu, R.Q. (2011.): Effects of exogenous hydrogen sulfide on the ascorbate and glutathione metabolism in wheat seedlings leaves under water stress. Acta Physiologiae Plantarum 33, 2533–2540.
34. Szabados, L., Savouré, A. (2010.): Proline: a multifunctional amino acid. Trends in plant science 15(2), 89-98.

35. Szekely, G., Abraham, E, Cseplo, A, Rigo, G., Zsigmond, L., Csiszar, J., Ayaydin, F., Strizhov, N., Jasik, J., Schmelzer, E., Koncz, C., Szabados, L. (2008.): Duplicated P5CS genes of Arabidopsis play distinct roles in stress regulation and developmental control of proline biosynthesis. The Plant Journal 53, 11-28.
36. Špoljarević, M., Mihaljević, A., Štolfa, I., Agić, D., Vuković, R., Lisjak, M., Teklić, T. (2014.): Polyethylene glycol 6000 application in the research of osmotic stress in soybean (*Glycine max* (L.) Merr.). Proceedings of 15th Ružička days, Today science tomorrow industry. Ur. Drago Šubarić i Ante Jukić. Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Food Technology Osijek, Croatian Society of Chemical Engineers. 341-352.
37. Vratarić, M. (2004.): Suncokret (*Helianthus annuus* L.). Poljoprivredni institut Osijek, Osijek. 1-8, 15, 23-39, 43-51, 187-209, 217-218, 407.
38. Vukadinović, V. i Vukadinović, V. (2011.): Ishrana bilja. Poljoprivredni fakultet u Osijeku, Osijek. 181-185.
39. Wang, R. (2012.) Physiological implications of hydrogen sulfide: a whiff exploration that blossomed. Physiological Review, Department of Biology, Lakehead University, Thunder Bay, Ontario, Canada. 92, 791– 896.
40. Wang, Y.Q., Li, L., Cui, W.T., Xu, S., Shen, W.B., Wang, R. (2011.): Hydrogen sulfide enhances alfalfa (Medicago sativa) tolerance against salinity during seed germination by nitric oxide pathway. Plant Soil 351, 107–119.
41. Yasar, F., Ellialtioglu, S., Yildiz, K. (2008.): Effect of salt stress on antioxidant defense systems, lipid peroxidation, and chlorophyll content in green bean. Russian Journal of Plant Physiology 55(6), 869-873.
42. Zhang, H., Jiao, H., Jiang, C. X., Wang, S. H., Wei, Z. J., Luo, J. P., Jones, R. L. (2010): Hydrogen sulfide protects soybean seedlings against drought-induced oxidative stress. Acta physiologiae plantarum, 32(5), 849-857.

8. SAŽETAK

Sumporovodik (H_2S) kao signalna molekula ima veliku značajnost u odgovoru na biotski i abiotski stres. Cilj istraživanja je bio utvrditi utjecaj primiranja sjemena suncokreta (*Helianthus annuus* L.) otopinama natrij hidrogen sulfida (NaHS) rastućih koncentracija (100, 500, 1000 i 1500 μM) te vodom, na pokazatelje vigora i molekularne pokazatelje stresa u klijancima naklijavanim na različitim otopinama PEG-6000 (H_2O; 2,5 %; 5 %; 10 %). Tretmani s NaHS, su u prosjeku za sve varijante osmotskog stresa povećali klijavost. Na 5 % PEG primiranje s NaHS je rezultiralo povećanjem energije klijanja kod svih koncentracija primijenjenog donora H_2S. U usporedbi s sjemenom primiranim u vodi i ne primiranim sjemenom, tretmani s NaHS su rezultirali povećanjem mase klijanaca. Pri najvišoj razini osmotskog stresa, osmoprimiranje sjemena s NaHS je smanjilo razinu lipidne peroksidacije. U klijancima suncokreta, čije sjeme je prethodno primirano otopinama NaHS, a potom naklijavano na vodi, utvrđen je smanjeni sadržaj vodikovog peroksida. Sadržaj slobodnog prolina, pri osmotskom stresu 2,5 % PEG, u prosjeku se povećavao s povećanjem koncentracije NaHS. Dobiveni rezultati upućuju na stimulativno djelovanje H_2S na klijavost i masu klijanaca. Povećana akumulacija slobodnog prolina u stanici te smanjenje lipidne peroksidacije i vodik peroksida upućuje na moguću zaštitnu ulogu ovog spoja u uvjetima osmotskog stresa. Djelovanje različitih koncentracija NaHS pri pojedinim razinama stresa je bilo različito, stoga su potrebna daljnja istraživanja uloge H_2S u uvjetima osmotskog stresa.

9. SUMMARY

Hydrogen sulfide (H_2S) as a signaling molecule has a great significance in response to biotic and abiotic stress. The aim of the research was to determine the effect of seed priming of sunflower (*Helianthus annuus* L.) with increasing concentrations of sodium hydrogen sulfide (NaSH) solutions (100, 500, 1000 and 1500 μM), on the indicators of seed vigor and molecular indicators of stress, in seedlings germinated on different solutions of PEG-6000 (H_2O; 2.5 %; 5 %; 10 %). In average for all the osmotic stress levels, treatments with NaSH increased germination capacity. At 5 % of PEG, priming with NaSH resulted in increased germination capacity at each concentration of the H_2S donors applied. As compared to the water primed or non primed seed, treatments with NaSH increased mass of seedlings. At the highest level of osmotic stress NaSH reduced the level of lipid peroxidation. In seedlings grown from the seed pre treated with NaSH solutions and germinated on water, reduced content of hydrogen peroxide was observed. Content of free proline at 2.5 % PEG, increased with increasing concentrations of NaSH. The results suggest a stimulatory effect of H_2S on the germination capacity and seedling weight. The increased accumulation of free proline, decreased lipid peroxidation levels and hydrogen peroxide content, indicating a possible protective role of H_2S in seedlings, grown under osmotic stress. The effect of different concentrations of NaSH at certain levels of stress were different, hence further research on the role of H_2S under conditions of osmotic stress is needed.

10. POPIS TABLICA

Tablica 1. Sistematika suncokreta (*Helianthus annuus L.*) (Stranica 1.)

Tablica 2. Hranidbena vrijednost suncokretata (Stranica 3.)

Tablica 3. Značajnost utjecaja osmoprimiranja sjemena s rastućim koncentracijama NaHS (Bez primiranja; H_2O; 100 μM NaHS; 500 μM NaHS; 1000 μM NaHS; 1500 μM NaHS) i više razina osmotskog stresa u klijanju (H_2O; 2,5 % PEG; 5 % PEG; 10 % PEG) te njihovih interakcija na energiju klijanja (EK), standardnu klijavost (SK), broj ne isklijanih sjemenki (NI), broj mrtvih sjemenki (MS) (%) i masu klijanaca (mK) (g). (Stranica 19.)

Tablica 4. Značajnost utjecaja osmoprimiranja sjemena s rastućim koncentracijama NaHS (Bez primiranja; H_2O; 100 μM NaHS; 500 μM NaHS; 1000 μM NaHS; 1500 μM NaHS) i više razina osmotskog stresa u klijanju (H_2O; 2,5 % PEG; 5 % PEG; 10 % PEG) te njihovih interakcija na razinu lipidne peroksidacije (TBARS), sadržaj vodikovog peroksida (HP) (nmol g Sv.T.) i prolina (PRO) (μmol g Sv.T.), u hipokotilima klijanaca. (Stranica 21.)

Tablica 5. Značajnost utjecaja osmotskog stresa u klijanju (H_2O; 2,5 % PEG; 5 % PEG; 10 % PEG) na energiju klijanja (EK), standardnu klijavost (SK), broj ne isklijanih sjemenki (NI), broj mrtvih sjemenki (MS) (%) i masu klijanaca (mK) (g) po varijantama osmoprimiranja sjemena s rastućim koncentracijama NaHS (Bez primiranja; H_2O; 100 μM NaHS; 500 μM NaHS; 1000 μM NaHS; 1500 μM NaHS). (Stranica 23.)

Tablica 6. Značajnost utjecaja osmotskog stresa u klijanju (H_2O; 2,5 % PEG; 5 % PEG; 10 % PEG) na razinu lipidne peroksidacije (TBARS), sadržaj vodikovog peroksida (HP) (nmol g Sv.T.) i prolina (PRO) (μmol g Sv.T.), u hipokotilima klijanaca, po varijantama osmoprimiranja sjemena s rastućim koncentracijama NaHS (Bez primiranja; H_2O; 100 μM NaHS; 500 μM NaHS; 1000 μM NaHS; 1500 μM NaHS). (Stranica 26.)

Tablica 7. Značajnost utjecaja osmoprimiranja sjemena s rastućim koncentracijama NaHS (Bez primiranja; H_2O; 100 μM NaHS; 500 μM NaHS; 1000 μM NaHS; 1500 μM NaHS) na energiju klijanja (EK), standardnu klijavost (SK), broj ne isklijanih sjemenki (NI), broj mrtvih sjemenki (MS) (%) i masu klijanaca (mK) (g), po varijantama osmotskog stresa u klijanju (H_2O; 2,5 % PEG; 5 % PEG; 10 % PEG). (Stranica 29.)

Tablica 8. Značajnost utjecaja osmoprimiranja sjemena s rastućim koncentracijama NaHS (Bez primiranja; H_2O; 100 μM NaHS; 500 μM NaHS; 1000 μM NaHS; 1500 μM NaHS) na razinu lipidne peroksidacije (TBARS), sadržaj vodikovog peroksida (HP) (nmol g Sv.T.) i prolina (PRO) (μmol g Sv.T.), u hipokotilima klijanaca, po varijantama osmotskog stresa u klijanju (H_2O; 2,5 % PEG; 5 % PEG; 10 % PEG). (Stranica 31.)

11. POPIS SLIKA

Slika 1. Suncokret (*Helianthus annuus* L.) http://vapakol.ru/wpcontent/uploads/2012/07/podsolnechnik-226x300.jpg/Pristupljeno: 06.04.2015. (Stranica 2.)

Slika 2. Ciklus sumpora u prirodi (Stranica 4.)

Slika 3. Klijanci suncokreta sorte „*Luka*“ stari osam dana (Stranica 15.)

Slika 4. Otapanje supernatanta s 2M H_2SO_4 kod određivanja sadržaja vodikovog peroksida (Stranica 26.)

Slika 5. Određivanje intenziteta lipidne peroksidacije (Stranica 17.)

Slika 6. Inkubirani i ohlađeni uzorci kod utvrđivanja sadržaja slobodnog prolina (Stranica 18.)

Slika 7. Zaštitna uloga NaHS u klijanju sjemena u uvjetima osmotskog stresa (Zhang i sur. 2010.) (Stranica 35.)

Slika 8. Efekt NaHS na sadržaj vodikovog peroksida (a) i razinu lipidne peroksidacije (b) u sjemenu (Zhang i sur. 2010.) (Stranica 40.)

12. POPIS GRAFIKONA

Grafikon 1. Utjecaj različitih varijanti osmoprimiranja sjemena suncokreta s rastućim koncentracijama NaHS na postotak energije klijanja (EK) i standardne klijavosti (SK). Prikazani rezultati su prosjek za sve varijante osmotskog stresa u klijanju. (Stranica 34.)

Grafikon 2. Masa klijanaca u gramima (g) prikazana po varijantama osmoprimiranja (NaHS) sjemena suncokreta. Prikazani rezultati su prosjek za sve varijante osmotskog stresa u klijanju. (Stranica 36.)

Grafikon 3. Osmotski stres pri 5 % PEG. Utjecaj različitih koncentracija osmoprimiranja sjemena (NaHS) na postotak energije klijanja i standardne klijavosti. (Stranica 37.)

Grafikon 4. Utjecaj osmotskog stresa pri 5 % PEG. Masa klijanaca u gramima (g) prikazana po varijantama osmoprimiranja sjemena suncokreta donorom NaHS. (Stranica 38.)

Grafikon 5. Intenzitet lipidne peroksidacije (nmol g^{-1} Sv.T.). Utjecaj različitih varijanti osmoprimiranja sjemena (NaHS) na postotak osmotskog stresa u klijanju. (Stranica 39.)

Grafikon 6. Vodikov peroksid (nmol g^{-1} Sv.T.). Utjecaj različitih varijanti osmoprimiranja sjemena suncokreta s rastućim koncentracijama NaHS na postotak osmotskog stresa u klijanju. (Stranica 41.)

Grafikon 7. Utjecaj osmotskog stresa pri 2,5 % PEG na sadržaj slobodnog prolina (μmol g^{-1} Sv.T.) prikazan po varijantama primiranja sjemena s donorom H_2S. (Stranica 42.)

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera **Diplomski rad**
Poljoprivredni fakultet u Osijeku
Sveučilišni diplomski studij, smjer Povrćarstvo i cvjećarstvo

UTJECAJ SUMPOROVODIKA NA VIGOR SJEMENA SUNCOKRETA (*Helianthus annuus* L.) PRI SUŠNOM STRESU

Andreja Serini

Sažetak:
Sumporovodik (H_2S) kao signalna molekula ima veliku značajnost u odgovoru na biotski i abiotski stres. Cilj istraživanja je bio utvrditi utjecaj primiranja sjemena suncokreta (Helianthus annuus L.) otopinama natrij hidrogen sulfida (NaHS) rastućih koncentracija (100, 500, 1000 i 1500 μM) te vodom, na pokazatelje vigora i molekularne pokazatelje stresa u klijancima naklijavanim na različitim otopinama PEG-6000 (H_2O; 2,5 %; 5 %; 10 %). Tretmani s NaHS, su u prosjeku za sve varijante osmotskog stresa povećali klijavost. Na 5 % PEG primiranje s NaHS je rezultiralo povećanjem energije klijanja kod svih koncentracija primijenjenog donora H_2S. U usporedbi s sjemenom primiranim u vodi i ne primiranim sjemenom, tretmani s NaHS su rezultirali povećanjem mase klijanaca. Pri najvišoj razini osmotskog stresa, osmoprimiranje sjemena s NaHS je smanjilo razinu lipidne peroksidacije. U klijancima suncokreta, čije sjeme je prethodno primirano otopinama NaHS, a potom naklijavano na vodi, utvrđen je smanjeni sadržaj vodikovog peroksida. Sadržaj slobodnog prolina, pri osmotskom stresu 2,5 % PEG, u prosjeku se povećavao s povećanjem koncentracije NaHS. Dobiveni rezultati upućuju na stimulativno djelovanje H_2S na klijavost i masu klijanaca. Povećana akumulacija slobodnog prolina u stanici te smanjenje lipidne peroksidacije i vodik peroksida upućuje na moguću zaštitnu ulogu ovog spoja u uvjetima osmotskog stresa. Djelovanje različitih koncentracija NaHS pri pojedinim razinama stresa je bilo različito, stoga su potrebna daljnja istraživanja uloge H_2S u uvjetima osmotskog stresa.

Rad je izrađen pri: Poljoprivredni fakultet u Osijeku

Mentor: doc.dr.sc. Miroslav Lisjak

Broj stranica: 54
Broj slika i grafikona: 15
Broj tablica: 8
Broj literaturnih navoda: 42
Broj priloga: 0
Jezik izvornika: Hrvatski
Ključne riječi: H_2S, NaHS, PEG, osmoprimiranje, suncokret, sjeme
Datum obrane:
Stručno povjerenstvo za obranu
1. prof.dr.sc. *Tihana Teklić*, predsjednik
2. doc.dr.sc. *Miroslav Lisjak*, mentor
3. doc.dr.sc. *Tomislav Vinković*, član

Rad je pohranjen u: Knjižnica Poljoprivrednog fakulteta u Osijeku, Sveučilište u Osijeku, Kralja Petra Svačića 1d.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek **Graduate thesis**
Faculty of Agriculture University
University Graduate Studies, course Vegetable and flower growing

INFLUENCE OF HYDROGEN SULFIDE ON SUNFLOWER (*Helianthus annuus* L.) SEED VIGOR IN DROUGHT STRESS

Andreja Serini

Summary:
Hydrogen sulfide (H_2S) as a signaling molecule has a great significance in response to biotic and abiotic stress. The aim of the research was to determine the effect of seed priming of sunflower (Helianthus annuus L.) with increasing concentrations of sodium hydrogen sulfide (NaSH) solutions (100, 500, 1000 and 1500 μM), on the indicators of seed vigor and molecular indicators of stress, in seedlings germinated on different solutions of PEG-6000 (H_2O; 2.5 %; 5 %; 10 %). In average for all the osmotic stress levels, treatments with NaSH increased germination capacity. At 5 % of PEG, priming with NaSH resulted in increased germination capacity at each concentration of the H_2S donors applied. As compared to the water primed or non primed seed, treatments with NaSH increased mass of seedlings. At the highest level of osmotic stress NaSH reduced the level of lipid peroxidation. In seedlings grown from the seed pre treated with NaSH solutions and germinated on water, reduced content of hydrogen peroxide was observed. Content of free proline at 2.5 % PEG, increased with increasing concentrations of NaSH. The results suggest a stimulatory effect of H2S on the germination capacity and seedling weight. The increased accumulation of free proline, decreased lipid peroxidation levels and hydrogen peroxide content, indicating a possible protective role of H_2S in seedlings, grown under osmotic stress. The effect of different concentrations of NaSH at certain levels of stress were different, hence further research on the role of H_2S under conditions of osmotic stress is needed.

Thesis performed at: Faculty of Agriculture in Osijek

Mentor: PhD Miroslav Lisjak, assistant professor

Number of pages: 54
Number of figures: 15
Number of tables: 8
Number of references: 42
Number of appendices: 0
Original in: Croatian
Key words: H_2S, NaSH, PEG, priming, sunflower, seed
Thesis defended on date:
Reviewers:
1. PhD *Tihana Teklić*, full professor
2. PhD *Miroslav Lisjak*, assistant professor
3. PhD *Tomislav Vinković*, assistant professor

Thesis deposited at: Library, Faculty of Agriculture in Osijek, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Kralja Petra Svačića 1d.