

UNIVERZITET U BEOGRADU
BIOLOŠKI FAKULTET

Bojana R. Živanović

Uticaj ciklusa suše na metabolizam ugljenih hidrata i antioksidanata kod divljeg tipa i *flacca* mutanta paradajza (*Lycopersicum esculentum* Mill.) gajenih na različitim svetlosnim režimima

doktorska disertacija

Beograd, 2022.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF BIOLOGY

Bojana R. Živanović

**Influence of drought cycles on carbohydrates
and antioxidants metabolism in tomato
(*Lycopersicum esculentum* Mill.) wild-type
and *flacca* mutant grown under different light
regimes**

Doctoral Disertation

Belgrade, 2022.

Mentori:

dr Sonja Veljović Jovanović, naučni savetnik
Univerzitet u Beogradu, Institut za multidisciplinarna istraživanja

dr Ljiljana Prokić, vanredni profesor
Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet

Članovi komisije za ocenu doktorske disertacije:

dr Tijana Cvetić Antić, vanredni profesor
Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet

dr Angelina Subotić, naučni savetnik
Univerzitet u Beogradu, Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju

dr Sonja Milić Komić, naučni saradnik
Univerzitet u Beogradu, Institut za multidisciplinarna istraživanja

Datum odbrane:

Ova doktorska disertacija urađena je u laboratoriji Odseka za nauku o živim sistemima Instituta za multidisciplinarna istraživanja Univerziteta u Beogradu i u laboratoriji Katedre za agrohemiju i fiziologiju biljaka Poljoprivrednog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

Ovom prilikom želim da izrazim zahvalnost:

Mentoru dr Sonji Veljović Jovanović veliko hvala na ukazanom poverenju, nesebično prenetom znanju, požrtvovanosti, korisnim sugestijama tokom eksperimentalnog rada, kao i stručnoj pomoći prilikom pisanja naučnih radova i disertacije. Hvala što svakodnevno podstičete da svakom izazovu pristupim kritički i otvorenog uma.

Mentoru prof. dr Ljiljani Prokić mnogo hvala na izdvojenom vremenu i uloženom trudu, strpljenju, ogromnoj pomoći u eksperimentalnom radu i korisnim savetima i pomoći prilikom pisanja naučnih radova i disertacije.

Prof. dr Tijani Cvetić Antić hvala na velikoj podršci i pomoći tokom doktorskih studija, na pažljivom čitanju i savetima koje su mi pomogli u pisanju disertacije.

Zahvaljujem dr Angelini Subotić na kritičkoj analizi i korisnim sugestijama tokom pisanja disertacije.

Posebno zahvaljujem dr Sonji Milić Komić za veliku pomoć u eksperimentalnom radu i pisanju naučnih radova, na savetima, prenesenom znanju, podršci i optimizmu. Hvala na pažljivom čitanju i korisnim sugestijama u toku pisanja disertacije.

Veliko hvala dr Mariji Vidović iz Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo za preneseno znanje, podršku, korisne savete i pomoć u pisanju naučnih radova. Hvala na pomoći u analizi fenolnih jedinjenja.

Iskreno zahvaljujem Ani Sedlarević Zorić i Jeleni Dumanović na velikoj pomoći u eksperimentalnom radu, podršci, optimizmu, prijateljstvu i što su ulepšale vreme provedeno u Institutu tokom izrade ove teze.

Hvala dr Filis Morina (Institut za biljnu molekularnu biologiju Češke akademije nauka, Češke Buđejovice), sa kojom sam napravila prve korake u naučnoistraživačkom radu, za svo preneseno znanje.

Zahvaljujem dr Jelici Lazarević iz Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković” i dr Dragosavu Mutavdžiću na prenesenom znanju, savetima i konkretnoj pomoći u statističkoj obradi podataka.

Hvala kolegama dr Tatjani Srećković i Nenadu Nikoliću na snimanju uzoraka i pomoći pri obradi FTIR spektara.

Hvala dr Tomislavu Tostiju sa Hemijskog fakulteta na pomoći u analizi rastvornih ugljenih hidrata, kao i prof. dr Mirjani Pešić sa Poljoprivrednog fakulteta na pomoći u analizi malih RNK molekula.

Svim kolegama sa Odseka za nauku o živim sistemima, posebno Mileni, Milošu, Sanji, Nikoli i Aleksandri, hvala što su učinili lepim vreme provedeno u Institutu tokom izrade ove teze. Hvala mojim prijateljima i kolegamicama sa doktorskih studija Danijeli i Jeleni za podršku, optimizam i smeh tokom svih ovih godina.

Beskrajno hvala svim mojim prijateljima što su bili uz mene sve ovo vreme.

Posebnu zahvalnost upućujem svojim roditeljima i sestri za svu ljubav, podršku i razumevanje.

Autor

Uticaj ciklusa suše na metabolizam ugljenih hidrata i antioksidanata kod divljeg tipa i *flacca* mutanta paradajza (*Lycopersicon esculentum* Mill.) gajenih na različitim svetlosnim režimima

Sažetak

Stres suše, u kombinaciji sa svetlošću visokog intenziteta zračenja, predstavlja jedan od najrasprostranjenijih abiotskih faktora koji ima negativan uticaj na rastenje i prinos biljaka. U cilju ispitivanja uticaja sniženog nivoa apscisinske kiseline (ABA) na razvijanje strategija neophodnih za toleranciju biljaka na sušu, u ovom istraživanju korišćena su dva genotipa paradajza sa konstitutivno različitim sadržajem ABA, divlji tip Ailsa Craig i *flacca* mutant. Biljke su gajene na svetlosti nižeg i višeg intenziteta i bile podvrgnute jednom, odnosno trima ciklusima suše, koji su bili praćeni periodima rehidratacije. Uticaj suše i rehidratacije praćen je na morfološkom (sveža i suva masa, površina listova) i fiziološkom nivou (provodljivost stoma, ukupni vodni potencijal), kao i primenom biohemijskih (određivanje ugljenih hidrata, aminokiselina, askorbata) i molekularnih metoda (praćenje ekspresije gena uključenih u metabolizam ABA i određivanje ekspresije nekodirajućih RNK molekula).

Rezultati prikazani u ovoj disertaciji pokazali su da je održavanje homeostaze ABA od presudnog značaja za rastenje i razviće paradajza i u uslovima optimalnog vodnog režima, kao i da je *flacca* mutant pogodan model sistem za proučavanje uticaja smanjene akumulacije ABA na razvoj strategija za razvijanje tolerancije biljaka na sušu.

Pokazano je da akumulacija osmotski aktivnih jedinjenja kod oba genotipa, kao i promene na morfološkom nivou značajno doprinose razvoju mehanizama tolerancije paradajza na sušu.

Izlaganje biljaka ciklusima suše indukovalo je promene u akumulaciji antioksidativnih komponenti (askorbat i epidermalni flavonoidi), strukturi ćelijskog zida, ali i u ekspresiji nekodirajućih RNK molekula, što potencijalno može doprineti razvijanju memorije kod paradajza na ponovljeni stres suše.

Ključne reči: *flacca* mutant, apscisinska kiselina, ciklusi suše, rehidratacija, memorija, ugljeni hidrati, aminokiseline, askorbat, ćelijski zid, nekodirajuće RNK

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Fiziologija biljaka

UDK broj:

Influence of drought cycles on carbohydrates and antioxidants metabolism in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) wild-type and *flacca* mutant grown under different light regimes

Abstract

Drought stress combined with high light intensity is one of the most common abiotic factors that have a negative impact on plant growth and yield. In order to examine the effect of reduced abscisic acid (ABA) level in the development strategies necessary for drought tolerance in plants, tomato genotypes with constitutively different ABA content, wild type Ailsa Craig and *flacca* mutant, were used in this study. Plants grown on either lower or higher light intensity were subjected to one or three drought cycles, followed by periods of rehydration. The impact of drought and rehydration was monitored on morphological (fresh and dry weight, leaf area) and physiological level (stomatal conductivity, leaf water potential), and by measuring biochemical (carbohydrates, amino acids, ascorbate) and molecular parameters (expression of genes involved in ABA metabolism and expression of noncoding RNA molecules).

The results obtained in this dissertation showed that maintaining ABA homeostasis is crucial for tomato growth and development, even in optimal water regimes, and also that *flacca* mutant is a suitable model system for studying the impact of reduced ABA accumulation in development of drought tolerance strategies.

It has been noticed that morphological changes and osmolyte accumulation in both genotypes significantly contribute in developing drought tolerance mechanisms of tomato plants.

Exposure of plants to several drought cycles has induced changes in the accumulation of antioxidant components (ascorbate and epidermal flavonoids), cell wall structure, but also in the expression of non-coding RNA molecules, which could potentially contribute to memory development in tomatoes.

Keywords: *flacca* mutant, abscisic acid, drought cycles, rehydration, memory, carbohydrates, amino acids, ascorbate, cell wall, noncoding RNAs

Scientific field: Biology

Scientific subfield: Plant physiology

UDC number:

Skraćenice

•OH	hidroksil-radikal
•OH ₂	hidroperoksil-radikal
¹ O ₂	singletni kiseonik
AA	akrilamid
AAO	ABA-aldehid oksidaza
ABA	apscisinska kiselina
ABA2	alkoholna dehidrogenaza
ABA-GE	ABA-glukozne estre
ABC	eng. <i>ATP-binding cassette</i>
ABI1	eng. <i>ABA-insensitive 1</i>
ABI2	eng. <i>ABA-insensitive 2</i>
ABI4	eng. <i>ABA-insensitive 4</i>
AGP	arabinogalaktanski proteini
AIT1	eng. <i>ABA-IMPORTING TRANSPORTER 1</i>
Ala	alanin
ANOVA	analiza varijanse
AO	askorbat oksidaza
APX	askorbat-peroksidaza
Ara	arabinoza
AREB	(eng. <i>ABA-responsive elements-binding proteins</i>)
Arg	arginin
Asc	redukovani askorbat
Asc-GSH	askorbat-glutation ciklus
Asn	asparagin
Asp	asparaginska kiselina
ATP	adenozin 3-fosfat
BCAA	aminokiseline razgranatog lanca (eng. <i>branched-chain amino acids</i>)
BCAT	eng. <i>branched-chain amino acid aminotransferase</i>
bisAA	bis-akrilamid
BSA	goveđi serum-albumin, eng. <i>bovine serum albumin</i>
CA	kafeinska kiselina
CBF4	eng. <i>C-repeat/drought-responsive element binding factor</i>
CGA	hlorogena kiselina
CO ₂	ugljen-dioksid
CRT	eng. <i>C-repeat</i>
Cy	cijanidin
DHA	dehidroaskorbat
DHAR	dehidroaskorbat reduktaze
DNK	dezoksiribonukleinska kiselina
DPA	dihidrofazeinska kiselina
DRE	eng. <i>rehydration responsive element</i>
DRIR	sušom indukovana dugačka nekodirajućaRNK (eng. <i>drought induced lncRNA</i>)
DTX/MATE	eng. <i>detoxification efflux carriers/multidrug and toxic compound extrusion</i>
DW	suva masa (eng. <i>dry weight</i>)
EDTA	etilendiamintetra sirćetna kiselina
ELISA	eng. <i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
ER	endoplazmatični retikulum
ETF/ETFQO	flavoprotein/elektron-transfer flavoprotein-ubihinon oksidoreduktazni put

EXLA	proteini nalik ekspanzinu A (eng. <i>expansin-like A</i>)
EXLB	proteini nalik ekspanzinu B (eng. <i>expansin-like B</i>)
EXPAs	α -ekspanzini
EXPBs	β -ekspanzini
EXT	ekstenzini
FA	ferulinske kiseline
flc	<i>flacca</i> mutant
Fru	fruktoza
FTIR	Infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom (eng. <i>Fourier-transform infrared</i>)
FW	sveža masa (eng. fresh weight)
Gal	galaktoza
Glc	glukoza
GDP-Man	guanozin-difosfat-manoza
GGPP	geranil-geranil pirofosfat
Gln	glutamin
Glu	glutaminska kiselina
GR	glutation-reduktaze
g _s	provodljivost stoma
GSH	redukovani glutation
GSSG	glutation-disulfid, oksidovani glutation
GT	glukozil-transferaze
Gly	glicin
H/PRP	proteini bogati hidroksiprolinom i prolinom
H ₂ O ₂	vodonik peroksid
HBA	hidroksibenzojeva kiselina
HCA	hidroksicimetna kiselina
HPLC	tečna hromatografija visokih performansi (eng. <i>high performance liquid chromatography</i>)
HRGP	O-glikoproteini bogati hidroksiprolinom (eng. <i>hydroxyproline-rich O-glycoproteins</i>)
IC	infracrvena spektroskopija
Ile	izoleucin
IPP	izopentenil-pirofosfat
K	kampferol
K _{in}	kanal za unos kalijuma
KAT1	kanala za ulazak kalijuma u ćeliju
KOH	kalijum hidroksid
K _{out}	spoljašnji ispravljajući kanali
LA	lisna površina
LEA	proteini zastupljeni u kasnoj fazi embriogeneze (eng. <i>late embryogenesis abundant proteins</i>)
Leu	leucin
Lys	lizin
Mal	maltoza
Malt	maltotrioza
MAPK	mitogen aktivirajuće protein kinaze
MDHA	mono-dehidroaskorbat
MDHAR	mono-dehidroaskorbat reduktaza
Mel	melibioza
MEP	metileritriol-fosfatni put

miRNK	mikro RNK
MPA	<i>meta</i> -fosforna kiselina
MVA	mevalonski put
MYB	eng. <i>myeloblastosis related proteins</i>
MYC	eng. <i>myelocytomatosis related proteins</i>
NAC	eng. <i>dual regulator of nitrogen assimilation</i>
NAD	nikotinamid adenin dinukleotida
NAD(P)H	nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
NADH	nikotinamid-adenindinukleotid redukovani
NBI	azotni indeks
NCED	9- <i>cis</i> -epoksikarotenoid dioksidgenaza
NF-Y	eng. <i>nuclear factor Y</i>
nkRNK	nekodirajući RNK molekuli (eng. <i>non-coding RNAs</i>)
NO	azot monoksid
NPF	nitratni transporter
NRT1/PRT	eng. <i>nitrate transporter1/peptide transporter</i>
NYS	neoksantin sintaza
O ₂ ⁻	superoksid-anjon-radikal
OAT	ornitin δ-aminotransferaze
OPA	<i>o</i> -ftalaldehid
<i>o</i> -PDA	<i>orto</i> -fenilendiamin
OST1	eng. <i>SnRK2.6/Open Stomata1</i>
Orn	ornitin
P5C	Δ-1-pirolidin-5-karboksilat
P5CR	P5C reduktaza
P5CS	Δ-1-pirolin-5-karboksilat-sintetaza
PA	fazeinska kiselina
PAGE	poliakrilamidna gel elektroforeza
PAL	fenilalanin-amonijum liaza
Pan	panoza
PCA	analiza glavnih komponenti (eng. <i>principal component analysis</i>)
PBS	fosfatom puferisani fiziološki rastvor
<i>p</i> -CA	<i>p</i> -kumarna kiselina
PCR	lančana reakcija polimerazacije (eng. <i>polymerase chain reaction</i>)
PEG	polietilglikol
Phe	fenilalanin
PP2C	proteinska fosfataza 2C
PRD	delimično sušenje korenovog sistema (eng. <i>partial root-zone drying</i>)
Pro	prolin
PSI	fotosistem I
PSII	fotosistem II
PVP	polivinilpirolidon
PYR/PYL/RCAR	eng. <i>Pyrabactin Resistance 1/Pyrabactin Resistance 1-like PYR/PYL, Receptor Component of the ABA receptor – RCAR</i>
Q	kvercetin
Raf	rafinoza
RDI	regulisani deficit navodnjavanja (eng. <i>regulated deficit irrigation</i>)
RH	relativna vlažnost vazduha (eng. <i>relative humidity</i>)
Rham	ramnoza
RNK	ribonukleinska kiselina
RNS	reaktivne azotne vrste (eng. <i>reactive nitrogen species</i>)

ROO•	peroksil-radikal
ROS	reaktivne kiseonične vrste (eng. <i>reactive oxygen species</i>)
Rubisco	ribulozo-1,5-bifosfat karboksilaza/oksigenaza
RWC	relativni sadržaj vode (eng. <i>relative water content</i>)
SDS	natrijum-dodecil-sulfat (eng. <i>sodium dodecylsulphate</i>)
SE	standardna greška
Ser	serin
siRNK	male intenzivirajuće RNK, eng. <i>small interfering RNAs</i>
SLA	specifična lisna površina
SLAC1	anjonski kanal (S, eng. <i>slow</i>)
snoRNA	male nukleolarne RNK, eng. <i>small nucleolar RNAs</i>
SnRK	eng. <i>sucrose non-fermenting related kinase</i>
snRNK	male nuklearne RNK, eng. <i>small nuclear RNAs</i>
SOD	superoksid-dismutaza
Sor	sorbitol
Stach	stahioza
Suc	saharoza
SWC	volumetrijski sadržaj vode u zemljištu
SWI/SNF,	eng. <i>switch/non-fermenting</i>
SyA	siringinska kiselina
TEMED	N,N,N',N'-tetrametil-etan-1,2-diamin
Thr	treonin
TOR	eng. <i>target of rapamycin</i>
Tre	trehaloza
Tris	tris(hidroksimetil)-aminometan
tRNK	eng. <i>transfer RNK</i>
Tyr	tirozin
UGT	eng. <i>uridine diphosphate glucosyltransferases</i>
ψ	ukupni vodni potencijal
UPLC	tečna hromatografija ultravisokih performansi
UV	ultraljubičasto zračenje, elektromagnetno zračenje u opsegu: 200 - 400 nm
UV-B	oblast UV zračenja od 280 - 315 nm
v	zapreminski udeo
Val	valin
VDE	violaksantin de-epoksidaza
VIS	vidljiva oblast spektra elektromagnetnog zračenja (400 - 770 nm)
w	maseni udeo
WT	divlji tip
Xyl	ksiloza
ZEP	zeaksantin epoksidaza
ZIP	eng. <i>zink finger proteins</i>

Sadržaj

1. Uvod	1
1.1. Ponovljeni stres suše i memorija kod biljka	1
1.2. Efekti suše na morfološke, fiziološke, biohemijske i molekularne promene kod biljaka	3
1.2.2. Fiziološke i biohemijske promene indukovane sušom	5
1.2.3. Promene na molekularnom nivou kod biljaka indukovane sušom.....	7
1.3. Metabolizam abscisinske kiseline u suši	8
1.3.1. Biosinteza i katabolizam ABA	8
1.3.2. ABA signalni put i mehanizam zatvaranja stoma	10
1.4. Mehanizmi otpornosti biljaka na stres suše	12
1.4.1. Tolerancija biljaka prema suši	13
1.5. Antioksidativna zaštita u uslovima suše	17
1.5.1. Fenolna jedinjenja.....	17
1.5.2. Karotenoidi.....	17
1.5.3. Askorbat.....	17
1.5.4. Glutation	18
1.6. Ćelijski zid	19
1.7. Paradajz i suša.....	21
1.7.1. ABA deficijentni mutanti paradajza.....	22
2. Ciljevi istraživanja.....	26
3. Materijal i metode	27
3.1. Biljni materijal.....	27
3.1.1. Postavka ogleda.....	27
3.2. Dizajn eksperimenta.....	27
3.2.1. Eksperimentalni sistem sa jednim ciklusom suše i rehidracijom.....	27
3.2.2. Eksperimentalni sistem sa tri ciklusa suše i rehidracija	29
3.3. Merenje morfoloških i fizioloških parametara kod biljaka.....	31
3.4. Merenje biohemijskih parametara	32
3.4.1. Određivanje sadržaja abscisinske kiseline (ABA) u listovima paradajza	32
3.4.2. Ekstrakcija i kvantifikacija rastvornih ugljenih hidrata u listovima	33
3.4.3. Ekstrakcija i analiza slobodnih aminokiselina u listovima paradajza	34
3.4.4. Ekstrakcija i spektrofotometrijsko određivanje koncentracije prolina u listovima paradajza	35
3.4.5. Ekstrakcija i kvantifikacija sadržaja fenolnih jedinjenja u listovima paradajza	35
3.4.6. Ekstrakcija i kvantifikacija ukupnog sadržaja askorbata u listovima paradajza i određivanje njegovog redoks statusa.....	36

3.4.7.	Ekstrakcija i kvantifikacija sadržaja karboksilnih kiselina u listovima paradajza	36
3.5.	Molekularno biološke metode.....	37
3.5.1.	Izolacija ukupne RNK.....	37
3.5.2.	Sinteza komplementarne DNK (cDNK) i primena Real Time –PCR	37
3.5.3.	Izolacija i detekcija nekodirajućih malih RNK molekula	38
3.6.	Denzitometrijska analiza sRNA traka.....	39
3.7.	Izolacija i prečišćavanje ćelijskog zida listova paradajza	39
3.8.	FTIR spektroskopija.....	39
3.9.	Statistička obrada podataka	40
4.	Rezultati.....	41
4.1.	Uticao jednog ciklusa suše na morfološke i metaboličke promene kod listova divljeg tipa paradajza i <i>flacca</i> mutanta gajenih na intenzitetu svetlosti 250 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	41
4.1.1.	Sadržaj ABA	41
4.1.2.	Provodljivost stoma i ukupni vodni potencijal.....	41
4.1.3.	Uticao suše i rehidracije na rastenje biljaka paradajza	42
4.1.4.	Uticao suše i rehidracije na sadržaj rastvornih ugljenih hidrata u listovima	43
4.1.5.	Uticao suše na sadržaj karboksilnih kiselina	48
4.1.6.	Uticao suše i rehidracije na sadržaj slobodnih aminokiselina	48
4.1.7.	Uticao suše i rehidracije na ekspresiju gena odovornih za sintezu ABA i transdukciju signala	54
4.2.	Uticao tri ciklusa suše na morfološke i metaboličke promene kod divljeg tipa paradajza i <i>flacca</i> mutanta gajenih na 800 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	55
4.2.1.	Efekti primene tri ciklusa suše na sadržaj ABA	55
4.2.2.	Efekti primene tri ciklusa suše na provodljivost stoma.....	56
4.2.3.	Efekti primene tri ciklusa suše na ukupni vodni potencijal	57
4.2.4.	Uticao primene tri ciklusa suše na promenu pH ksilemskog soka.....	57
4.2.5.	Uticao primene tri ciklusa suše na sadržaj prolina	58
4.2.6.	Uticao tri ciklusa suše na sadržaj rastvornih ugljenih hidrata	58
4.2.7.	Konstitutivne razlike u sadržaju fenolnih jedinjenja između divljeg tipa i <i>flacca</i> mutanta	59
4.2.8.	Uticao tri ciklusa suše na ekspresiju gena odovornih za sintezu ABA i transdukciju signala	60
4.2.9.	Produženi oporavak nakon jednog i tri ciklusa suše.....	62
4.3.	Uticao različitog intenziteta svetlosti i ciklusa suše na fiziološke i metaboličke promene kod divljeg tipa paradajza i <i>flacca</i> mutanta.....	65
4.3.1.	Efekat različitog inteziteta svetlosti i ciklusa suše na sadržaj ukupnog akorbata i njegovo redoks stanje u listovima paradajza	65

4.3.2.	Efekat različitiog inteziteta svetlosti i ciklusa suše na sadržaj hlorofila u listovima paradajza	67
4.3.3.	Efekat različitiog inteziteta svetlosti i ciklusa suše na sadržaj epidermalnih flavonoida	68
4.3.4.	Efekat različitiog inteziteta svetlosti i ciklusa suše na azotni indeks (NBI)	70
4.3.5.	Uticao različitiog inteziteta svetlosti i ciklusa suše na sadržaj antocijana u listovima	71
4.3.6.	Efekat različitiog inteziteta svetlosti i ciklusa suše na sintezu malih RNK u listovima paradajza	72
5.	Diskusija	82
5.1.	Konstitutivne razlike između biljaka divljeg tipa (<i>Ailsa Craig</i>) i <i>flacca</i> mutanta.....	82
5.2.	Uticao dehidracije i rehidracije na metaboličke promene kod listova divljeg tipa paradajza i <i>flacca</i> mutanta (<i>Lycopersicum esculentum</i> Mill.)	84
5.3.	Uloga rastvornih ugljenih hidrata u suši i rehidraciji	85
5.4.	Uloga slobodnih aminokiselina u suši i rehidraciji	86
5.5.	Uloga ABA u nastanku memorije stresa izazvane ponavljenim ciklusima suše	88
5.6.	Uticao ponovljenih ciklusa suše na osetljivost stoma	88
5.7.	Uticao tri ciklusa suše na akumulaciju prolina	89
5.8.	Modifikacija ćelijskog zida i njena uloga u povećanju tolerancije biljaka na stres suše.....	90
5.9.	Sušom indukovani poremećaji redoks ćelijske homeostaze u listovima	92
5.10.	Uticao ponovljenih ciklusa suše i svetlosti različite intenziteta na ekspresiju nekodirajućih RNK molekula	93
6.	Zaključci	96
7.	Literatura	99
8.	Prilozi	121

1. Uvod

1.1. Ponovljeni stres suše i memorija kod biljka

Klimatske promene ogledaju se u globalnom zagrevanju Zemlje, što je praćeno promenom temperature vazduha i zemljišta, porastom nivoa atmosferskog ugljen-dioksida (CO₂), kao i neravnomernom distribucijom padavina. Jedna od posledica ovih promena jeste i pojava stresa suše (Seleiman i sar., 2021; Gupta i sar., 2020). Suša je jedan od glavnih abiotskih stresogenih faktora koji zajedno sa visokim temperaturama i visokim intenzitetom zračenja uzrokuje gubitke u poljoprivrednoj proizvodnji i smanjen prinos gajenih biljaka (Krasensky i Jonak, 2012; Gupta i sar., 2020). Takođe, usled narušene strukture ozonskog omotača dolazi do povećanog propuštanja ultraljubičastog (UV, eng. *ultraviolet*) zračenja, čije se visoke doze u kombinaciji sa gorepomenutim faktorima negativno odražavaju na prinos useva (Alexieva i sar., 2001).

Uopšteno posmatrano, suša je fenomen koji se može proučavati sa više aspekata (Cook i sar., 2018). Sa meteorološkog aspekta odnosi se na nedostatak padavina koje su karakteristične za dato područje u određenom vremenskom intervalu, dok se sa poljoprivrednog aspekta odnosi na nedostatak vode u zemljištu, što posledično negativno utiče na prinos biljaka (Cook i sar., 2018; Mukherjee i sar., 2018).

Posmatrajući spoljašnju sredinu u vremenu, može se govoriti o dinamičnoj strukturi sastavljenoj od više različitih faktora. Promene u spoljašnjoj sredini mogu se okarakterisati kao ciklične i predvidive (diurnalne i sezonske), odnosno nepredvidive i nasumične. Klimatske promene ukazuju na to da predvidivost cikličnih promena može biti narušena zbog interakcije sa nasumičnim fluktuacijama faktora spoljašnje sredine. Posmatrane u vremenu, ove promene ponavljaju se više puta, pri čemu poprimaju oscilatorni karakter. Novonastale oscilacije međusobno se mogu razlikovati po svom intenzitetu i dužini trajanja. Na osnovu ovakvog pristupa u relativno skorije vreme započeta su istraživanja u kojima se primenjuje više ciklusa suše kod biljaka, kako bi se bolje razumeli mehanizmi odgovora na stres.

Usled sesilnog načina života biljke su neprestano izložene gorepomenutim faktorima. Tako, kada se posmatra delovanje pojedinačnih faktora, nedostatak vode u zemljištu je praćen smanjenim usvajanjem vode i povećanom transpiracijom koja je uzrokovana samo povišenom temperaturom, što dovodi do opadanja turgora, odnosno dolazi do dehidratacije tkiva. U ovim slučajevima se govori o fiziološkoj suši. Takođe, fiziološka suša može nastati kada je niska temperatura zemljišta, i u prisustvu visokih koncentracija različitih soli ili prilikom poplava, kada je korenovom sistemu onemogućeno da vrši usvajanje vode (Salehi-Lisar i Bakhshayeshan-Agdam, 2020).

Trajanje, intenzitet i učestalost suše, kao i karakteristike zemljišta, biljne vrste i njene ontogenetske faze razvića predstavljaju faktore koji značajno utiču na obim i trajnost simptoma izazvanih sušom (Seleiman i sar., 2021).

Usled globalnih klimatskih promena predviđa se da će učestalost i obim nepovoljnih vremenskih prilika, kao što su visoke temperature i niske količine padavina biti sve izraženiji, što se direktno odražava na kvalitet i prinos gajenih biljaka. Ponavljajuće i u većem obimu zastupljene nepovoljne vremenske nepogode (suša, poplave, visoke i niske temperature) imaju značajan uticaj na proizvodnju hrane na svetskom nivou (Liu i sar., 2022). Kao što je već rečeno, stres suše predstavlja jedan od najvažnijih abiotskih faktora koji direktno utiče na smanjenje prinosa gajenih biljaka (Auler i sar., 2021a).

Odgovori biljaka na jednu sušnu epizodu veoma su dobro proučeni, dok je izlaganje ponavljajućim sušnim ciklusima koji su praćeni periodima rehidracije ili oporavka i dalje nedovoljno proučen fenomen. Smatra se da izlaganje biljaka ponavljajućem stresu može uticati na razvijanje veoma sofisticiranih mehanizama koji omogućavaju biljci da se izbori sa stresom. Pokazano je da su biljke koje su bile izložene ponavljajućem stresu, duže zadržavale vodu u listovima, održavajući turgor, i da su se mnogo bolje nosile sa svakom sledećom sušnom epizodom (Godwin i Farrona, 2020).

Pod terminom prajming/pretretman (eng. *priming*) podrazumeva se izlaganje biljaka blagom stresu koji će izazvati odgovor u njima, tako da će sledeći put kada budu bile izložene nepovoljnom sredinskom faktoru brže i efikasnije odgovoriti na stres (Turgut-Kara i sar., 2020). Pretretman, očvršćavanje pod stresom, trening, fitnes (kondicioniranje), kaljenje su sinonimi za ovaj proces koji može da dovede do formiranja kratkoročne ili dugoročne memorije, koja omogućava biljkama da budu tolerantnije na nastupajući stres (Liu i sar., 2022). Memorija na prvobitni stres i aktiviranje „zapamćene“ informacije pri sledećem stresu odvija se kada se između ta dva događaja nalazi period bez stresa (slika 1). Pokazano je da izlaganje biljaka višestrukim sušnim epizodama dovodi do promene u obrascu ekspresije različitih gena u poređenju sa biljkama koje nisu iskusile sušu, pri čemu se brže adaptiraju na novonastale uslove (Ding i sar., 2012). Pokazano je da kod biljaka koje su iskusile više ciklusa suše dolazi do aktivacije ili supresije transkripcije gena, kao i promenjene ekspresije gena koja je prethodno modifikovana u prvoj suši (memorijskih gena), dok je ekspresija tzv. nememorijskih gena ostala slična (Ding i sar., 2013; Avramova, 2019; Galviz i sar., 2020). Ponovljena suša doprinosi povećanoj aktivnosti nekih ABA-zavisnih gena, te tako ABA specifično na nivou ćelija zatvaračica održava delimično zatvorene stome tokom perioda oporavka, tj. rehidracije (Ashapkin i sar., 2020).



Slika 1. Šema nastanka memorije stresa kod biljaka. Biljke imaju razrađen mehanizam za memoriju stresa. Prilikom izlaganja biljaka suši, usled dehidracije dolazi do uvenuća biljaka, dok su se nakon rehidracije listovi oporavili. Tokom drugog ciklusa suše biljka je „memorisala“ prethodnu sušu, pri čemu se aktiviraju različiti mehanizmi koji joj omogućuju da ima bolju otpornost i bolje izgleda za preživljavanje. Preuzeto i prilagođeno iz Turgut-Kara i sar., 2020.

Tretiranje semena ili biljaka u ranim faza razvića elicitorima može imati pozitivan učinak na tolerantnost prema stresu u toj ili u čak više sledećih generacija. Pretretman semena je veoma rasprostranjena tehnika u poljoprivredi kako bi se kontrolisao stepen hidracije semena i period naklijavanja. U zavisnosti od načina na koji se izvodi razlikuje se

hidroprajming, kada se semena potapaju u vodu kako bi se kontrolisao period njihovog klijanja, osmoprajming, kada su semena potopljena u osmotski rastvor, koji sadrži neko osmotski aktivno jedinjenje (polietilen glikol, glicerol, manitol, sorbitol), ili prajming pomoću matriksa, kada se semena „presvlače” nekim neorganskim ili organskim jedinjenjima. Često se dodaju i neki regulatori rasteinja, stimulansi, biološki aktivna jedinjenja (antioksidansi, prolin, H₂O₂, selen, natrijum-nitroprusid ili fungicidi) (Wojtyła i sar., 2016).

Prajming uključuje stresom indukovane strukturne, genetičke i biohemijske modifikacije koje mogu da dovedu do formiranja fenotipa koji ima povećanu otpornost na stres (Nguyen i sar., 2020). Pokazano je da kod biljaka koje su imale pretretman dolazi do akumulacije različitih intermedijernih jedinjenja u ćelijskim odeljcima i do modifikacija ključnih regulatornih proteina (Kinoshita i Seki, 2014). Pretpostavlja se da prvo izlaganje stresu dovodi do akumulacije ili posttranslacione modifikacije signalnih proteina koji će nakon sinteze ili modifikacije ostati nepromenjeni. Pri sledećem izlaganju biljaka stresu došlo bi do hiperaktivacije ovih signalnih molekula. Jedna od najčešćih modifikacija jeste reverzibilna fosforilacija i defosforilacija mitogenom aktiviranih kinaza koje su uključene u odgovore biljaka na različite abiotičke i biotičke faktore (Galviz i sar., 2020).

Prilikom prepoznavanja stimulusa iz spoljašnje sredine biljke mogu reagovati na tri načina. Prvi se dešava odmah i nezavisan je od prethodnog stimulusa, dok druga dva uključuju aktiviranje memorije. Prvi memorijski put podrazumeva „učenje”, kada se smanjuje intenzitet odgovora na stres, odnosno „učenje putem navikavanja/upoznavanja”, kada se biljka upoznaje sa stresogenim faktorom. S druge strane, drugi memorijski put podrazumeva pojačani odgovor na stres, što se označava kao senzitivacija (Galviz i sar., 2020).

Memorija kod biljaka može da se razvije u jednoj, ali da se prenese i na sledeće generacije (Hilker i Schmölling., 2019; Koc i sar., 2020) i na osnovu toga može se klasifikovati na više načina: somatska memorija, koja traje samo kod onih biljaka koje su iskusile stres, međugeneracijska memorija stresa, koja je uočljiva samo kod prve generacije, koja nije iskusila stres, i transgeneracijska, koja je mejotski nasledna i ispoljava se kod potomstva i nakon dve ili više generacija (Lämke i Bäurle, 2017; Liu i sar., 2022).

Iako se smatra da postoji pozitivna korelacija između memorije i performansi biljaka, ne može se tvrditi da će pretretman i memorija uvek dovesti do poboljšanja metaboličkih odgovora i razvića biljaka u uslovima stresa (Galviz i sar., 2020).

U osnovi ovog fenomena leže promene u nivou ključnih signalnih molekula i transkripcionih faktora (fiziološka/molekularna memorija), odnosno epigenetičke promene zasnovane na metilaciji DNK molekula, remodeliranju hromatina, pozicioniranju nukleozoma, modifikacijama histona i regulaciji posredstvom nekodirajućih RNK molekula (nkRNK; ncRNAs, eng. *non-coding RNAs*) (Auler i sar., 2017; Jacques i sar., 2021; Liu i sar., 2022).

1.2. Efekti suše na morfološke, fiziološke, biohemijske i molekularne promene kod biljaka

Prilikom izlaganja biljaka suši dolazi do promena na nivou ćelija, tkiva i organa. Usled promene vodnog potencijala smanjuje se turgor stominih ćelija, što dovodi do njihovog zatvaranja kako bi se sprečilo odavanje vode transpiracijom. Ovo direktno utiče na smanjenu fotosintetsku aktivnost biljaka, što dovodi do inhibicije rasteinja, a finalno i do redukcije prinosa. Takođe, dolazi i do poremećaja u usvajanju hranljivih elemenata iz zemljišta u odsustvu vode (Gupta i sar., 2020; Kapoor i sar., 2020). Negativni uticaj suše odražava se na procese transpiracije, usvajanja jona, transport ugljenih hidrata, kao i na sadržaj hormona

(Kaur i sar., 2021). Pored toga, suša direktno utiče na integritet ćelijskih membrana, sadržaj pigmenata i osmolita i dovodi do produkcije reaktivnih kiseoničnih i azotnih vrsta. Osetljivost biljaka na sušu zavisi od mnoštva faktora, kao što su intenzitet i dužina primenjenog stresa, biljna vrsta i stadijum razvića, kao i prisustvo dodatnih abiotskih faktora, kao što su povišen intenzitet svetlosti ili visoke temperature (Anjum i sar., 2011). Aklimacija na vodni stres rezultat je različitih događaja koji aktivacijom / deaktivacijom niza biofizičkih i biohemijskih procesa dovode do adaptivnih promena u biljkama. Ovo za posledicu ima promene u morfologiji biljaka, utiče na njihovo sporije rastenje, dovodi do akumulacije osmotski aktivnih jedinjenja i do aktiviranja mehanizama antioksidativne odbrane (Farooq i sar., 2009; Anjum i sar., 2011).

1.2.1. Morfološke promene indukovane sušom

Prilikom izlaganja biljaka stresu suše dolazi do promena na nivou ćelije, tkiva, organa, pa i čitavog organizma (Anjum i sar., 2011). Rastenje biljaka predstavlja kompleksan mehanizam umreženih interakcija koje se ostvaruju između procesa deobe, izduživanja i diferencijacije ćelija, što dovodi do različite razvijenosti korena i nadzemnog dela biljke, a samim tim utiče na uspostavljanje njihove međusobne funkcionalne ravnoteže.

Rastenje ćelija jedan je od prvih fizioloških procesa koji je izložen promenama koje nastaju kao posledica smanjenja turgora i opadanja vodnog potencijala u suši (Anjum i sar., 2011; Basu i sar., 2016). Usled narušene turgidnosti ćelija dolazi do inhibicije njihove proliferacije i elongacije, što finalno dovodi do smanjenja njihovog broja, veličine, kao i do povećanja rigidnosti ćelijskih zidova (Chaves i sar., 2003).

Korenov sistem biljaka je od ključnog značaja za usvajanje vode i hranljivih materija, a takođe u rizosferi učestvuje u simbiozi sa mikroorganizmima (Kapoor i sar., 2020). Prilikom izlaganja biljaka suši korenov sistem podleže morfološkim promenama u cilju povećanja sposobnosti usvajanja vode i hranljivih materija. Ove modifikacije praćene su koordinisanom ćelijskom deobom, elongacijom, kao i promenama u regionu vrha korena (Gupta i sar., 2020). Arhitektura korenovog sistema od ključnog je značaja kod biljaka izloženih suši. Mnoge biljke u ranoj fazi suše povećavaju rastenje korena kako bi usvajale što više hranljivih materija i doprle do vode iz dubljih slojeva podloge. Takođe, dužina, masa i gustina korena podleže promeni nakon izlaganja stresu. Opada rast bočnih korenova i ugao njihovog grananja, povećava se gustina korenovih dlačica i njihova razgranatost što utiče na površinu korena, preko koje se ostvaruje maksimalno iskorišćavanje vode iz dubljih slojeva (Malamy, 2005; Fang i Xiong 2015, Basu i sar., 2016). U regionima gde se niske količine padavina zadržavaju pretežno u površinskim slojevima zemljišta, pliće korenske strukture su korisnije za efikasno usvajanje vode (Gupta i sar., 2020).

Izlaganje biljaka dehidraciji odražava se i na morfologiju njihovog nadzemnog dela (Kapoor i sar., 2020). Tako su biljke izložene suši smanjenog rasta, dok su promene na nivou listova najočiglednije. Usled smanjene deobe i elongacije ćelija dolazi do smanjenja ukupnog broja listova, smanjenja njihove površine, kao i do povećanja njihove debljine, odnosno gustine lisnog tkiva (Fang i Xiong, 2015). Vodnim stresom indukovano smanjenje površine i broja listova odražava se negativno na fotosintezu, koja je od naročito značaja za rastenje i razviće biljaka (Farooq i sar., 2009; Yang i sar., 2021). Kada biljke osete nedostatak vode, dolazi do uvijanja listova, a finalno, u zavisnosti od intenziteta i trajanja stresa, može dovesti do njihovog uvenuća. Pored uvijanja listova, dolazi i do promene njihove orijentacije, oblika, kao i do povećane produkcije trihoma na abaksijalnoj i adaksijalnoj strani. Pomenute promene dovode do snižavanja temperature listova usled izbegavanja direktne izloženosti infracrvenom spektru sunčevog zračenja, a i do povećanja stope refleksije svetlosti usled

stvaranja trihoma, koje i predstavljaju dodatni sloj koji otežava odavanje vode transpiracijom. Na nivou listova dolazi do smanjenja broja, veličine i gustine stoma, čime se takođe kontroliše i redukuje intenzitet transpiracije (Seleiman i sar., 2021). Kod biljaka u suši, dakle, dolazi do narušavanja ravnoteže rastenja između korena i nadzemnog dela, odnosno dolazi do opadanja ukupnog porasta nadzemnog dela, dok se, sa druge strane, intenzivira rastenje korenovog sistema (Kapoor i sar., 2020).

1.2.2. Fiziološke i biohemijske promene indukovane sušom

Ključna posledica nedostatka vode u biljkama jeste delimična ili potpuna inhibicija procesa fotosinteze (Anjum i sar., 2017a). Redukcija lisne površine, povećano zatvaranje stoma i porast temperature listova direktno dovodi do povećanja osmotskog stresa u biljkama, pri čemu dolazi do narušavanja fotosintetskog aparata (Kapoor i sar., 2020). Deficit vode ne utiče samo na reakcije koje se odvijaju na svetlosti, već deluje i na procese asimilacije, što direktno utiče na smanjenje sadržaja asimilata i posledično na prinos biljaka (Fang i Xiong, 2015). U suši je aktivnost fotosintetskog aparata prvenstveno smanjena usled zatvaranja stoma, oštećenjem membrana ili izmenjenom funkcijom različitih enzima, pre svega onih koji su povezani sa sintezom ATP molekula. U fotosintezi dolazi do produkcije reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS, eng. *reactive oxygen species*) i reaktivnih azotnih vrsta (RNS, eng. *reactive nitrogen species*), što se direktno odražava na redoks-regulaciju u ćeliji (Foyer i Noctor., 2005; Noctor i sar., 2014; Sharma i sar., 2020). Zatvaranje stoma predstavlja rani odgovor biljaka na stres suše, pri čemu dolazi do smanjenja asimilacije CO₂, kao i stimulacije fotorespiracije što direktno utiče na process fotosinteze (Noctor i sar., 2002a; Sharma i sar., 2020). Zatvaranje stoma može biti indukovano smanjenim turgorom, odnosno sniženim vodnim potencijalom, kao i niskom vlažnošću vazduha (Farooq i sar., 2009). Pokazano je da je odgovor stoma na sušu prvenstveno povezan sa sadržajem vlage u zemljištu, pre nego sa vodnim statusom listova. Ovo ukazuje da stome reaguju na hemijski signal, tj. povećanje sinteze apscisinske kiseline (ABA) u korenu, dok relativni sadržaj vode u listu može ostati nepromenjen. Usled povećane transpiracije dolazi i do porasta pH vrednosti ksilemskog soka listova, što pozitivno utiče na redistribuciju i akumulaciju ABA i istovremeno utiče na opadanje provodljivosti stoma (Wilkinson i Davies, 2002). Kao što je rečeno, zatvaranje stoma ne predstavlja jedini mehanizam koji utiče na smanjenje procesa fotosinteze kod biljaka u suši. Postoje i nestomatarni mehanizmi kojima se menja efikasnost procesa fotosinteze. Na primer, izmene u aktivnosti enzima za vezivanje CO₂ i smanjena sinteza ATP molekula dovode do inhibicije Rubisco enzima (ribulozo-1,5-bisfosfat karboksilaza/oksigenaza) i smanjene sinteze D-ribuloza 1,5-bisfosfata (Sharma i sar., 2020).

Narušeni mehanizmi fotosinteze usled izlaganja biljaka suši odražavaju se na sadržaj biljnih pigmenata, prvenstveno hlorofila i karotenoida. Redukcija sadržaja hlorofila u suši jeste očekivana posledica oksidativnog stresa, pri čemu dolazi do lipidne peroksidacije i do degradacije hlorofila (Kapoor i sar., 2020). Smanjenje fotosintetske aktivnosti, narušen odnos hlorofila *a* i hlorofila *b*, gubitak fotohemijske efikasnosti fotosistema II su promene koje se javljaju u suši i posledično utiču na smanjen prinos biljaka. Međutim, promene na nivou hlorofila veoma zavise od starosti listova, biljne vrste i genotipa (Ahmad i sar., 2018). S druge strane, vodni deficit može dovesti do porasta sadržaja hlorofila u biljkama (Rustioni i Bianchi, 2021), a na promenu sadržaja hlorofila utiču i intenzitet i trajanje stresa (Anjum i sar., 2011).

Karotenoidi se nalaze u okviru kompleksa za sakupljanje svetlosti (eng. *light harvesting complex*) i učestvuju u fotoprotekciji fotosintetskih pigmenata (Havaux, 2014). Svoju antioksidativnu aktivnost ispoljavaju vezivanjem za singletni kiseonik i peroksil-radikal koji se formiraju pri suši, čime inhibiraju lipidnu peroksidaciju i sprečavaju oštećenje tilakodidnih membrana (Jaleel i sar., 2009). Na promenu sadržaja karotenoida u biljkama utiče više

faktora, kao što su vrsta, genotip i intenzitet stresa (Munné-Bosch i Alegre, 2000; Colom i Vazzana, 2003; Wu i sar., 2016). Pored toga što učestvuju u antioksidativnoj odbrani, karotenoidi u biljkama u suši igraju značajnu ulogu i u signalizaciji i u promeni sadržaja metabolita. Prekursori su u biosintetskom putu ABA, čime direktno doprinose procesima regulacije zatvaranja stoma i smanjenoj transpiraciji pri vodnom deficitu (Dhami i Cazzonelli, 2020).

1.2.2.1. Produkcija reaktivnih kiseoničnih vrsta

Suša, svetlost visokog intenziteta, kao i drugi abiotski faktori dovode do produkcije reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS) (Gill i Tuteja, 2010). Svi oblici kiseonika koji su reaktivniji od molekuskog odnose se na termin ROS. Nastaju kao proizvodi bioloških redoks-reakcija, ali i kao posledica aerobnog metabolizma u biljkama (Gupta i sar., 2015). ROS nastaju u različitim ćelijskim organelama, kao što su hloroplasti, mitohondrije, peroksizomi, ali i u ćelijskoj membrani, apoplastu i ćelijskom zidu (Tripathy i Oelmüller, 2012; Sharma i sar., 2012). Visoke koncentracije ROS nastaju kao posledica oksidativnog stresa u biljkama, toksične su i uzrokuju oštećenja biomolekula (proteina, lipida, ugljenih hidrata, DNK) (Gupta i sar., 2015). Međutim, niske koncentracije ROS imaju ulogu sekundarnih glasnika koji učestvuju u unutarćelijskim signalnim putevima i regulišu različite ćelijske procese (Talaat, 2019). Forme ROS koje nastaju u biljkama tokom fizioloških procesa u obliku slobodnih radikala su superoksid-anjon-radikal ($O_2^{\bullet-}$), hidrosil-radikal ($\bullet OH$), hidroperoksil-radikal ($\bullet OH_2$) i peroksil-radikal ($ROO\bullet$). Pored slobodnih radikala, reaktivne kiseonične vrste obuhvataju i neradikalske forme koje nemaju nesparene elektrone, ali pokazuju veliku reaktivnost, kao što su vodonik peroksid (H_2O_2), singletni kiseonik (1O_2) i ozon (O_3) (Gupta i sar., 2015). Glavni izvor ROS jeste fotosinteza, tačnije procesi u okviru elektron transportnog lanca i fotorespiracije u peroksizomima. Prilikom izlaganja biljaka suši mesta produkcije ROS jesu peroksizomi i hloroplasti (Noctor i sar., 2014).

Dva primarna procesa nastanka ROS u fotosintezi jesu direktna fotoredukcija kiseonika do $O_2^{\bullet-}$ u fotosistemu I (PSI) u Melerovoj reakciji i stvaranje singletnog kiseonika na fotosistemu II (PSII). Prilikom pseudocikličnog transporta elektrona u Melerovoj reakciji elektroni prelaze sa PSI na molekulski kiseonik, umesto na $NADP^+$, pri čemu se formira $O_2^{\bullet-}$, koji se dalje prevodi u H_2O_2 i O_2 pomoću superoksid-dismutaze SOD, dok se nastali H_2O_2 uklanja pomoću askorbat-peroksidaze uz potrošnju askorbata (Foyer i Shigeoka, 2011; Foyer i Noctor, 2011). Superoksid-dismutaza (SOD, EC 1.15.1.1) katalizuje brzo disproporcionisanje $O_2^{\bullet-}$ do vodonik peroksida i kiseonika. Ovaj enzim nalazi se u svim ćelijskim odeljcima sa aerobnim uslovima i unutarćelijskim strukturama koje su osetljive na oksidativni stres. U zavisnosti od metalnog kofaktora koji se nalazi u aktivnom mestu, postoje tri forme SOD kod biljaka. Najzastupljenija je Cu/ZnSOD izoforma i nalazi se u stromi hloroplasta, citosolu, apoplastu i peroksizomima. MnSOD prvenstveno se nalazi u mitohondrijama i peroksizomima, mada je ima i u apoplastu i ćelijskom zidu, dok je prisustvo FeSOD potvrđeno u stromi hloroplasta (Mittler i sar., 2004). Sa druge strane, askorbat-peroksidaza (APX, EC 1.11.1.11) nalazi se u različitim ćelijskim odeljcima, stromi (sAPX) i tilakoidima hloroplasta (tAPX), u membranama peroksizoma i glioksizoma (mAPX), u citosolu (cAPX) i u mitohondrijskoj membrani (mitAPX). APX koristi askorbat kao donor elektrona za redukciju H_2O_2 i osetljiva je na snižene vrednosti askorbata. U ovoj reakciji nastaje mono-dehidroaskorbil-radikal, koji spontano prelazi u askorbat i dehidroaskorbat (DHA) (Shigeoka i sar., 2002).

Na nivou fotosistema II singletni kiseonik nastaje u reakciji kiseonika sa ekscitiranim hlorofilom u tripletnom stanju, pri čemu dolazi do formiranja lipidnih peroksil-radikala (Apel i Hirt, 2004; Das i Roychoudhury, 2014). U fotorespiraciji enzim Rubisco u hloroplastima

vezuje se za molekularni kiseonik umesto za CO₂, pri čemu se formiraju 3-fosfoglicerat i 2-fosfoglikolat. Nastali glikolat oksiduje se u peroksizomima do glioksilata, pri čemu se formira vodonik-peroksid. Glioksilat se zatim u reakciji transaminacije prevodi do glicina. Sledeći korak fotorespiracije odvija se u mitohondrijama, gde se dva molekula glicina kondenzuju i stvaraju serin, koji prelazi u peroksizome, redukuje se do glicerata i kao 3-fosfoglicerat uključuje se u Kalvin-Bensonov ciklus (Gupta i sar., 2015; Dellerio i sar., 2016). Produkcija ROS, pre svega H₂O₂ i superoksid anjon radikala, u mitohondrijama nastaje redukcijom molekularnog kiseonika pomoću elektrona koji cure iz kompleksa I i III elektron-transportnog lanca (Rhoads i sar., 2006).

U odgovoru na različite vrste stresa reaktivne kiseonične vrste nastaju i na nivou ćelijske membrane, kada dolazi do akumulacije O₂^{•-} u prisustvu NADH, kao i H₂O₂, koji nastaje dismutacijom O₂^{•-}, ili u reakciji sa peroksidazama III klase iz ćelijskog zida. Takođe, radikalske vrste koje nastaju u apoplastu mogu biti posledica aktivnosti i drugih enzima, kao što je *germin like* oksalat-oksidaza u ćelijskoj membrani ili ksantin-oksidaza u peroksizomima i glioksizomima (Kukavica i sar., 2012; Smirnof i Arnaud, 2019).

1.2.3. Promene na molekularnom nivou kod biljaka indukovane sušom

Prilikom izlaganja biljaka suši dolazi do indukcije različitih gena koji imaju funkciju u odgovoru i u razvijanju tolerancije na stres (Yang i sar., 2021). U procese signalne transdukcije uključeni su brojni biljni hormoni (prvenstveno abscisinska kiselina, ABA), zatim Ca²⁺, reaktivne kiseonične vrste, inozitol trifosfat, kao i različiti transkripcioni faktori (Kaur i Asthir., 2017; Yang i sar., 2021). Produkti gena koji se indukuju sušom učestvuju u signalnim kaskadama i procesima regulacije transkripcije, kao što su MAPK – mitogen aktivirajuće protein kinaze, fosfataze, transkripcioni faktori, strukturni proteini koji obezbeđuju integritet ćelijske membrane, proteini zastupljeni u kasnoj fazi embriogeneze (LEA, eng. *late embryogenesis abundant proteins*), dehidrini, proteini uključeni u transport vode (akvaporini) i ugljenih hidrata, osmotin, kao i različiti antioksidanti (Kaur i Asthir., 2017; Liu i sar., 2017). Ekspresija gena koji se indukuju u suši regulisana je na ABA-zavisan i ABA-nezavisan način (Shinozaki i Yamaguchi-Shinozaki, 2007; Yoshida i sar., 2014; Soma i sar., 2021). U ABA-zavisnom putu od ključnog značaja su ZIP transkripcioni faktori (eng. *zinc finger proteins*) i AREB proteini (eng. *ABA-responsive elements-binding*), koji na sušu deluju na transkripcionom i post-transkripcionom nivou, učestvujući u razvoju tolerancije (Yamaguchi-Shinozaki i Shinozaki, 2005; Agarwal i Jha, 2010; Yoshida i sar., 2014).

U promotorima ABA-regulisanih gena nalaze se *cis*-elementi – ABRE (eng. *abscisic acid responsive elements*), koji kontrolišu ekspresiju gena preko bZIP-tipa AREB/ABF transkripcionih faktora. Pokazano je da se MYC (eng. *myelocytomatosis related proteins*) i MYB (eng. *myeloblastosis related proteins*) transkripcioni faktori vezuju za *cis*-elemente na promotoru kod sušom inducibilnih gena, pri čemu ih aktiviraju (Singh i Laxmi, 2015). Pored ovih transkripcionih faktora, u ABA-zavisnom putu pokazano je i prisustvo CBF4 (eng. *C-repeat/drought-responsive element binding factor*) koji učestvuje u procesima adaptacije biljaka na stres (Kaur i Asthir., 2017). U ABA-nezavisnom putu od ključnog značaja jesu DRE (eng. *rehydration responsive element*), CRT (eng. *C-repeat*) i NAC (eng. *dual regulator of nitrogen assimilation*) elementi u promotorima gena koji se indukuju sušom, za koje se vezuju različiti transkripcioni faktori (Nakashima i sar., 2014).

1.3. Metabolizam apscisinske kiseline u suši

Apscisinska kiselina (ABA) je hormon uključen u brojne fiziološke procese u biljkama. Prilikom izlaganja biljaka nepovoljnim sredinskim uslovima, kao što su suša i visoke koncentracije soli, dolazi do njene akumulacije. Međutim, u povoljnim uslovima spoljašnje sredine nivo ABA vraća se na bazalni kada promovise optimalni rast. ABA reguliše ekspresiju različitih gena koji su značajni za akumulaciju osmolita, uključeni u biosintezu LEA proteina, dehidrina, kao i drugih proteina koji se indukuju stresom. Pri izlaganju vodnom stresu ABA učestvuje u regulaciji pokreta stoma, što se dalje odražava na intenzitet transpiracije i na fotosintetski kapacitet biljaka. Takođe, u uslovima suše u sadejstvu sa drugim hormonima reguliše rast korena čime doprinosi adaptaciji biljaka na nepovoljne sredinske uslove. U odgovoru na vodni deficit ABA može delovati preko brzih i sporih reakcija. Spore reakcije odvijaju se preko genske regulacije, dok brzi odgovor podrazumeva zatvaranje stoma usled promene u aktivnosti jonskih kanala (Ali i sar., 2020; Schroeder i sar., 2001).

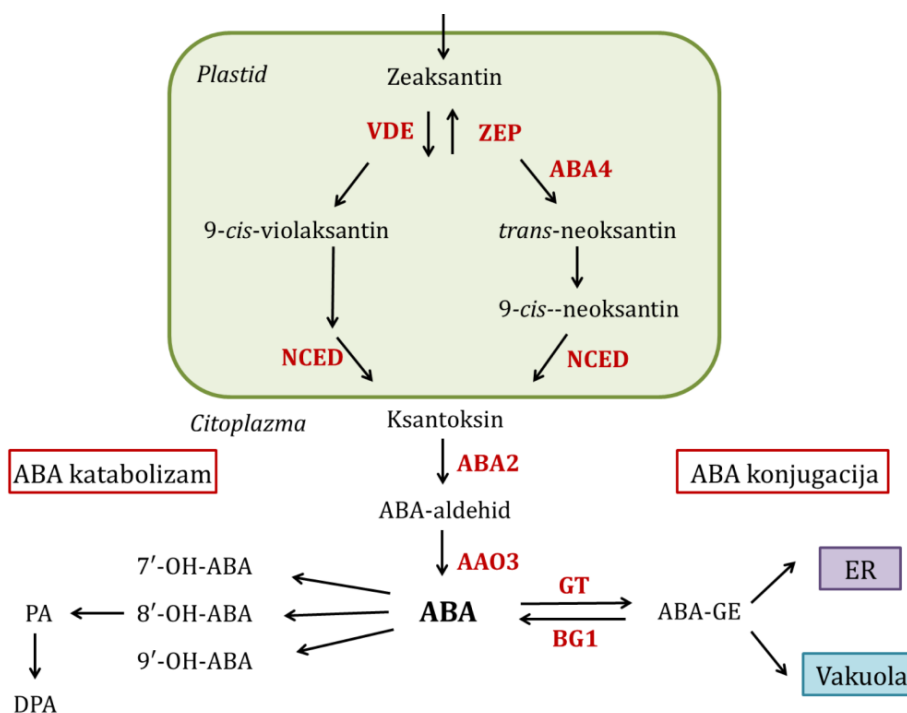
1.3.1. Biosinteza i katabolizam ABA

U hemijskom smislu molekul ABA spada u seskviterpenoide ($C_{15}H_{20}O_4$) čija biosinteza započinje od C5 prekursora izopentenil-pirofosfata (IPP) (Taylor i sar., 2000). U početku se smatralo da biosinteza svih izoprenoida započinje u citosolu od mevalonata u mevalonskom putu (MVA), a kasnije je pokazano da plastidni izoprenoidi nastaju u metileritriol-fosfatnom putu (MEP) (Nambara i Marion-Poll, 2005). Nastali IPP konvertuje se do C20 geranil-geranil pirofosfata (GGPP), koji se zatim prevodi u zeaksantin. Zeaksantin predstavlja prvi korak u biosintezi ABA. U dvostepenoj reakciji epoksidacije u prisustvu zeaksantin epoksidaze (ZEP) zeaksantin se prevodi u *trans*-violaksantin. Formiranje *cis*-violaksantina i neoksantina odvija se u prisustvu izomeraze i neoksantin sintaze (NYS). Sledeći korak podrazumeva formiranje ksantoksina u prisustvu enzima 9-*cis*-epoksikarotenoid dioksidaze (NCED), koji se dalje konvertuje do ABA-aldehida pomoću alkoholne dehidrogenaze (ABA2). Poslednji korak u nastanku ABA podrazumeva oksidaciju ABA-aldehida pomoću ABA-aldehid oksidaze (AAO) (Vishwakarma i sar., 2017). Većim delom biosinteza ABA dešava se u plastidima, dok se poslednja dva koraka odvijaju u citoplazmi (slika 2).

Kao što je već rečeno, više različitih enzima uključeno je u metabolizam ABA. Najznačajniji regulatorni korak u njenoj biosintezi odvija se u plastidima, gde pomenuti NCED enzim katalizuje prevođenje *cis*-violaksantina i *cis*-neoksantina u ksantoksin. Pokazano je da je ekspresija *NCED* gena značajno povišena u listovima biljaka u suši (Iuchi i sar., 2001; Milosavljević i sar., 2012; Landi i sar., 2017; Saad-Allah i sar., 2021), a da se nakon oporavka od stresa njihova ekspresija značajno smanjuje (Iovieno i sar., 2016). Takođe, sa povećanjem intenziteta stresa suše može doći do inhibicije ekspresije *NCED* gena, što, sa druge strane, ne mora korelirati sa sadržajem ABA u listovima (Changan i sar., 2018).

Katabolizam ABA neophodan je radi održavanja njenog bazalnog nivoa pri optimalnim uslovima spoljašnje sredine i zasniva se na dva tipa reakcija – reakcijama hidrosilacije i formiranja konjugata. U reakcijama hidrosilacije dolazi do oksidacije metil-grupe na položajima C-7', C-8' ili C-9' u cikličnom prstenu. Ova reakcija odvija se u prisustvu enzima P450 monooksigenaze kodirane od strane *CYPT707* gena, pri čemu se formira nestabilni intermedijer koji spontano izomerizuje do fazeinske kiseline (PA), koja se dalje u prisustvu reduktaza degraduje do dihidrofazeinske kiseline (DPA). Oba ova degradaciona produkta imaju slabu ili nemaju biološku aktivnost (Nambara i Marion-Poll, 2005; Chen i sar., 2020a).

Karboksilna grupa na položaju C-1 u ABA je primarno mesto za reakcije konjugacije. ABA najčešće gradi konjugate sa glukozom formirajući ABA-glukozne estre (ABA-GE) u prisustvu UGT glukozil transferaze, mada se konjugacija može odvijati preko bilo koje druge karboksilne grupe u molekulu ABA, pri čemu mogu da se ngrade i drugi konjugati. Nastali ABA-GE konjugati su biološki neaktivni i transportuju se do vakuole i endoplazmatičnog retikuluma, dok se u uslovima stresa ABA-GE konjugati reverzibilno prevode u ABA u prisustvu glikozil hidrolaze (BG), čime se čuva njena homeostaza (Ma i sar., 2018).



Slika 2. Šematski prikaz biosinteze, katabolizma i konjugacije ABA. ABA se sintetiše u plastidima od karotenskih prekursora u reakcijama katalizovanim enzimima ZEP, VDE, ABA4, NCED, gde dolazi do prevođenja zeaksantina u ksantoksin. Nastali ksantoksin u citosolu prevodi se u ABA-aldehid u prisustvu enzima alkoholne dehidrogenaze (ABA2), a od ABA-aldehida u prisustvu ABA-aldehid oksidaze (AAO) nastaje ABA. Katabolizam ABA podrazumeva prevođenje ABA u fazeinsku i difazeinsku kiselinu. Konjugacija ABA odvija se u prisustvu enzima glukozil-transferaze (GT), pri čemu nastaju ABA-glukozni estri (ABA-GE) koji se transportuju do vakuola i endoplazmatičnog retikuluma (ER). U prisustvu glukozil-hidrolaza (BG1) ABA-glukozni estri konvertuju se u ABA. Preuzeto i prilagođeno iz Ali i sar., 2020.

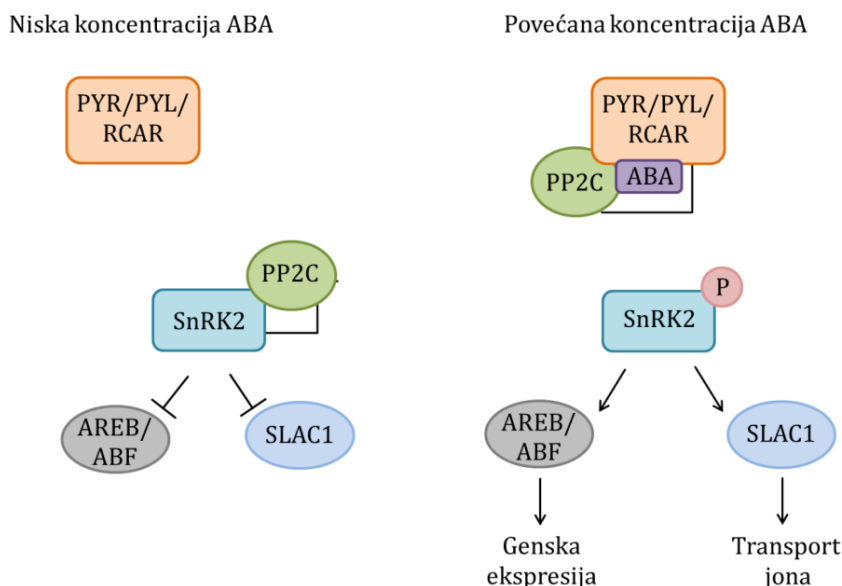
U odgovoru biljke na stres od velikog je značaja transport ABA između ćelija, tkiva i organa. ABA je slaba kiselina (pK_a 4,7) i u biljkama egzistira u vidu anjonske (ABA^-) i protonovane forme (ABAH) (Schachtman i Goodger, 2008). ABA se transportuje u biljci pasivnom difuzijom, ali i pomoću specifičnih transportera (Kuromori i sar., 2018). Prilikom izlaganja biljaka suši akumulacija ABA u korenu usko je povezana sa smanjenjem provodljivosti stoma, a njena biosinteza odvija se na nivou ksilema (Kuromori, 2018). U uslovima smanjene vlažnosti vazduha ABA se sintetiše u ćelijama zatvaračicama (Ali i sar., 2020). Protonovana ABA sintetisana u korenu oslobađa se u ksilem i transportuje do apoplasta prostom difuzijom. Zbog svoje lipofilnosti lako difunduje kroz membrane ćelija mezofila i epidermisa. Usled konstantnog otpuštanja protona preko protonske pumpe na membranama mezofilnih ćelija, pH citoplazme je alkalnija u odnosu na apoplast, te ABAH lako ulazi u ćelije gde odmah disosuje na ABA^- i H^+ . U optimalnim uslovima ABA^- ostaje zarobljena

u mezofilu, gde podleže procesima katabolizma, čime se snižava njena koncentracija i postaje nedovoljna da inicira proces zatvaranja stoma. Međutim, kod biljka u uslovima stresa pH apoplasta se povećava, čime se gubi pH gradijent na ćelijskim membranama mezofila i epidermisa i tako je kod njih onemogućen ulazak ABA. Protonovana ABA tada u apoplastu disosuje na ABA⁻ i H⁺ i kao takva (hidrofilna) ostaje zarobljena, tj. akumulira se (Hartung i sar., 2005; Daszkowska-Golec, 2016).

Da bi ABA dospela do mesta svog delovanja, neophodan je njen transport preko membrana, što se postiže posredstvom različitih nosača (transportera). ABC transporteri (eng. *ATP-binding cassette*) veoma su zastupljeni na ćelijskoj membrani kod biljaka, te tako transporteri AtABCG40 i AtABCG25 u *Arabidopsis thaliana* regulišu ulazak ABA u ćeliju, odnosno njen izlazak. Sekundarnim ABA transporterima smatraju se AIT1 (eng. *ABA-IMPORTING TRANSPORTER 1*) transporteri koji regulišu ulazak ABA u ćeliju (Kanno i sar., 2012). Jedan od njih je nitratan transporter NPF, koji pripada familiji NRT1/PRT (eng. *nitrate transporter1/peptide transporter*). Treću grupu čine DTX50 transporteri iz familije DTX/MATE proteina (eng. *detoxification efflux carriers/multidrug and toxic compound extrusion*) koji posreduju u prelasku ABA iz citoplazme u apoplast (Zhang i sar., 2014; Daszkowska-Golec, 2016).

1.3.2. ABA signalni put i mehanizam zatvaranja stoma

ABA signalna kaskada obuhvata trostepeni regulatorni proces koji se sastoji iz tri komponente: receptora, fosfataza i protein kinaza koje imaju ulogu posrednika i targeta. Percepcija ABA od strane ABA receptora predstavlja prvi korak u ABA signalizaciji (Raghavendra i sar., 2010). Osnovne komponente zadužene za ABA prepoznavanje jesu receptori koji pripadaju familiji proteina PYR/PYL/RCAR (eng. *Pyrabactin Resistance 1/Pyrabactin Resistance 1-like PYR/PYL, Receptor Component of the ABA receptor – RCAR*) i PP2C protein fosfataze, negativni regulatori ABA signalizacije u biljkama (slika 3). U biljkama je otkriveno 9 PP2C proteina, međutim, najviše su proučavani oni uključeni u ABA signalizaciju (HAB1, HAB2, ABI1, ABI2 i PP2CA) (Ma i sar., 2009; Park i sar., 2009; Ali i sar., 2020). U odsustvu ABA, PP2C fizički interaguje sa SnRK2 (eng. *Sucrose non-fermenting Related Kinase2*) i inhibira njenu kinaznu aktivnost. Međutim, u prisustvu ABA PYR/PYL/RCAR podleže konformacionoj promeni i formira kompleks sa PP2C, dolazi do oslobađanja SnRK2 i njene aktivacije autofosforilacijom. Aktivna SnRK2 smatra se pozitivnim regulatorom ABA signalizacije jer u fosforilovanoj formi nizvodno aktivira AREB/ABFs transkripcione faktore koji dalje utiču na transkripciju ABA-zavisnih gena (Ma i sar., 2009; Jung i sar., 2020).



Slika 3. Percepcija i transdukcija signala za ABA. Pri niskoj koncentraciji ABA PP2C fizički interaguje sa SnRk2 i inaktivira je. Neaktivna SnRK2 je u nemogućnosti da prenosi signal na nizvodne ciljane molekule. Kada je ABA zastupljena u povišenoj koncentraciji, vezuje se za PYR/PYL/RCAR receptore i inhibira aktivnost PP2C, čime je SnRK2 kinaza slobodna da fosforiliše nizvodne target proteine, kao što su AREB/ABF transkripcioni faktori, anjonske kanale i da indukuje ABA odgovor. Preuzeto i prilagođeno iz Danquah i sar., 2014.

Prilikom izlaganja biljaka suši dolazi do povećanja pH vrednosti ksilemskog soka, tj. njegove alkalizacije, čime se promovira zatvaranje stoma i inhibira rast listova. Promena pH vrednosti ksilemskog soka doprinosi signalizaciji između korena i lista i deluje sinergistički sa ABA, a takođe se smatra ranim signalom koji utiče na zatvaranje stoma. Uticaj pH na zatvaranje stoma ogleda se prvenstveno na metabolizam ABA i njenu povećanu akumulaciju u apoplastu. Takođe, dolazi do promene vodnog statusa u listovima, čime se smanjuje turgor ćelija zatvaračica, što dovodi do zatvaranja stoma. Ova promena može se desiti i kada je nivo ABA nepromenjen, odnosno pri niskim vrednostima vodnog potencijala listova. Promena pH vrednosti ksilemskog soka utiče i na redistribuciju endogene ABA u listovima, stimulišući njen transfer u neposrednu okolinu ćelija zatvaračica (Wilkinson, 1999; Schachtman i Goodger, 2008; Seo i Koshiba, 2011).

Svoju ulogu u zatvaranju stoma ABA ispoljava regulacijom neto fluksa na membranama ćelija zatvaračica. Ovi procesi se odvijaju preko kalcijum-zavisnog i kalcijum-nezavisnog puta (Sreenivasulu i sar., 2012; Chen i sar., 2020a). U kalcijum-zavisnom putu dolazi do otvaranja kalcijumskih ulaznih kanala i povećanja koncentracija Ca^{2+} u citoplazmi ćelija zatvaračica, odnosno do aktivacije kalcijum-izlaznih kanala na tonoplastu (Chen i sar., 2020a). Kalcijum u citoplazmi putem Ca-zavisnih kinaza utiče na aktivnost drugih prenosilaca na membrani (protonska ATP-azna pumpa, kanali za kalijum i anjone). Sušom indukovane promene pH vrednosti ksilemskog soka posledica su smanjene aktivnosti protonskih pumpi na membranama ćelija povezanih sa ksilemom, kao i sa promenom sadržaja jona u tim ćelijama. Protonska ATP-azna pumpa reguliše nivo H^+ jona u ćelijama i njena aktivnost je pozitivno regulisana plavim svetlom i auksinom, dok se negativnim regulatorima smatraju ABA i joni kalcijuma (Daszkowska-Golec, 2016). Pored ove pumpe, na membranama se nalaze i kanali za kalijum koji regulišu unošenje K^+ jona, koje je delom kompenzovano usvajanjem hloridnih, nitratnih ili malatnih jona iz apoplasta. U nepovoljnim sredinskim uslovima do zatvaranja stoma dolazi usled inhibicije H^+ -ATPaze i aktivacije kanala za efluks anjona, što dovodi do depolarizacije membrana (Daszkowska-Golec, 2016). Postoje dva tipa anjonskih kanala koja se aktiviraju u suši, tzv. brzi (R, eng. *rapid*) i spori (S, eng. *slow*). Kanali S-tipa (SLAC1) zaduženi su za iznošenje Cl^- i NO_3^- iz citoplazme ćelija zatvaračica. Takođe, depolarizacija

membrana utiče i na povećanje efluksa kalijumovih jona preko spoljašnjih ispravljajućih kanala (K_{out}), kao i inhibicije kanala za unos kalijuma (K_{in}). Promene u aktivnosti svih ovih kanala finalno dovode do smanjenja turgora ćelija i zatvaranja stoma (Danquah i sar., 2014; Ma i sar., 2018).

U kalcijum-nezavisnom putu u prisustvu ABA dolazi do fosforilacije OST1 kinaze (eng. *SnRK2.6/Open Stomata1*), koja postaje aktivna i stimuliše aktivaciju SLAC1, KUP/HAK/KT i QUAC1/ALMT1 proteinskih kanala za izlazak hloridnih, kalijumovih i malatnih jona iz ćelije, odnosno deluje inhibitory na aktivnost KAT1 kanala za ulazak kalijuma u ćeliju. Promene u regulaciji ovih kanala dovode do smanjenja turgora u ćelijama zatvaračicama i finalno do zatvaranja stoma (Chen i sar., 2020a).

1.4. Mehanizmi otpornosti biljaka na stres suše

Biljke su razvile različite strategije kako bi se izborile sa stresom suše. Ovi mehanizmi otpornosti na vodni stres mogu se podeliti na potpuno izbegavanje suše (eng. *escape*), izbegavanje suše (eng. *avoidance*) i na mehanizme tolerancije na sušu (Salehi-Lisar i Bakhshayeshan-Agdam, 2016). Sve tri strategije doprinose razvoju oprornosti na sušu, odnosno sposobnosti održavanja povoljnog vodnog balansa i turgidnosti pri stresu (Osmolovskaya i sar., 2018).

Potpuno izbegavanje suše jeste strategija karakteristična za jednogodišnje biljke, kada su rasteenje, razviće i dobijanje semena završeni pre nastupanja nepovoljnih uslova, odnosno celokupni životni ciklus biljke završen je pre pojave suše (Norton i sar., 2016). Ovaj adaptacioni mehanizam karakterističan je za populacije autohtonih biljaka, kao i nekih žitarica, kao što je pšenica (Shavrukov i sar., 2017). Kraći ciklus praćen je ranijim periodom cvetanja i sazrevanja plodova, što se smatra oblikom adaptacije na stres. Potpuno izbegavanje suše dešava se kada se fenološki razvoj biljke poklapa sa periodima kada postoji dovoljna vlažnost u zemljištu (Salehi-Lisar i Bakhshayeshan-Agdam, 2016). Prinos biljaka je direktno povezan sa trajanjem vegetativne i reproduktivne faze, te genotipovi koji rano sazrevaju potencijalno imaju niži indeks evapo-transpiracije, niži indeks lisne površine i samim tim i niži prinos (Aslam i sar., 2015).

Mehanizam izbegavanja suše podrazumeva sposobnost biljaka da izbegnu efekte suše, tj. da održavaju osnovne fiziološke procese pri blagom i umerenom vodnom deficitu tako što prilagođavaju brzinu svog rasteenja, kao i promene na morfološkom nivou (Delzon, 2015; Fang i Xiong, 2015). Ovaj mehanizam uključuje održavanje visoke vrednosti vodnog potencijala u stresnim uslovima povećanim usvajanjem vode, odnosno sprečavanje njenog odavanja transpiracijom (Osmolovskaya i sar., 2018). U ovim uslovima biljke imaju sposobnost brzog zatvaranja stoma, što je regulisano hormonom ABA, kako bi se sprečila prekomerna transpiracija. Takođe, dolazi do uvijanja listova i do njihovog voskiranja, a sve u cilju što većeg zadržavanja vode (Fang i Xiong, 2015; Osmolovskaya i sar., 2018). Primećene su i morfološke promene na nivou listova, te dolazi do redukcije lisne površine, pojave dlačica i formiranja manjih i tanjih listova (Gaur i sar., 2008; Aslam i sar., 2015). Ovo za posledicu ima i smanjenu fotosintezu, kao i preusmeravanje transporta asimilata u cilju poboljšanja rasteenja korena (Osmolovskaya i sar., 2018). Povećano usvajanje vode korenovim sistemom uslovljeno je njegovim izduživanjem, kako bi dospeo do dubljih slojeva zemljišta, a dolazi i do povećanog grananja korenova i povećanja odnosa korena i nadzemnog dela biljaka (Fang i Xiong, 2015; Salehi-Lisar i Bakhshayeshan-Agdam, 2016). Ovaj mehanizam otpornosti na stres obuhvata i ubrzani prelazak iz vegetativne u reproduktivnu fazu, kako bi se izbegli efekti veoma jakog stresa suše (Fang i Xiong, 2015).

1.4.1. Tolerancija biljaka prema suši

Tolerancija biljaka na sušu definiše se kao sposobnost biljaka da prežive pri niskim vrednostima ukupnog vodnog potencijala u tkivu (Kumar i sar., 2017). Da bi se u biljci normalno odvijali fiziološki procesi, dolazi do akumulacije jedinjenja koja imaju osmoprotektivnu ulogu (aminokiseline, ugljeni hidrati, poliamini), povećava se aktivnost enzima koji učestvuju u antioksidativnoj odbrani, kao i sadržaj neenzimskih antioksidanata (askorbat i glutation) i produkata sekundarnog metabolizma (Das i Roychoudhury, 2014). Proces akumulacije ovih jedinjenja označava se kao osmotsko prilagođavanje i veoma zavisi od stepena i dužine trajanja stresa (Murtaza i sar., 2016). Prilikom vodnog deficita, kao rezultat akumulacije osmolita snižava se osmotski potencijal u ćeliji, zbog čega dolazi do povećanja apsorpcije vode u ćeliji, što doprinosi održavanju turgorovog potencijala (Farooq i sar., 2009). Tokom osmotskog stresa biljne ćelije akumuliraju različite molekule u cilju sprečavanja gubitka vode i uspostavljanja turgora. Dolazi do akumulacije jona K^+ , Na^+ , Cl^- , ili organskih jedinjenja koja u sebi sadrže azot, kao što su prolin i druge aminokiseline, poliamini (putrescin, spermidin i spermin) i kvaternerna amonijum-jedinjenja, kao što je glicin-betain. Pored ovih osmolita, u odgovoru na stres dolazi do akumulacije saharoze, šećernih alkohola i oligosaharida. Akumulacija ovih osmolita dovodi do stabilizacije membrana i održavanje stabilne konformacije proteina pri niskim vrednostima vodnog potencijala (Reddy i sar., 2004; Alcázar i sar., 2020).

1.4.1.1. Aminokiseline

Prolin je proteinogena aminokiselina široko zastupljena kod viših biljaka, čiji se sadržaj značajno povećava pod dejstvom različitih faktora spoljašnje sredine (Ashraf i Foolad, 2007). Pokazano je da prilikom izlaganja biljaka suši, visokim koncentracijama soli, visokom intenzitetu svetlosti i UV zračenju, kao i prisustvu teških metala i oksidativnog stresa dolazi do akumulacije prolina (Szabados i Savoure, 2010). Povišena akumulacija prolina održava ćelijski turgor te se može koristiti kao biohemijski marker za proveru reakcija kod biljaka na sušu (Panda i sar., 2021).

Kao osmoprotektant prolin učestvuje u stabilizaciji proteinskih i membranskih struktura u ćeliji i redukuje osmotski potencijal, pri čemu sprečava da dođe do dehidratacije tkiva (Bandurska, 2001; Kavi Kishor i sar., 2015). Takođe, prolin ima ulogu i antioksidanta i signalnog molekula, čime dodatno obezbeđuje zaštitu biljke od gubitka vode (Ashraf i Foolad, 2007; Szabados i Savoure, 2010). Predstavlja svojevrstni depo ugljenika i azota koji će biljka koristiti nakon perioda stresa (Farooq i sar., 2009). U uslovima stresa akumulacija prolina može biti rezultat njegove povećane biosinteze, odnosno smanjene razgradnje (Planchet i sar., 2014). Kod biljaka postoje dva biosintetska puta prolina. Jedan započinje u mitohondrijama od glutaminske kiseline gde enzim Δ -1-pirolin-5-karboksilat-sintetaza (P5CS) katalizuje konverziju glutaminske kiseline u Δ -1-pirolidin-5-karboksilat (P5C) u citoplazmi ili hloroplastima, a zatim enzim P5C reduktaza (P5CR) redukuje nastali karboksilat do prolina. Ovaj put je glavni za biosintezu prolina u uslovima osmotskog stresa (Verbruggen i Hermans, 2008; Szabados i Savoure, 2010). Drugi biosintetski put prolina započinje od ornitina u mitohondrijama u prisustvu enzima ornitin δ -aminotransferaze (OAT), koji katalizuje formiranje P5C, koji se dalje redukuje do prolina pomoću aktivnosti enzima P5CR (Liang i sar., 2013). Prolin je važna komponenta matriksa ćelijskog zida. Proteini vezani za ćelijski zid bogati hidroksiprolinom veoma su značajni u održavanju strukture biljne ćelije, odnosno njene čvrstine (Kavi Kishor i sar., 2015).

Osim što imaju ulogu osmoprotektanata, slobodne aminokiseline značajno doprinose usvajanju azota kroz njegovu ponovnu asimilaciju i održavanje homeostaze proteina u uslovima suše (Ramanjulu i Sudhakar, 1997).

Pored fotosinteze, vodni stres utiče i na procese respiracije u biljkama (Atkin i Macherel, 2009). Respiracijom dolazi do sinteze ATP molekula, obezbeđuje se ugljenik za brojne biosintetske procese i reguliše ćelijski redoks-potencijal (Pires i sar., 2016). Iako respiracija prevashodno zavisi od oksidacije ugljenih hidrata, u uslovima stresa neophodno je obezbediti alternativne supstrate za respiratorne procese. Pokazano je da se aminokiseline razgranatog lanca (BCAA, eng. *branched-chain amino acids*) u uslovima suše alternativno koriste kao supstrati za ciklus limunske kiseline. Pri vodnom deficitu, katabolički produkti aromatičnih i aminokiselina razgranatog bočnog lanca mogu biti supstrati za flavoprotein/elektron-transfer flavoprotein-ubihinon oksidoreduktazni put (ETF/ETFQO), kao i alternativni donori elektrona elektron-transportnom lancu u mitohondrijama (Araújo i sar., 2010). ETF/ETFQO put, kao i produkti nastali katabolizmom BCAA (leucin, izoleucin i valin), ali ne nužno i akumulacija BCAA igraju značajnu ulogu u toleranciji biljaka na kratke sušne epizode (Pires i sar., 2016). Arginin, sa druge strane, predstavlja najveću rezervu organskog azota u biljkama i prekursor je u biosintezi različitih poliamina i azot monoksida (NO) čiji se nivo značajno povećava u suši (Winter i sar., 2015). Asparaginska kiselina učestvuje u biosintetskom putu različitih biomolekula, kao što su organske i aminokiseline, a prekursor je u biosintezi nikotinamid adenin dinukleotida (NAD). Zajedno sa glutaminskom kiselinom, asparaginom i glutaminom uključen je u reciklažu, skladištenje i transport azota kod semena u fazi klijanja i u vegetativnim organima biljaka. Pokazano je da se nivo asparaginske kiseline značajno menja u lisnom tkivu i korenu u suši (povećava ili smanjuje), te se ovaj metabolit može smatrati biomarkerom stresa suše (Han i sar., 2021). Takođe, povećanje sadržaja aminokiselina kao što su glutamin, triptofan, alanin, aspartat i ornitin nakon izlaganja suši ukazuju na to da su njihovi metabolički putevi direktno povezani sa razvijanjem tolerancije na vodni stres (You i sar., 2019).

1.4.1.2. Ugljeni hidrati

Kod brojnih biljnih vrsta zabeležen je visok stepen korelacije između akumulacije slobodnih ugljenih hidrata (šećera) i šećernih alkohola i tolerancije na sušu (Redillas i sar., 2012; Hou i sar., 2018; Marček i sar., 2019; Almaghamsi i sar., 2020; Du i sar., 2020a). Pri vodnom deficitu šećeri svoju funkciju iskazuju kao osmotski agensi i osmoprotektanti. Kao osmotski agensi učestvuju u održavanju ćelijskog turgora i osmotskog prilagođavanja, dok kao osmoprotektanti doprinose integritetu proteina i membranskih struktura formirajući vodonične veze sa polarnim ostacima aminokiselina i fosfatnim grupama u fosfolipidima (Mukarram i sar., 2021).

Osim što imaju ulogu u osmotskom prilagođavanju, ugljeni hidrati su ključni molekuli i signalni intermedijeri različitih metaboličkih puteva u biljnoj ćeliji (Kaur i sar., 2021). Pri vodnom stresu metabolizam ugljenih hidrata je veoma dinamičan proces koji uključuje istovremeno i njihovu akumulaciju i degradaciju (Rosa i sar., 2009). Proučavanje signalnih puteva, metabolizma, transporta i akumulacije ugljenih hidrata je neophodno kako bi se razumela njihova fiziološka funkcija i molekularna regulacija prilikom izlaganja biljaka suši. Brojne studije su pokazale da prilikom vodnog stresa dolazi do akumulacije različitih monosaharida, saharoze, trehaloze, oligosaharida rafinoznog tipa, fruktana i alkohola, kao što je sorbitol (Bartels i Sunkar, 2005; Mata i sar., 2016). Porast nivoa slobodnih ugljenih hidrata često je posledica hidrolize skroba i povećane ekspresije gena za saharoznu sintazu i saharoznu fosfatazu. Ovo je naročito izraženo kod biljaka vaskrsnica gde dolazi do značajne

akumulacije saharoze u cilju razvijanja tolerancije na stres (Scott, 2000; Bartels i Sunkar, 2005; Dinakar i Bartels, 2013).

Saharoza je disaharid sastavljen od molekula glukoze i fruktoze međusobno povezanih α -1, β -2-glikozidnom vezom. Ima ulogu osmolita koji održava ćelijsku homeostazu, a takođe je supstrat za procese ćelijske respiracije. Kod brojnih biljnih vrsta pokazano je da dolazi do njene akumulacije pri vodnom stresu (Massacci i sar., 1996; Mane i sar., 2008; Du i sar., 2020a), mada su zabeleženi slučajevi gde njen sadržaj opada (Todaka i sar., 2017; Yang i sar., 2019a). Takođe, pokazano je da u uslovima vodnog stresa dolazi do povećane ekspresije gena uključenih u njen metabolizam (Ozturk i sar., 2021). Održavanje homeostaze saharoze između različitih tkiva u biljci predstavlja važnu strategiju za rastenje i razviće tokom stresa. Pokazano je da povećani nivo ABA pri vodnom stresu u pirinču indukuje ekspresiju OsbZIP72 transkripcionog faktora, koji dalje reguliše ekspresiju transportera za saharozu, čime se utiče na njenu distribuciju u biljci tokom stresa (Mathan i sar., 2021). Takođe, ABA i saharoza regulišu ekspresiju ABI4 transkripcionog faktora (eng. *ABA-insensitive 4*) koji modulira ekspresiju različitih gena uključenih u razvijanju tolerancije na sušu (Kaur i sar., 2021). Pri blagom stresu suše osmoliti koji se dominantno akumuliraju su saharoza i prolin. Međutim, pri jakom vodnom stresu ili u kombinaciji sa toplotnim stresom predominantno se akumulira saharoza, dok se nivo prolina značajno ne menja (Rizhsky i sar., 2004). Gotovo 80% ugljen-dioksida asimilovanog u procesu fotosinteze usmerava se ka sintezi saharoze (Rosa i sar., 2009). Takođe, saharoza je najzastupljeniji ugljeni hidrat koji se transportuje od fotoasimilirajućih organa proizvođača do organa primaoca (potrošača) i čini preko 80% ukupne transportovane rastvorne materije u floemu, što se može pripisati njenoj nereaktivnoj strukturi (Kaur i sar., 2021; Ozturk i sar., 2021). Ulazak saharoze u floem može se odvijati preko apoplasta pomoću protonskih ATPaznih transportera, odnosno putem simplasta preko ćelija pratilaca. Pri vodnom stresu transport saharoze floemom usmeren je ka korenu kako bi se obezbedila neophodna energija za njegov rast (Kaur i sar., 2021). Povećana razgradnja saharoze do glukoze i fruktoze može da poboljša osmotsku regulaciju pri vodnom stresu. Takođe, pokazano je da postoji pozitivna korelacija između metabolizma saharoze u listovima i odnosa korena i nadzemnog dela biljke, odnosno da povećana biosinteza saharoze u listovima doprinosi većem rastu korena (Du i sar., 2020b). Razvoju tolerancije na stres saharoza doprinosi i tako što se vezuje za membranske i proteinske strukture i stabilizuje ih (Ozturk i sar., 2021).

Trehaloza je neredukujući disaharid sačinjen od dva molekula glukoze koja su međusobno povezana α , α -(1,1)-glikozidnom vezom. Hemijski je nereaktivna i odlikuje je visoka rastvorljivost, te se može akumulirati u većoj koncentraciji u biljci bez negativnog uticaja na metaboličke procese (Jinhua i sar., 2022). Značajan je izvor ugljenika i energije u biljkama (Mukarram i sar., 2021), ima transportnu funkciju, a u uslovima stresa svoj doprinos više pokazuje time što stabilizuje membranske strukture i onemogućava njihovu agregaciju i sprečava denaturaciju proteina i enzima, pre nego što učestvuje u regulaciji vodnog potencijala (Mane i sar., 2008; Farooq i sar., 2009; Fernandez i sar., 2010; Koyro i sar., 2012). Pokazano je da egzogeni tretman trehalozom u biljkama snižava nivo H_2O_2 i utiče na povećanu aktivnost antioksidativnih enzima, kao i na sadržaj hlorofila, te samim tim ima pozitivan efekat na procese fotosinteze (Yu i sar., 2019; Ozturk i sar., 2021). Tretman trehalozom snižava vrednosti ABA u biljci, odnosno dovodi do smanjene ekspresije gena koji kodiraju enzime uključene u njenu biosintezu, tj. indukuje ekspresiju gena povezanih sa katabolizmom i ABA signalizacijom. Stoga se može zaključiti da tretman trehalozom doprinosi razvijanju tolerancije na sušu tako što utiče na signalne procese ABA, a ne na njen metabolizam (Yu i sar., 2019).

Pri vodnom stresu promena koncentracije ugljenih hidrata posledica je regulacije njihovog metabolizma, odnosno transporta. Iako je proces asimilacije ugljenika narušen u

suši, biljke akumuliraju značajnu količinu rastvornih ugljenih hidrata, kao što su glukoza, fruktoza, stahioza, galaktoza, šećerni alkoholi (Mata i sar., 2016). Osim što održavaju turgor ćelije, rastvorni ugljeni hidrati su i signalni molekuli, a utiču i na ekspresiju velikog broja gena (Yang i sar., 2019a).

Ugljeni hidrati povezani su sa signalnim putevima koji su posredovani SnRK (eng. *sucrose non-fermenting related kinase*) i TOR (eng. *target of rapamycin*) kinazama (Kaur i sar., 2021). Pri stresu dolazi do aktivacije SnRK1, koja utiče na aktivnost različitih transkripcionih faktora – regulatora biosinteze jedinjenja koja se indukuju u suši. Takođe, glukoza i njeni derivati interaguju sa SnRK1 i SnRK2, koja zajedno učestvuju u ABA signalnom putu u cilju regulacije odgovora na stres suše (Hey i sar., 2009; Kulik i sar., 2011). TOR kinaza integriše spoljašnje i unutrašnje signale i na taj način učestvuje u procesu modulacije rasta kod biljaka. Pokazano je da glukoza u ćeliji ima stimulatorno dejstvo na aktivnost ove kinaze (Xiong i sar., 2013). Ugljeni hidrati i različiti biljni hormoni, na prvom mestu ABA, interaguju u cilju razvijanja tolerancije na sušu. Tako je pokazano da tokom suše glukoza direktno reguliše aktivnost ABA2 enzima koji je uključen u metabolizam ABA (Kaur i sar., 2021).

Vodni stres indukuje akumulaciju glukoze i fruktoze u fotoasimilirajućem tkivu lista, proizvođača asimilata (eng. *source*), i njihovu realokaciju do tkiva potrošača asimilata (eng. *sink*) –mladih listova i korena (Durand i sar., 2016). Dok glukoza ima ulogu osmolita, supstrata za ćelijsku respiraciju i signalnog molekula (Rosa i sar., 2009), fruktoza ne pokazuje primarno osmoprotektivnu funkciju, već je prvenstveno uključena u biosintezu sekundarnih metabolita, tj. povezana je sa biosintezom eritrozo-4-fosfata, supstrata za biosintezu lignina i drugih fenolnih jedinjenja (Hilal i sar., 2004).

Akumulacija ugljenih hidrata pri vodnom stresu odvija se određenom dinamikom. Pokazano je da se u najranijoj fazi suše prvo i u najvećoj meri akumuliraju rafinoza i oligosaharidi rafinoznog tipa (rafinoza, stahioza), pa tek onda fruktoza, eritritol i glukoza. Kako pri blagom stresu suše ne dolazi do značajne akumulacije ostalih ugljenih hidrata, za pomenute šećere može se reći da su najosetljiviji na vodni deficit (Todaka i sar., 2017; Fàbregas i Fernie, 2019). Oligosaharidi rafinoznog tipa održavaju turgor ćelija, stabilizuju proteine i membranske fosfolipide, a pokazuju i antioksidativna svojstva eliminišući hidroksilradikal, čime doprinose održanju redoks homeostaze u ćeliji (Nishizawa-Yokoi i sar., 2008). Pri dehidrataciji kod biljaka vaskrsnica dolazi do razgradnje rafinoze, čime se obezbeđuju rezerve ugljenika za sintezu saharoze. S druge strane, akumulacija rafinoze u dehidrataciji može poticati i od povećanog nivoa heksoza (ElSayed i sar., 2014). Povećani nivo galaktoze u suši povezan je sa biosintezom osmoprotektanata, dok akumulacija maltoze doprinosi očuvanju membranskih struktura. S druge strane, akumulirana ksiloza u suši prevashodno služi kao prekursor za biosintezu hemiceluloze u ćelijskom zidu biljaka (Khan i sar., 2020). Šećerni alkoholi ili polioli na osnovu strukture podeljeni su u dve grupe: ciklične (mioinozitol, pinitol) i linearne (sorbitol, manitol, ribitol, ksilitol). Ova jedinjenja su rastvorna u vodi i doprinose razvoju tolerancije biljaka na osmotski stres regulišući nivo jona natrijuma u vakuolama i apoplastu i održavanjem integriteta membranskih struktura (Sharma i sar., 2019). Sorbitol je šećerni alkohol sa šest C-atoma koji nastaje paralelno sa saharozom tokom fotosinteze i redistribuira se od tkiva proizvođača do tkiva potrošača u biljci (Singh i sar., 2015). Kao i većina poliola efekat u osmotskom prilagođavanju ovi molekuli postižu preko svojih hidroksilnih grupa koje zamenjuju -OH grupe u molekulu vode i služe za uspostavljanje hidrofилnih interakcija sa membranskim proteinima i lipidima, te na taj način učestvuju u održavanju ćelijskih struktura. Ova jedinjenja odlikuje inertnost u sistemu, odnosno ne ometaju odvijanje normalnih metaboličkih procesa u ćeliji (ElSayed i sar., 2014).

1.5. Antioksidativna zaštita u uslovima suše

1.5.1. Fenolna jedinjenja

Fenolna jedinjenja predstavljaju raznovrsnu grupu sekundarnih metabolita koji u svojoj strukturi sadrže aromatični prsten i jednu ili više hidroksilnih grupa (Sakakibara i sar., 2003). Svoja antioksidativna svojstva ispoljavaju na taj način što imaju veliki kapacitet da doniraju elektrone ili protone i grade stabilnije radikalske vrste od ROS (Rice-Evans i sar., 1996). Polifenoli takođe mogu da heliraju jone prelaznih metala i na taj način spreče formiranje reaktivnih kiseoničnih vrsta. Ova jedinjenja „hvataju” singletni kiseonik, a inhibiraju i lipidnu peroksidaciju vezivanjem za lipidni alkoksilni radikal. Dalje, učestvuju u modifikaciji membrana menjajući redosled lipida, čime smanjuju njihovu fluidnost (Sharma i sar., 2012). Takođe, fenolna jedinjenja u biljnim ćelijama predstavljaju veoma važne supstrate za peroksidaze klase III, pri čemu učestvuju u uklanjanju vodonik peroksida (Veljović Jovanović i sar., 2018). U osnovi njihove strukture nalazi se fenilpropanoidna jedinica (C6–C3) i mogu se podeliti na hidroksibenzojeve kiseline (HBA), hidroksicimetne kiseline (HCA), kumarine, flavonoide, proantocijanidine, stilbene, lignane i lignine (Antolovich i sar., 2000). Flavonoidi se na osnovu strukture dele na: flavone, flavonole, flavanone, flavanole, izoflavone, halkone i antocijanidine (Rice-Evans i sar., 1996) i imaju važnu ulogu u zaštiti tkiva od UV zračenja kada akumuliraju u epidermalnom sloju lista (Treutter, 2006). Nalaze se u različitim ćelijskim odeljcima, uglavnom u vakuolama i apoplastu, i to najčešće u formi glikozida. Mnoga fenolna jedinjenja, pre svega hidroksicimetne kiseline i lignin učestvuju u polimerizaciji ćelijskog zida kod biljaka. Fenolna jedinjenja akumuliraju se u biljkama kao odgovor na različite abiotske i biotske stresogene faktore i doprinose razvoju tolerancije na njih (Naikoo i sar., 2019).

1.5.2. Karotenoidi

Karotenoidi (likopen, β -karoten) su lipofilni antioksidanti uključeni u eliminaciju reaktivnih kiseoničnih vrsta. Kod biljaka apsorbuju svetlost u oblasti 400–550 nm i direktno su uključeni u procese fotosinteze. Svoja antioksidativna svojstva ispoljavaju tako što vrše uklanjanje singletnog kiseonika nastalog u procesima fotosinteze, čime sprečavaju oštećenja fotosintetskog aparata. Takođe, učestvuju u uklanjanju lipidnog peroksil radikala, čime doprinose održavanju integriteta membrana (Sharma i sar., 2012; Havaux, 2014).

1.5.3. Askorbat

Askorbinska kiselina ili askorbat (Asc) je veoma zastupljen antioksidant u biljnom svetu. Njegov biosintetski put u biljkama započinje od guanozin-difosfat-manoze (GDP-Man) preko različitih galaktoznih intermedijera do L-galakono-1,4-laktone (Smirnoff i Wheeler, 2000).

Uključen je u brojne fiziološke procese u biljkama, kao što su fotosinteza, deoba ćelije i ćelijska diferencijacija, razviće, i u procese adaptacije na različite stresne faktore (Akram i sar., 2017; Xiao i sar., 2021). Nađen je u gotovo svim tipovima ćelija biljaka, ima ga i u organelama (hloroplasti, mitohondrije, vakuole) i apoplastu. Smatra se veoma moćnim antioksidantom jer ima sposobnost da donira elektrone u brojnim enzimskim i neenzimskim reakcijama (Veljović Jovanović i sar., 2017). Askorbat ima ključnu ulogu u eliminaciji ROS koje nastaju prilikom

izlaganja biljaka različitim abiotikom stresu, kao što su svetlost visokog intenziteta, suša ili salinitet (Vidović i sar., 2015a; Anjum i sar., 2017b; AbdElgawad i sar., 2016). Takođe, kofaktor je za različite enzime koji učestvuju u biosintezi hormona, na primer za NCED, koji učestvuje u metabolizmu ABA (Pastori i sar., 2003) ili 1-aminociklopropan-1-karboksilat oksigenazu, koja katalizuje stvaranje etilena (Houben i Van de Poel, 2019). Askorbat učestvuje u hidrosilaciji prolinskih ostataka tokom biosinteze ekspanzina, te je značajan za elongaciju korenova, formiranje vakuola i širenje ćelijskog zida (Noctor i Foyer, 1998a). U fiziološkim uslovima askorbat uglavnom egzistira u redukovanoj formi, a u hloroplastima njegova koncentracija može biti čak u milimolarnom opsegu (Noctor i Foyer, 1998a). U višim koncentracijama zastupljen je u tkivima koja učestvuju u procesima fotosinteze i u tkivima koja se intenzivno dele (meristem), dok u apoplastu učestvuje u antioksidativnoj odbrani ćelijskog zida (Smirnoff, 2005). Superoksid-anjon-radikal nastao u hloroplastima prilikom izlaganja biljaka visokom intenzitetu svetlosti u prisustvu enzima superoksid-dizmutaze disproporcioniše do H_2O_2 i vode, pri čemu nastali peroksid biva uklonjen aktivnošću askorbat-peroksidaze, koja kao donor elektrona koristi askorbat (Veljović Jovanović i sar., 2001). S druge strane, askorbat može direktno da neutrališe singletni kiseonik, koji vrši oksidaciju karotenoida i tokoferola, pri čemu oni bivaju redukovani od strane askorbata (Smirnoff, 2005). U indirektnom uklanjanju ROS askorbat je kofaktor za enzim violaksantin de-epoksidazu (VDE), koja učestvuje u redukovanju violaksantina u zeaksantin, te na taj način štiti fotosistem II od fotooksidacije (Xiao i sar., 2021). Askorbat igra ključnu ulogu u održavanju redoks homeostaze kod biljaka, koja je značajno narušena u abiotikom stresu, kada dolazi do akumulacije ROS. Redoks stanje askorbata u apoplastu regulisano je pomoću enzima askorbat oksidaze (AO) smeštenog u ćelijskom zidu, koji katalizuje oksidaciju askorbata uz istovremenu redukciju O_2 do H_2O_2 (Pignocchi i Foyer, 2003). Pokazano je i da je aktivnost AO u korelaciji sa brzinom razvića ćelijskog zida (Smirnoff i Wheeler, 2000). *De novo* sinteza askorbata, kao i njegova regeneracija u askorbat-glutation (Asc-GSH) ciklusu od dehidroaskorbata (DHA) u prisustvu glutaciona, odnosno mono-dehidroaskorbata (MDHA) u prisustvu enzima mono-dehidroaskorbat reduktaze (MDHAR), ključni su za eliminaciju ROS u stanju stresa i za razvoj tolerancije na stres. Ukoliko ne dođe do regeneracije askorbata, oksidovana forma će se raspasti do oksalata ili tartarata (Green i Fry, 2005). Tako je pokazano da u suši dolazi do povećane ekspresije gena koji kodiraju enzime Asc-GSH ciklusa, čime se povećava tolerancija na nju (Broad i sar., 2020). U okviru askorbat-glutation ciklusa MDHAR katalizuje redukciju MDHA do askorbata u prisustvu nikotinamid adenin dinukleotid fosfata NAD(P)H. Redukcija DHA do askorbata odvija se u prisustvu dehidroaskorbat reduktaze (DHAR), koja za donore elektrona koristi redukovani glutacion (GSH), pri čemu se formira njegova oksidovana forma (GSSG). GSSG se zatim prevodi do redukovanog glutaciona aktivnošću glutacion-reduktaze (GR) u prisustvu NADPH (Foyer i Noctor, 2011).

1.5.4. Glutation

Glutation je mali, unutarćelijski tiolni molekul, zastupljen kod većine prokariota i eukariota, u kojima predstavlja glavni izvor neproteinskog redukovanog sumpora. Redukovana forma glutaciona (GSH) je tripeptidni tiol formule γ -Glu-Cys-Gly, dok se u oksidovanom obliku (GSSG) nalazi još jedan molekul GSH (Noctor i Foyer, 1998a). Izuzetno je snažan antioksidant i učestvuje u brojnim procesima u ćeliji. Biosinteza glutaciona podrazumeva dve uzastopne ATP-zavisne reakcije u prisustvu enzima γ -glutamilmcistein sintetaze i glutacion sintetaze (Noctor i sar., 2002b). U ćeliji se nalazi u citosolu, mitohondrijama i endoplazmatičnom retikulumu. Glutation je uključen u različite fiziološke procese u biljkama, kao što su rasteenje i razviće, sinteza proteina i nukleinskih kiselina, genska ekspresija, i to naročito tokom abiotskog stresa. Prekursor je fitohelatina koji vezuju

teške metale, ali je i supstrat za GSH-S-transferazu koja katalizuje konjugaciju glutationa sa različitim ksenobioticima (Hasanuzzaman i sar., 2019). Svoja antioksidativna svojstva ispoljava time što redukuje oksidativni stres, sprečava lipidnu peroksidaciju i štiti integritet ćelijske membrane (Hasanuzzaman i sar., 2017). Redoks stanje glutationa je u korelaciji sa nivoom oksidativnog stresa u biljci. Takođe, glutation je od značaja za održavanje redoks stanja askorbata u biljnim ćelijama, što se postiže kroz pomenuti Asc-GSH ciklus (Noctor i sar., 2012; Ding i sar., 2020).

1.6. Ćelijski zid

Ćelijski zid određuje oblik i veličinu ćelija, pruža mehaničku potporu, štiti ćelijsku membranu i reguliše morfologiju tkiva i organa. Ćelijski zid predstavlja prvu liniju odbrane ćelije od različitih patogena (Le Gall i sar., 2015; Tenhaken, 2015). Pri dehidraciji gubitak vode u ćeliji manifestuje se njenim smanjenim turgorom, što direktno utiče na opuštanje i zatezanje ćelijskog zida. Tako u tkivima koja treba da rastu i pri dehidraciji dolazi do opuštanja strukture ćelijskog zida, dok u onim tkivima koja nisu esencijalna za rast dolazi do njegovog zatezanja (Moore i sar., 2008).

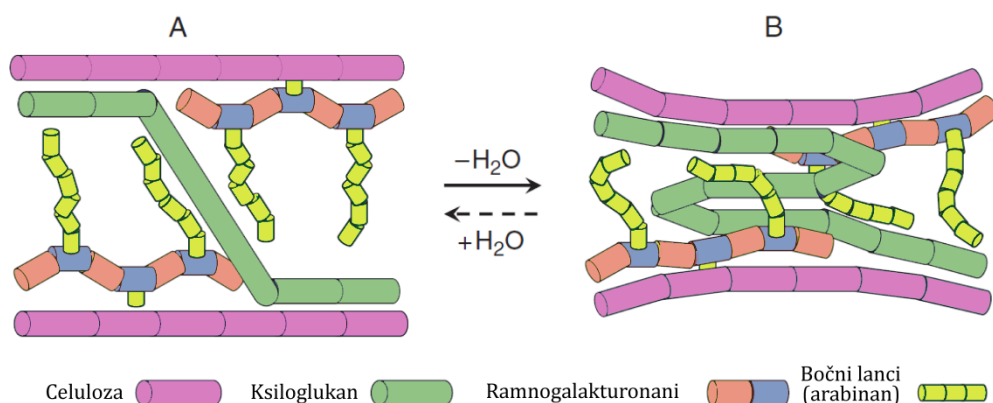
Ćelijski zid je kompleksna struktura sačinjena od celuloznih mikrofibrila i neceluloznih polisaharida uronjenih u pektinski matriks, a u njegov sastav ulaze i različiti strukturni proteini i lignin (Le Gall i sar., 2015). Sastoji se iz primarnog i sekundarnog zida i središnje lamele (Nešković i sar., 2003). Primarni i sekundarni ćelijski zid razlikuju se po svojoj organizaciji, fleksibilnosti i strukturi polimernog matriksa, rasporedu mikrofibrila, mehaničkim svojstvima, kao i ulozi koju imaju tokom razvića biljaka (Ganie i Ahammed, 2021). Primarni ćelijski zid karakterističan je za metabolički aktivne ćelije, uspostavlja se tokom ćelijske deobe, fleksibilan je i veoma hidratisan, te je podložan istezanju tokom rastezanja. S druge strane, sekundarni ćelijski zid javlja se nakon završene ćelijske deobe u diferenciranim tkivima, rigidniji je, slabo podložan istezanju, manje hidratisan i sadrži veći udeo celuloze, čime se obezbeđuje veća mehanička čvrstoća nego u primarnom zidu (Le Gall i sar., 2015; Ganie i Ahammed, 2021). Primarni ćelijski zid sastoji se od celuloze, hemiceluloze i pektina. Sadržaj celuloze je relativno nizak, tek oko 20%, ali ipak dovoljan da obezbedi mehaničku čvrstoću (Tenhaken, 2015). Celulozna vlakna su umrežena sa hemiceluloznim vlaknima, pre svega ksiloglukanom i pektinskim polimerima u kojima dominira homogalakturonan, ramnogalakturonan I i ramnogalakturonan II. Upravo pektinske komponente formiraju hidratisani matriks u koji su uronjene celulozne i hemicelulozne komponente (Sasidharan i sar., 2011). Za razliku od primarnog, u sekundarnom ćelijskom zidu dominantne komponente su glukoarabino-ksilani i β -glukani koji se umrežavaju sa celuloznim mikrofibrilima. Smatra se da su pektinske komponente međusobno povezane kovalentnim vezama, dok sa ksiloglukanom ostvaruju i kovalentne i nekovalentne interakcije (Cosgrove, 2005). Tokom formiranja sekundarnog ćelijskog zida prekursori lignina umrežavaju se kroz proces polimerizacije čiji nivo zavisi od prisustva ROS i aktivnosti lakaza i peroksidaza u zidu (Hamann, 2012). Lignifikacija zida doprinosi njegovoj čvrstoći i rigidnosti, naročito u stresnim uslovima (Moura i sar., 2010; Le Gall i sar., 2015). Takođe, u zidu su zastupljeni i estri *p*-kumarne i ferulične kiseline, koji dodatno doprinose umrežavanju i učvršćivanju polimernog matriksa (Tenhaken, 2015; Le Gall i sar., 2015).

Interakcije između polimera u ćelijskom zidu regulisane su aktivnošću različitih proteina koji su značajni za modifikaciju strukture i svojstava ćelijskog zida, doprinoseći povećanju ćelijskog obima tokom aklimacije na različite stresne uslove (Ganie i Ahammed, 2021). Ekspanzini predstavljaju veoma raznoliku klasu proteina ćelijskog zida koji indukuju njegovo širenje i opuštanje. Podeljeni su u četiri klase: α -ekspanzini (EXPAs), β -ekspanzini

(EXPBs), proteini nalik ekspanzinu A (EXLA, eng. *expansin-like A*) i proteini nalik ekspanzinu B (EXLB, eng. *expansin-like B*) (Sampedro i Cosgrove, 2005). Svoju funkciju ispoljavaju tako što narušavajući nekovalentne interakcije između celuloznih mikrofibrila i hemiceluloze stimulišu ekspanziju (širenje) ćelijskog zida. Njihova funkcija pokazana je prilikom sazrevanja plodova, elongacije korena i izdanka ili apcisijske tokom razvića (Sasidharan i sar., 2011). Na opuštanje ćelijskog zida utiču i enzimi ksiloglukan endotransglukozilaze i endotranshidrolaze tako što narušavaju vodonične veze između ksilogukana i celuloze, čime se reguliše širenje zida. Takođe, ovi enzimi učestvuju i u očvršćavanju i remodeliranju zida stimulišući umetanje novih jedinica ksiloglukana u već postojeću mrežu celuloza-ksiloglukana, odnosno raskidanjem i formiranjem novih veza između ksiloglukanskih lanaca (Sasidharan i sar., 2011; Ganie i Ahammed, 2021). Endo- β -1,4-glukanaze hidrolizuju β -1,4-glukanske veze čime uzrokuju opuštanje zida delujući na celulozno-ksiloglukansku mrežu (Sasidharan i sar., 2011). Pored pomenutih enzima koji učestvuju u istežanju ćelijskog zida, na njegovu plastičnost utiču i pektin-modifikujući enzimi, kao što je pektin metilesteraza, pektin acetilesteraza, poligalakturinaza i pektat liaza. Ovi enzimi regulišu očvršćavanje, ali i opuštanje zida, što zavisi od ćelijske pH vrednosti i dostupnosti jona kalcijuma (Ganie i Ahammed, 2021).

Strukturni proteini su još jedna veoma važna komponenta ćelijskog zida biljaka, koja zajedno sa pomenutim polisaharidima učestvuje u formiranju njegove arhitekture. Smatra se da gotovo 10% zida čine upravo strukturni proteini (Wolf i sar., 2012). O-glikoproteini bogati hidroksiprolinom (HRGP, eng. *hydroxyproline-rich O-glycoproteins*) sadrže Pro-Pro ponovke i različito su glikozilovani. Klasifikuju se na ekstenzine (EXT), koji su umereno glikozilovani, zatim visokoglikozilovane arabinogalaktanske proteine (AGP) i proteine bogate hidroksiprolinom i prolinom (H/PRP) koji mogu, ali i ne moraju biti glikozilovani (Kavi Kishor i sar., 2015).

Na promenu turgora u ćeliji zid reaguje dvojako–svojom elastičnošću, tj. reverzibilnim istežanjem i plastičnošću (nepovratnim, odnosno viskoznim istežanjem), što finalno dovodi do tzv. viskoelastičnog rastežanja ćelija (Moore i sar., 2008). Usled gubitka vode iz matriksa ćelijskog zida (slika 4) dolazi do narušavanja organizacije polisaharidnih polimera i do njihove adhezije, što rezultira u izmenjenim biofizičkim svojstvima zida i finalno redukovanom rastu biljaka (Moore i sar., 2008).



Slika 4. Prikaz uticaja gubitka vode na strukturu ćelijskog zida. Polisaharidni polimeri su odvojeni u hidratisanom zidu (A), dok se pri gubitku vode dovode u neposrednu blizinu uzrokujući polimernu adheziju (B). Preuzeto i prilagođeno iz Moore i sar., 2008.

Elastičnost ćelijskog zida smatra se najznačajnijim fiziološkim mehanizmom adaptacije biljaka na vodni stres zato što doprinosi održavanju ćelijskog turgora i volumena simplasta

(Martínez i sar., 2007). Pokazano je i da pri dehidraciji dolazi do izmenjene biosinteze celuloze. Povećanje nivoa celuloze u zidu pri suši ukazuje na njen značaj u održavanju ćelijskog turgora, čime se omogućava rast ćelija i pri niskim vrednostima vodnog potencijala (Le Gall i sar., 2015). S druge strane, suša može indukovati i njenu smanjenu biosintezu (Sweet i sar., 1990). Takođe, u suši dolazi do povećane ekspresije gena za endotransglukozilazu, koja učestvuje u biosintezi ksiloglukana, što navodi na zaključak o značaju ksiloglukana u održavanju tolerancije biljaka na stres suše (Choi i sar., 2011). Na razvijanje tolerancije na vodni stres značajno utiče i sadržaj pektina u ćelijskom zidu. Pokazano je da udeo homogalakturonana direktno koreliše sa stepenom otpornosti na vodni stres, odnosno da je stepen njegove metilesterifikacije ključan za održavanje rigidnosti i hidratisanosti pektinskog matriksa. Takođe, količina bočnih lanaca u ramnogalakturonanu I i ramnogalakturonanu II određuje nivo hidratisanosti matriksa zida, te je u nekim tolerantnim kultivarima pri stresu suše njihov nivo značajno povećan (Le Gall i sar., 2015). Kod biljaka vaskrsnica, kao i kod nekih kultivara tolerantnih na sušu, bočni pektinski lanci obogaćeni su polimerima arabinoze, kao što su pektin-arabinan, arabinogalaktanski proteini i arabinoksilani čija se uloga ogleda u tome da sprečavaju jake interakcije između pektinskih polisaharida u zidu, čime povećavaju njegovu fleksibilnost (Sasidharan i sar., 2011; Le Gall i sar., 2015; Wang i sar., 2016). Pri vodnom stresu kod kultivara tolerantnih na sušu aktivnost enzima uključenih u biosintezu pektinskih polisaharida značajno je povećana, kao i aktivnost inhibitora pektinskih hidrolaza (Wang i sar., 2016). Akumulacija lignina u zidu u suši predstavlja još jedan vid adaptacije biljaka na stres. Ovo je praćeno povećanom aktivnošću enzima uključenih u njegovu biosintezu (PAL, fenilalanin-amonijum liaza), kao i povećanom akumulacijom fenolnih prekursora i ligninskih monomera koji se kovalentno umrežavaju sa polisaharidnim komponentama zida. Proces lignifikacije zida u suši praćen je uklanjanjem vode iz zida, što dovodi do njegovog očvršćavanja, tj. ojačavanja (Moore i sar., 2008; Wang i sar., 2016).

1.7. Paradajz i suša

Paradajz (*Lycopersicon esculentum* Mill.) je veoma značajan za ljudsku ishranu i jedna od najrasprostranjenijih gajenih biljnih kultura, naročito na Mediteranu (Sabir and Singh, 2013; <http://faostat.fao.org/site/291/default.aspx>). Tokom poslednjih decenija, usled klimatskih promena, ovaj region je značajno pogođen sušnim epizodama, što uzrokuje velike gubitke u prinosu (Jacobsen i sar., 2012; Hervás-Gámez i sar., 2019). Jedan od najvažnijih zahteva savremene poljoprivrede jeste otkrivanje ključnih metaboličkih puteva odgovornih za razvijanje tolerancije paradajza na sušu, kako se nedostatak vode ne bi odrazio na njegov prinos. Iako su mehanizmi razvoja tolerancije paradajza na sušu u velikoj meri proučavani, ova istraživanja uglavnom su bila usmerena na ispitivanja promena na nivou ploda (Foolad 2007; Gerszberg i Hnatuszko-Konka., 2017). Međutim, poslednjih godina gajenje paradajza u plastenicima je poraslo u tolikoj meri tako da danas predstavlja primarni način njegove proizvodnje i to tokom čitave godine (Boulard i sar., 2011; Živanović i sar., 2017).

Paradajz predstavlja dobar model sistem za proučavanje različitih metaboličkih promena usled delom identifikovane genske mape.

U današnje vreme regulisani deficit navodnjavanja – RDI (eng. *regulated deficit irrigation*) i delimično sušenje korenovog sistema – PRD (eng. *partial root-zone drying*) su veoma rasprostranjene tehnike navodnjavanja koje se koriste u proizvodnji paradajza. PRD tehnika podrazumeva navodnjavanje jedne polovine korenovog sistema, dok se druga polovina isušuje do određenog nivoa vlage u zemljištu, a zatim se vrši rotacija navodnjavanja (Stikić i sar., 2003). Istraživanja su pokazala da primena PRD tehnike doprinosi razvoju

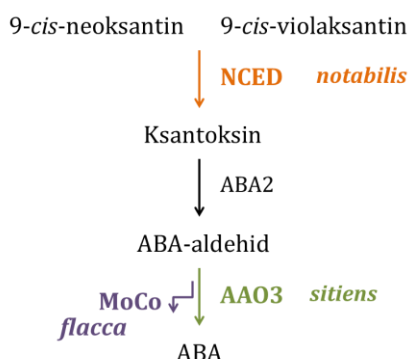
tolerancije paradajza na sušu, odnosno u plodovima je primećen povećani antioksidativni kapacitet i akumulacija ugljenih hidrata (Stikić i sar., 2003; Jovanović i sar., 2010).

Sa druge strane, izbor genotipova koji pokazuju najveću tolerantnost na sušu zasniva se na velikoj raznolikosti dostupnih sorti i ima za cilj da se postigne najveći prinos pri ograničenim vodnim resursima (De Oliveira i sar., 2021; Sousaraei i sar., 2021). Razumevanje molekularnih osnova adaptivnih varijacija između genotipova moglo bi pomoći da se indukuju specifične osobine biljaka tokom razvića koje bi bile korisne u narednim epizodama suše.

1.7.1. ABA deficijentni mutanti paradajza

Kao što je već rečeno, ABA predstavlja ključni hormon, koji je u osnovi brojnih regulatornih mehanizama za odgovor biljaka na stres suše (Ali i sar., 2020). Karakterizacija ABA-deficijentnih mutanata predstavlja efikasan način za razumevanje funkcije i metabolizma ovog hormona u biljkama pri vodnom stresu. Kod paradajza su identifikovana tri mutanta sa redukovanim sadržajem ABA: *notabilis*, *sitiens* i *flacca*. U *notabilis* mutacija se nalazi na genu koji kodira NCED (Burbidge i sar., 1999), dok je u *sitiensu* smanjeni sadržaj ABA posledica onemogućene konverzije ABA-aldehida u ABA (Harrison i sar., 2011). *Flacca* je mutant sa recesivnim tačkastim mutacijama koje su nastale primenom X-zraka (Tal, 1966). U ovom mutantu usled delecije 6 baznih parova u molibden-kofaktor sulfurazi dolazi do smanjenja oksidacionog kapaciteta AAO i ksantin dehidrogenaze (Nitsch i sar., 2012) (slika 5). Međutim, iako je usled mutacije smanjen kapacitet za oksidaciju ABA-aldehida do ABA, ovi mutanti i dalje mogu da akumuliraju određenu količinu ABA. Pokazano je da se u listovima kod *flacca* mutanta sintetiše manje 20–50% ABA (Sharp i sar., 2000; Dodd i sar., 2009; López-Ráez i sar., 2010; Nitsch i sar., 2012), dok je na nivou korena sinteza ABA opala za oko 33% u odnosu na divlji tip (Sagi i sar., 1999).

U poređenju sa divljim tipom, *flacca* mutant pokazuje veću provodljivost stoma, viši nivo transpiracije, kao i niže vrednosti vodnog potencijala (Tal, 1966, Chen i sar., 2002, 2003). Ove mutante odlikuje i smanjen rast, redukovana lisna površina, pojava kovrdžavih listova, kao i tanja stabljika (Taylor i Tarr, 1984; Bradford, 1983; Cornish i Zeevaart, 1988). Pokazano je da se *flacca* biljke sporije razvijaju i rastu i da su manje visine i mase u poređenju sa roditeljskom linijom u istom stupnju razvoja (Tal i Imber, 1970; Nitsch i sar., 2012). Takođe, izražena je epinastija listova, naročito u gornjim delovima biljke (Tal i Imber, 1970).



Slika 5. Prikaz mesta u biosintetskom putu ABA gde se nalaze mutacije za *notabilis*, *sitiens* i *flacca* mutant.

Flacca mutant ima tendenciju brzog uvenuća listova zbog visoke stope transpiracije koja nastaje kao posledica sniženog nivoa ABA, a koji ne utiče u dovoljnoj meri na zatvaranje stoma (Sagi i sar., 1999). Usled sniženog nivoa ABA ne dolazi do optimalnog zatvaranja stoma, čime bi se smanjio nivo transpiracije, što finalno utiče na brzo uvenuće listova. Međutim, pokazano je da tretiranje ovih biljaka egzogenom ABA dovodi do toga da njihov fenotip postaje veoma sličan fenotipu divljeg tipa u kontekstu debljine i visine biljaka, veličine listova, oblika i turgidnosti (Tal, 1966; Imber i Tal, 1970; Chen i sar., 2002). Pošto se ABA hormon smatra inhibitorom rasta, očekivalo bi se da je *flacca* mutant većeg rasta u odnosu na divlji tip. Međutim, smanjeni rast *flacca* posledica je interakcije ABA hormona sa drugim biljnim hormonima, prvenstveno sa etilenom i njegovom povećanom sintezom (Sharp i sar., 2000).

1.8. Nekodirajuće RNK i njihova uloga u razvijanju memorije stresa suše kod biljaka

Nekodirajuće RNK (nkRNK, eng. *non-coding RNAs*) predstavljaju funkcionalne RNK molekule koji imaju nizak potencijal da kodiraju proteine. Na osnovu svoje dužine, podeljene su na male nekodirajuće RNK (eng. *small non-coding RNAs*) veličine 18–30 nukleotida (nt), nekodirajuće RNK srednje dužine (eng. *medium-sized ncRNAs*) veličine 31–200 nt i dugačke nekodirajuće RNK (eng. *long non-coding RNAs, lncRNAs*) veličine preko 200 nt (Liu i sar., 2015; Wang i sar., 2017; Chen i sar., 2020b). Takođe, na osnovu veličine postoji i druga podela samo na male RNK (manje od 200 nt) i dugačke RNK (preko 200 nt) (Cao, 2014). Nekodirajuće RNK koje su u opsegu veličine od 50–200 nukleotida podrazumevaju nekoliko familija ovih molekula koje obuhvataju tRNK (eng. *transfer RNAs*), male nuklearne RNK (snRNK, eng. *small nuclear RNAs*) i male nukleolarne RNK (snoRNAs, eng. *small nucleolar RNAs*) (Boivin i sar., 2019).

Nekodirajuće RNK uključene su u razvijanje memorije stresa suše, pre svega time što posreduju u transdukciji signala, metabolizmu ABA i jasmonske kiseline (Liu i sar., 2022). U biljkama su male nekodirajuće RNK (eng. *small RNAs*) veličine 18–30 nt uključene u održavanje stabilnosti genoma, procese genske ekspresije, razvića biljaka i u adaptivni odgovor na abiotički i biotički stres (Bonnet et al, 2006; Vaucheret, 2006). Podeljene su u tri klase: mikro RNK (eng. *microRNAs*), male interferirajuće RNK (eng. *small interfering RNAs, siRNAs*), i trans-aktivne male interferirajuće RNK (eng. *trans-acting small interfering RNAs*) (Bonnet et al, 2006). Ova klasa RNK molekula ne učestvuje u procesima translacije proteina, međutim svoj efekat ostvaruju tako što mogu negativno da regulišu gensku ekspresiju (Chinnusamy i sar., 2007). Male RNK negativno deluju na gensku ekspresiju, na nivou DNK tako što utiču na procese remodeliranja hromatina ili eliminaciju nekih sekvenci, dok na nivou RNK deluju tako što vrše njeno cepanje, odnosno inhibiraju procese translacije (Vaucheret, 2006). U poređenju sa drugim epigenetskim regulatornim mehanizmima, male RNK veoma brzo reaguju na efekte spoljašnje sredine i deluju kao pokretni signalni molekuli koji modifikuju nivo ekspresije različitih target (ciljnih) gena. Prilikom izlaganja stresu u biljkama dolazi do smanjenja ili povećanja sinteze već postojećih malih RNK, odnosno do stvaranja novih kako bi se biljke lakše izborile sa stresom (Li i sar., 2017). Istraživanja su pokazala da miRNK posreduju u razvijanju memorije kod biljaka kako bi se lakše adaptirale na ponovljeni stres (Liu i sar., 2022).

Male RNK svoj efekat ispoljavaju tako što prepoznaju komplementarne sekvence u mRNA ili DNK, što dovodi to posttranskripcionog utišavanja gena usled degradacije ciljne mRNA ili inhibicije njihove translacije. Za ovo su zaslužne mikro RNK (miRNK) i male interferirajuće RNK veličine 21–22 nukleotida, dok su za transkripciono utišavanje gena

preko metilacije DNK molekula odgovorne male interferirajuće RNK veličine 24 nukleotida (Ashapkin i sar., 2020). Istraživanja su pokazala da je utišavanje RNK posredovano malim RNK molekulima jedan od regulatornih mehanizama u odgovoru na abiotski stres. Argonaut proteini za koje su vezane male RNK vezuju se preko proteina za remodeliranje hromatina (npr. za SWI/SNF, eng. *switch/non-fermenting*), pri čemu male RNK mogu onda da interaguju sa različitim stres-zavisnim genima i da regulišu njihovu ekspresiju i na taj način sudeluju u odgovoru na abiotski stres (Liu i sar., 2018).

Pokazano je da suša u listovima paradajza indukuje akumulaciju Sly-miR169 (*Solanum lycopersicum*) male RNK. Ove RNK pripadaju familiji miRNK i uključene su u rastenje i razviće kod biljaka, kao i u odgovoru na različite vrste stresa (Balyan i sar., 2015). Pokazano je da ciljni geni za miR169 jesu neki od nukleinskih transkripcionih faktora (NF-Y, eng. *nuclear factor Y*). NF-Y su CCAAT-box vezujući transkripcioni faktori koji kontrolišu ekspresiju oko 25% gena kod eukariota. Veoma su značajni za procese razvića biljaka i odgovora na abiotski stres, a neki od njih, koji su targeti pomenute miR169 doprinose toleranciji na sušu. Kod paradajza je pokazano da je pri suši inhibirana ekspresija NF-Y gena, odnosno da je indukovana akumulacija miR169 (Zhang i sar., 2011; Li i Liu, 2016). U Arabidopsisu je pokazano da suša indukuje različite mikro RNK, kao što su miR167, miR168, miR171 i miR396. Takođe, neke od njih indukuju se i u prisustvu drugih stresogenih faktora, kao što su visok salinitet i hladnoća. Indukcija ovih miRNK dovodi do represije gena koji kodiraju određene transkripcione faktore, koji dalje utiču na ekspresiju gena za određene proteine koji igraju značajnu ulogu u odbrani od stresa (Liu i sar., 2008). Pokazano je da povećana ekspresija miRNK, kao što su miR396, miR394, miR164, miR408 i miR2118 doprinosi razvoju tolerancije na stres suše. One svoj efekat ispoljavaju tako što suprimiraju target gene čiji proteinski produkti učestvuju u regulaciji procesa razvića ili oksidativnog statusa, odnosno reaguju na promenu sadržaja ABA i kontrolišu zatvaranje stoma (Li i sar., 2017; Wang i sar., 2017). Proteinski produkti gena koji su pod uticajem malih RNK jesu neke E3 ligaze koje učestvuju u ubikvitinaciji proteina, lakaze koji učestvuju u metabolizmu ćelijskog zida, citohrom p450, enzimi koji učestvuju u eliminaciji ROS, kao i proteini uključeni u metabolizam ugljenih hidrata (Chinnusamy i sar., 2007). Takođe, pokazano je da su u stresu suše neke miRNK regulisane na ABA-zavisan i ABA-nezavisan način (Kumar i sar., 2022).

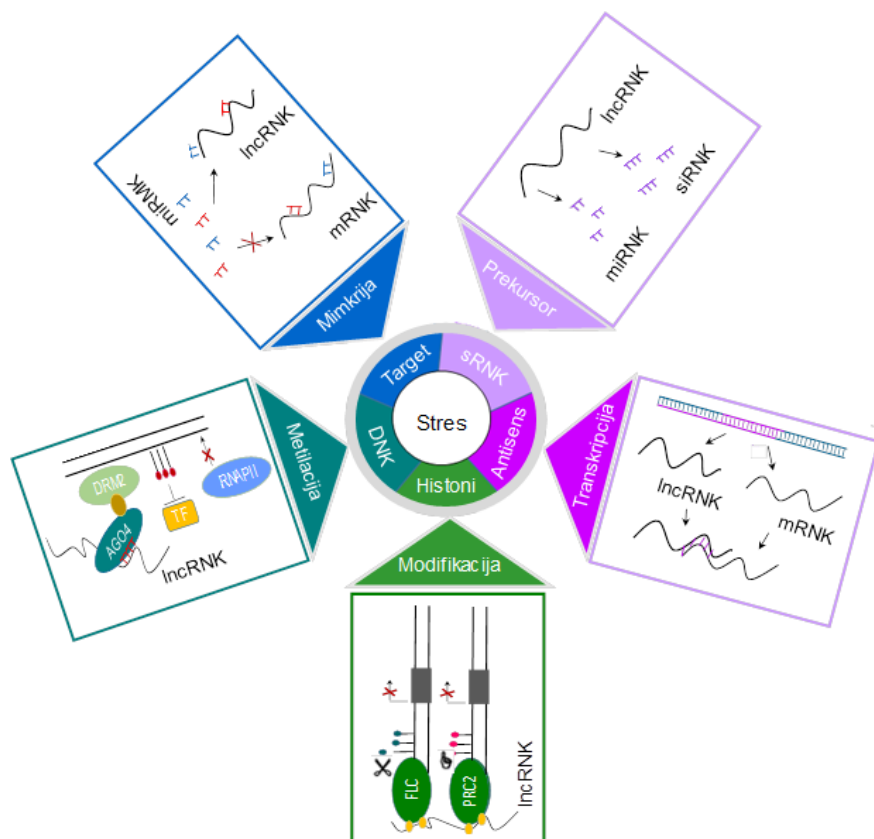
Za nekodirajuće RNK srednje dužine pokazano je da učestvuju u specifičnoj lokusnoj modifikaciji ribozomalne RNK, alternativnom splajsovanju, ali i kao prekursori za neke male RNK. Takođe, do promene u njihovoj sintezi dolazi i prilikom osmotskog stresa, u stresu soli i suši, ali i u različitim fazama razvića biljaka (Liu i sar., 2013; Wang i sar., 2017). Isto tako, prisustvo pojedinih RNK srednje dužine, pre svega onih poreklom iz nukleusa, zavisi od vrste tkiva, odnosno stadijuma razvića (Streit i sar., 2020).

Dugačke nekodirajuće RNK učestvuju u genomskoj regulaciji, kao i u epigenetskoj kontroli, međutim, njihovo evolutivno poreklo, kao i funkcionalna specijalizacija nisu do kraja razjašnjene (slika 6). Kao što je već rečeno, ne učestvuju u kodiranju proteina, ali ih sa druge strane odlikuje velika biohemijska raznovrsnost, odakle i potiče raznolikost u funkciji (Gelaw i Sanan-Mishra, 2021). Na osnovu biogeneze i lokalizacije dugačke RNK podeljene su u više grupa. Dugačke intergenske RNK (200-2000 nt) potiču iz intergenskog regiona, poliadenilovane su, slabo splajsovane i pokazuju tkivno-specifičnu ekspresiju. Imaju transregulatornu ulogu, visoku stopu transporta i lokalizovane su najmanje 5 kb dalje od protein-kodirajućih regiona (Gelaw i Sanan-Mishra, 2021). Dugačke nekodirajuće RNK izvedene iz transpozona nekada se smatraju prekursorima miRNK i siRNK (Li i sar., 2014; Gelaw i Sanan-Mishra, 2021). Pokazano je da se uključene u odgovore biljaka na različite stresne uslove (Chen i sar., 2020b). Sledeću klasu dugačkih nekodirajućih čine RNK izvedene iz introna i mogu biti potpune ili delimične dugačke intronske RNK. Prirodni antisens transkripti potiču i od egzona i od introna i najrasprostranjenija su vrsta dugačkih

nekodirajućih RNK i utišavanjem regulišu ekspresiju gena (Lindsay i sar., 2013). Cirkularne dugačke nekodirajuće RNK su veoma visoko konzervativne u svojoj sekvenci, ali su i slabo zastupljene, ali zbog očuvane sekvence su veoma stabilne i teže podležu razgradnji u odnosu na linearne nekodirajuće RNK (Gelaw i Sanan-Mishra, 2021).

Dugačke nekodirajuće RNK imaju značajnu ulogu u regulaciji utišavanja gena, kontroli regulacije transkripcije, kao i u genomskom imprintingu. Ova regulacija je povezana sa brojnim biološkim procesima u biljci, kao što je organogeneza korenova, fotomorfogeneza, kontrola perioda cvetanja ili usvajanje nutrijenata (Gelaw i Sanan-Mishra, 2021). Nivo njihove ekspresije značajno se razlikuje između tkiva, kao i tokom stadijuma razvića. Qin i sar (2017) identifikovali su u Arabidopsisu dugačku nekodirajuću RNK – *DROUGHT INDUCED lncRNA (DRIR)* koja se smatra pozitivnim regulatorom odgovora biljaka na stres suše i stres soli. Pokazano je da učestvuje u regulaciji više transkripata, na primer uključenih u signalni put ABA, uključenih u metabolizam aneksina i akvaporina. Takođe, neke od dugačkih nekodirajućih RNK služe kao prekursori za sintezu siRNK, dok neke učestvuju u modeliranju hromatina (Ariel i sar., 2015). U suši većina dugačkih nekodirajućih RNK svoju funkciju ispoljava tako što učestvuje u sintezi i signalizaciji ABA i etilena, u signalizaciji kalcijuma, u sintezi skroba i saharoze, kao i u metabolizmu LEA proteina (Ding i sar., 2019; Gelaw i Sanan-Mishra, 2021; Chung i sar., 2016; Weidong i sar., 2020).

Studije su pokazale da postoji veoma složena interakcija dugačkih i malih nekodirajućih RNK molekula gde one formiraju veoma kompleksnu regulatornu mrežu i na taj način kontrolišu različite puteve koji se aktiviraju u suši. Svoju ulogu ispoljavaju na transkripcionom, posttranskripcionom i epigenetskom nivou (Gelaw i Sanan-Mishra, 2021).



Slika 6. Šematski prikaz uloge dugih nekodirajućih RNK kod biljaka u uslovima stresa. Preuzeto i prilagođeno iz Wang i sar., 2017.

2. Ciljevi istraživanja

Opšti naučni cilj ove doktorske disertacije jeste ispitivanje uticaja ponovljene blage suše i različitih inteziteta svetlosti na mehanizme tolerancije na sušu kod paradajza, kao i utvrđivanje uloge ABA u ovim procesima korišćenjem divljeg tipa Ailsa Craig i njegovog mutanta sa smanjenim sadržajem ABA – *flacca*. Polazna hipoteza je da se primenom ponavljanja ciklusa suše indukuju procesi koji bi mogli da doprinesu „sećanju” na stres koji su biljke prethodno iskusile i time doprinesu toleranciji na sušu. Uporedna analiza fizioloških i biohemijskih parametara u toku jednog i tri ciklusa suše kod ova dva genotipa imala je za cilj otkrivanje doprinosa različitih metaboličkih puteva razvoju aklimacionih mehanizama.

Glavni cilj u predloženoj doktorskoj disertaciji uključivao je sledeće podciljeve:

- Utvrđivanje nastalih morfoloških razlika preko površine listova i težine nadzemnog dela biljke.
- Proučavanje promena hemijskih (ABA, H⁺ jona, i drugih metabolita) i hidrauličkih (ukupni vodni potencijal) signala koji nastaju pri delovanju jednog ili više ciklusa suše i različitog svetlosnog režima.
- Proučavanje promena u provodljivosti stoma, koje nastaju usled interakcije između hemijskih i hidrauličkih signala, kao i interakcije koje se mogu ostvariti između hemijskih signala (ABA, askorbata i ugljenih hidrata) u toku primenjenih ciklusa suše.
- Utvrđivanje modifikovanih interakcija na molekularnom nivou u odgovoru na primenjene cikluse suše (male RNK, ekspesija gena, sinteza ABA, antioksidativna aktivnost, sinteza ugljenih hidrata, aminokiselina i karboksilnih kiselina).
- Ispitivanje uticaja produženog oporavka, odnosno rehidratacije nakon tri ciklusa suše na akumulaciju komponenti ćelijskog zida.

3. Materijal i metode

3.1. Biljni materijal

U ovom istraživanju korišćena su dva genotipa paradajza (*Lycopersicum esculentum* Mill.), divlji tip Ailsa Craig (WT) i mutant *flacca* sa redukovanim sadržajem apscisinske kiseline (Sagi i sar., 1999). Semena ovih genotipova dobijena su iz banke gena Genebank – IPK Gatersleben (Nemačka).

3.1.1. Postavka ogleda

Semena divljeg tipa i *flacca* mutanta naklijavana su u komercijalnom supstratu *Klasman Potgrond H* tokom proleća 2016. za prvi, odnosno 2017. godine za drugi deo eksperimentalnog istraživanja. Nakon naklijavanja biljke su prebačene u saksije dimenzija 10×10×13 cm koje su sadržale oko 400 g istog supstrata. Biljke su gajene u fitokomori u kontrolisanim uslovima pri intenzitetu svetlosti od 250 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, relativnoj vlažnosti vazduha (RH) od 50%, fotoperiodu 14/10 h i temperaturi 26/17 °C (dan/noć) na Katedri za agrohemiju i fiziologiju biljaka (Univerzitet u Beogradu – Poljoprivredni fakultet). Kada su se biljke razvile do faze četvrtog lista, prebačene su u saksije visine oko 24 cm, koje su sadržale oko 800g *Klasman Potgrond H* supstrata. Presađivanje biljaka moglo je da izazove pojavu stresa, pa je zbog toga narednih šest dana nastavljeno zalivanje zapreminom vode koja odgovara poljskom vodnom kapacitetu supstrata. Tokom čitavog perioda gajenja biljke su zalivane tako da je sadržaj vode u supstratu predstavljao 70% težinskih (odnosno 38% zapreminskih) od njegovog ukupnog poljskog vodnog kapaciteta. Biljke su izlagane tretmanima suše tek po isteku perioda koji je bio neophodan za njihov oporavak, odnosno nakon pojave šestog razvijenog lista.

3.2. Dizajn eksperimenta

Eksperimentalni sistemi koji su omogućavali praćenje efekata ponovljene suše i svetlosti različitog intenziteta, postavljeni su u dve varijante:

- jedan ciklus suše i rehidracija,
- tri ciklusa suše i rehidracija.

3.2.1. Eksperimentalni sistem sa jednim ciklusom suše i rehidracijom

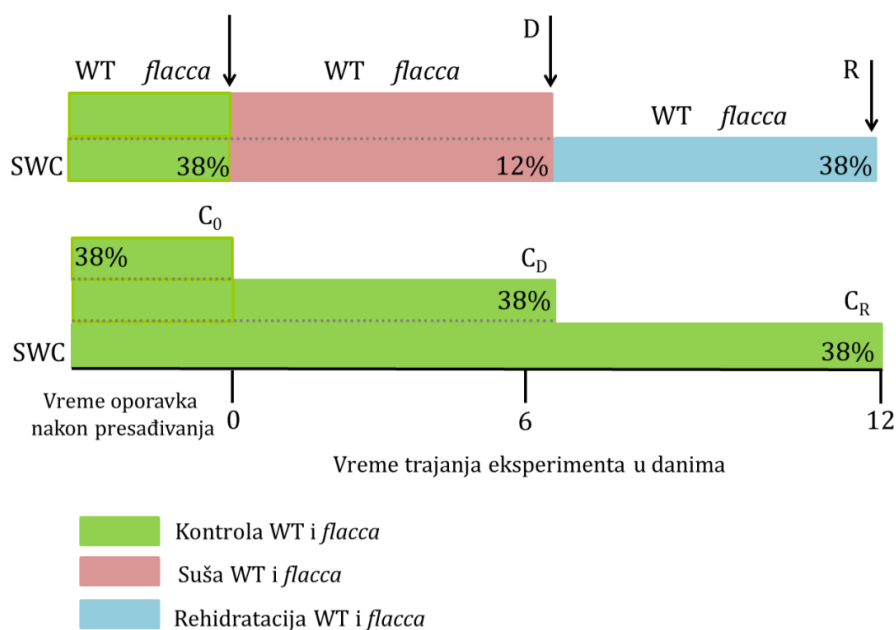
Efekti tretmana suše i rehidracije praćeni su preko promena morfoloških, fizioloških, biohemijskih i molekularnih parametara u listovima paradajza divljeg tipa (WT) i *flacca* mutanta u vegetativnoj fazi razvoja.

Na biljkama divljeg tipa paradajza (WT) i mutanta *flacca* sa razvijenim šestim listom, nakon presađivanja i faze oporavka, primenjeni su sledeći tretmani:

- suša (D),
- rehidracija (R),
- kontrola za vreme trajanja suše (C_D),

- kontrola za vreme trajanja suše i rehidracije (C_R).

Biljke su gajene u kontrolisanim uslovima pri intenzitetu svetlosti od $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, RH 50%, fotoperiodu 14/10 h i dnevno/noćnoj temperaturi od 26/17 °C. Kontrolne biljke zalivane su na dnevnom nivou, tako da je sadržaj vode u zemljištu iznosio $38 \pm 2\%$. Tretman suše izazvan je prekidanjem zalivanja u trajanju od šest dana, kada je sadržaj vode u zemljištu opao na $12 \pm 2\%$. Nakon perioda suše nastupio je tretman rehidracije, pri kome su biljke svakodnevno zalivane dok nije postignuta optimalna vlažnost zemljišta ($38 \pm 2\%$). Rehidracija biljaka trajala je šest dana (slike 7 i 8).



Slika 7. Šema postavke eksperimenta sa jednim ciklusom suše. Suša (D) je započeta u nultom danu (0) i trajala je šest dana. Nakon toga nastupio je period rehidracije (R) u trajanju od šest dana. Strelice označavaju vreme uzorkovanja biljnog materijala: 6. dana (D i odgovarajuća kontrola C_D) i 12. dana (R i odgovarajuća kontrola C_R). Volumetrijski sadržaj vode u zemljištu (SWC) bio je 38% kod kontrolnih (zeleno linija) i rehidratiranih biljaka (plava linija), dok je kod biljaka u suši iznosio 12% (ružičasta linija).



Slika 8. Izgled biljaka divljeg tipa paradajza (WT levo i desno na slici) i *flacca* mutanata (sredina slike) u toku eksperimenta.

Za fiziološke, morfološke, biohemijske i molekularne analize listovi WT i *flacca* mutanta uzorkovani su neposredno pre indukcije suše (početak eksperimenta), nakon šest dana suše i rehidratacije, koja je vremenski trajala koliko i suša. Paralelno sa biljkama na koje je delovao stres suše uzorkovane su i kontrolne, optimalno zalivane biljke u navedenim vremenskim intervalima.

Svaki tretman je urađen sa četiri biološka ponavljanja za oba genotipa, kao i sve analize, pri čemu je za meranja i prikupljanja uzoraka uvek korišćen četvrti potpuno razvijen list (posmatrano od vrha biljke). Biljni materijal je odmah po uzorkovanju zamrznut u tečnom azotu i do upotrebe odložen na -80 °C.

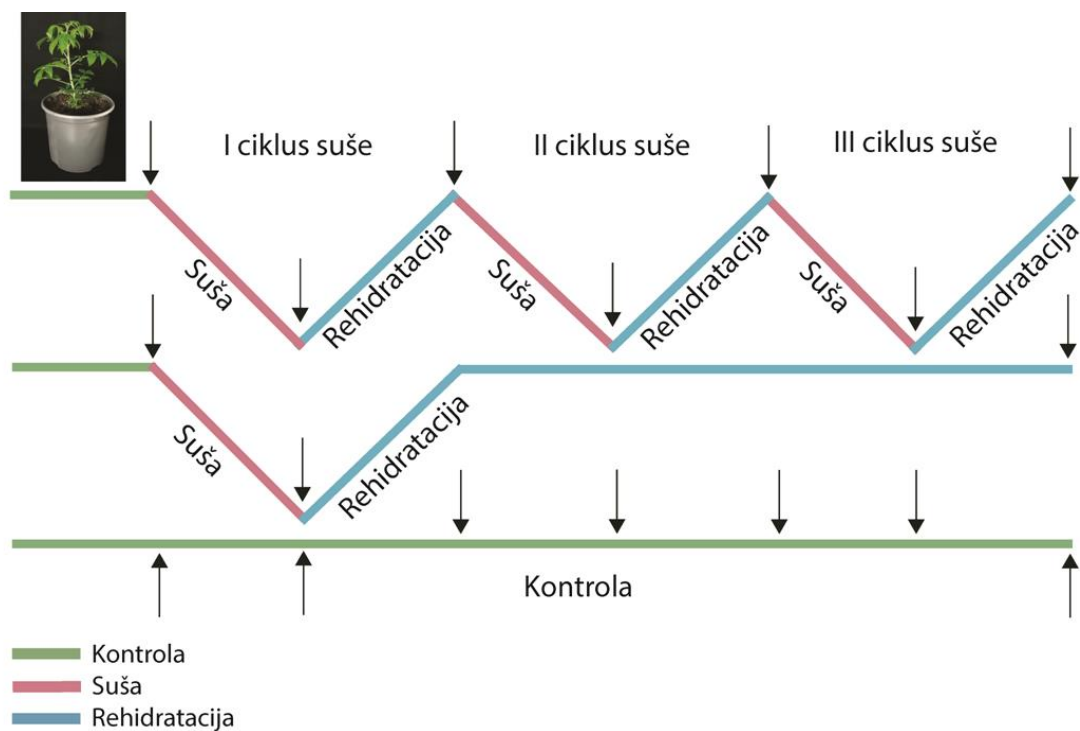
3.2.2. Eksperimentalni sistem sa tri ciklusa suše i rehidratacija

U ovom delu eksperimenta ciklus suše i rehidratacije ponovljen je tri puta.

Ova istaživanja urađena su u vegetativnoj fazi kod biljaka divljeg tipa paradajza (WT) i *flacca* mutanta. Između svake od tri ponovljenje suše urađena je rehidratacija, tako da su izdvojeni sledeći tretmani:

- prvi ciklus suše (I ciklus D),
- drugi ciklus suše (II ciklus D),
- treći ciklus suše (III ciklus D),
- kontrola za prvi ciklus suše (I ciklus C),
- kontrola za drugi ciklus suše (II ciklus C),
- kontrola za treći ciklus suše (III ciklus C),
- rehidratacija za prvi ciklus suše (I ciklus R),
- rehidratacija za drugi ciklus suše (II ciklus R),
- rehidratacija za treći ciklus suše (III ciklus R),
- rehidratacija nakon prvog ciklusa sa produženim trajanjem za vreme drugog i trećeg ciklusa suše (R1).

Nakon presađivanja, biljke su dalje gajene pri intenzitetu svetlosti od 800 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, dok su vrednosti vlažnosti vazduha, temperature i fotoperioda ostale nepromenjene. Svetlost ovog intenziteta postignuta je korišćenjem led lampi potpunog spektra (*Apollo 4, 140W*). Posle prilagođavanja novim uslovima u trajanju od šest dana, primenjeni su ciklusi suše i rehidratacije. Ciklusi su započinjali kada je sadržaj vode bio optimalne vrednosti $38 \pm 2\%$. Po završetku svakog ciklusa suše vlažnost vode u zemljištu iznosila je $11 \pm 2\%$, nakon čega su, tokom trajanja rehidratacije, biljke zalivane na dnevnoj bazi sve dok sadržaj vode u zemljištu nije dostigao optimalne vrednosti. Posle toga započet je novi ciklus suše. Takođe, biljke u kontrolnim uslovima od početka do kraja eksperimenta bile su snabdevene optimalnom količinom vode. Za dodatna istraživanja korišćene su biljke koje su nakon prvog ciklusa suše izlagane produženoj rehidrataciji (slike 9 i 10).



Slika 9. Šema postavke eksperimenta sa tri ciklusa suše. WT i *flacca* biljke paradajza bile su izložene ponavljajućim ciklusima suše (ružičaste linije) praćenim periodom oporavka, tj. rehidracije (plave linije). U isto vreme, set biljaka bio je podvrgnut samo jednoj sušnoj epizodi (ružičasta linija), a zatim do kraja eksperimenta optimalno zalivan (plava linija). Kontrolne biljke bile su optimalno zalivane tokom čitavog eksperimenta (zelena linija).



Slika 10. Biljke paradajza (*Lycopersicon esculentum* Mill.) u fitokomori pri intenzitetu svetlosti od $800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. U levom delu slike nalaze se biljke *flacca* mutanta, dok su u desnom WT biljke.

U određenim tačkama za date tretmane praćene su i određivanje morfološke, fiziološke, biohemijske i molekularne karakteristike na četvrtom potpuno razvijenom listu (posmatrano od vrha). Sva merenja urađena su sa četiri biološka ponavljanja. Biljni materijal je nakon uzorkovanja zamrzavan u tećnom azotu, a zatim odložen na -80 °C do daljeg korišćenja.

3.3. Merenje morfoloških i fizioloških parametara kod biljaka

Volumetrijski sadržaj vode u supstratu (SWC, eng. *soil water content*) meren je svakodnevno u jutarnjim časovima upotrebom Theta Probe (*Type ML2x, Delta-T Devices Ltd, Cambridge, UK*) (slika 11a).

Provodljivost stoma merena je 30 minuta nakon zalivanja biljaka na mladim, potpuno formiranim listovima pomoću porometra (*AP4 Leaf Porometer, Delta-T Device, Ltd, UK*). Provodljivost je merena na osnovu utvrđivanja difuzne provodljivosti za vodenu paru koja se oslobađa kroz stomin otvor tokom procesa transpiracije, tj. utvrđivano je vreme potrebno za postizanje ravnotežnog stanja između komore zakaćene za list i senzora za vlažnost na aparatu. Vrednosti za provodljivost stoma direktno su se oćitavale sa uređaja i izražavale u $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (slika 11b).

U cilju provere stepena suše, ukupni vodni potencijal (ψ) listova meren je pomoću komore pod pritiskom (*Soil Moisture Equipment Corp., Santa Barbara, CA, USA*) po metodi koju su opisali Scholander i sar. (1965). Ovo je destruktivna metoda koja se zasniva na istiskivanju ksilemskog soka iz listova biljaka pod pritiskom gasa azota. Ukupni vodni potencijal listova je negativna vrednost izražena u MPa. Pri merenju ψ predstavlja pritisak u komori koji je doveo do pojave prvih kapi ksilemskog soka na presećenoj površini lisne drške (slika 11c).

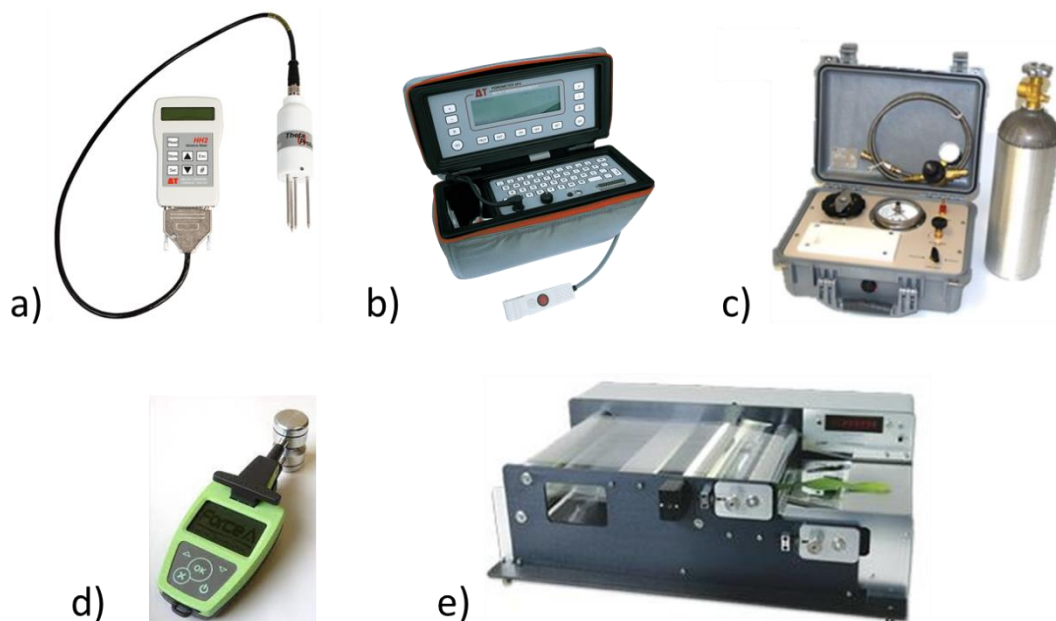
Takođe, odmah po određivanju ukupnog vodnog potencijala primenjen je povećani pritisak za prikupljanje ksilemskog soka u kome je kasnije, pomoću pH mikroelektrode, odrećena pH vrednost.

Sadržaj hlorofila, epidermalnih flavonoida, sadržaj antocijana i azotni indeks u listovima mereni su *in vivo* Dualex Scientific senzorom (*FORCE-A, Orsay, France*). Sadržaj hlorofila u listu odrećuje se na osnovu razlike njegove transmisije na 650 nm (vidljivi deo spektra) i 710 nm (blisko infracrveno područje) i izražava se u $\mu\text{g cm}^{-2}$, dok se epidermalni sadržaj flavonoida odrećuje upoređivanjem vrednosti apsorbanci na 375 nm (UV-A) i 650 nm (vidljivi deo spektra). Azotni indeks (NBI, eng. *nitrogen balance index*) direktno se računa iz odnosa sadržaja hlorofila i epidermalnih flavonoida (Cerović i sar., 2012) (slika 11d).

Radi praćenja uticaja suše na rastenje i razviće biljaka, u određenim vremenskim intervalima tokom eksperimenta uzorkovane su biljke za merenje lisne površine, kao i sveže i suve mase. Ukupna lisna površina (LA, eng. *leaf area*) merena je pomoću uređaja LI-3100 areameter (*LI-COR, Lincoln, NE, USA*) i izražavana je u cm^2 (slika 11e).

Sveža masa merena je na tehnićkoj vagi i izražavana u gramima (g). Suva masa dobijena je sušenjem biljaka, prvo na sobnoj temperaturi sedam dana, a zatim u sušnici 72h na 80 °C. Nakon sušenja masa biljnog materijala odrećena je merenjem na analitićkog vagi i izražena u gramima.

Specifićna lisna površina (SLA, eng. *specific leaf area*) izračunata je prema formuli: $\text{SLA} = A1/W1$, gde je: A1 – površina lista (cm^2), W1 – suva masa lista (g) (Hunt, 1982).



Slika 11. Prikaz uređaja korištenih za merenja tokom eksperimenta: a) *Theta Probe*, b) *AP4 Leaf Porometer*, c) *Soil Moisture Equipment Corp*, d) *Dualex FORCE-A*, e) *LI-3100 area meter*.

3.4. Merenje biohemijskih parametara

3.4.1. Određivanje sadržaja abscisinske kiseline (ABA) u listovima paradajza

Listovi paradajza divljeg tipa (WT) i *flacca* mutanta homogenizovani su u tečnom azotu i ekstrahovani u dejonizovanoj vodi (1/10, w/v) u prisustvu 1% PVP. Da bi se izbegla nespecifična reakcija antitela za apscisinsku kiselinu sa drugim jedinjenjima u uzorku, homogenat je kratko zagrevan u ključalom vodenom kupatilu (do pojave mehurića), a zatim je inkubacija nastavljena na šejkeru preko noći, u mraku na 4 °C. Homogenat je centrifugiran 15 min na 14.000 g na 4 °C, a dobijeni supernatant je razblažen sedam puta dejonizovanom vodom i sačuvan na -20 °C do dalje upotrebe.

Sadržaj apscisinske kiseline u listovima paradajza određen je ELISA (eng. *enzyme-linked immunosorbent assay*) testom prema protokolu objavljenom od strane Asch (2000). Princip ove imunohemijske metode zasniva se na kompetitivnoj reakciji između ABA i visoko specifičnog monoklonalnog antitela MAC252 (Quarrie i sar., 1988), pri kojoj ne dolazi do ukrštene reakcije antitela sa drugim komponentama u uzorku.

Za pripremu standarda apscisinske kiseline korišćen je štok rastvor (\pm) ABA koncentracije 0,04 mg/ml. Ovaj rastvor se priprema rastvaranjem (\pm) ABA u dejonizovanoj vodi, uz inkubaciju na 40 °C tokom 12 sati u mraku, na šejkeru. Od njega je napravljen rastvor koncentracije 80.000 pg (\pm) ABA/100 μ l koji je predstavljao negativnu kontrolu. Za standardnu pravu napravljena su serijska razblaženja u koncentraciji 8.000, 4.000, 2.000, 1.000, 500, 250 i 125 pg (\pm) ABA/100 μ l. Radni rastvor, kao i serijska razblaženja, čuvani su na -20 °C. Za pozitivnu kontrolu korišćena je dejonizovana voda, koja je imala najveći intenzitet obojenja.

Postupak određivanja ABA primenom ELISA testa:

1. Oblaganje bunarića mikrotitar ploča sa po 200 μ l ABA-4'-BSA-konjugata i inkubacija preko noći na 4 °C.
2. Ispiranje bunarića mikrotitar ploča tri puta puferom za ispiranje (50 mM Tris-HCl, pH 7,8 koji je sadržao 1 mM MgCl₂, 150 mM NaCl, 10% BSA i 5% Tween20). Nakon prva dva ispiranja bunarići su sušeni upijajućim papirom. Nakon trećeg ispiranja pufer je ostavljen u bunarićima mikrotitar ploče, koja je zatim inkubirana 20 minuta na 37 °C.
3. Ispiranje i sušenje bunarića mikrotitar ploča.
4. Nanošenje standarda i uzoraka u bunariće izvršeno je u triplicatu (po 100 μ l). Nakon toga je u svaki bunarić dodata ista zapremina primarnog antitela MAC252 (prethodno pripremljenog rastvaranjem 4 ml MAC252 koncentracije 1:8.000 u 8 ml PBS pufera) i sadržaj u pločama se inkubirao 3h na +4 °C (vreme neophodno za vezivanje antigena i antitela).
5. Ispiranje bunarića puferom za ispiranje tri puta i sušenje upijajućim papirom.
6. U svaki bunarić dodato je po 200 μ l sekundarnog antitela Anti-rat IgG rastvorenog u puferu (50 mM Tris-HCl, pH 7,8 koji je sadržao 1 mM MgCl₂, 150 mM NaCl). Inkubacija u trajanju od 60 minuta na 37 °C, tokom koje dolazi do vezivanja sekundarnog antitela za primarno antitelo.
7. Ispiranje bunarića mikrotitar ploče od sekundarnog antitela puferom za ispiranje pet puta i sušenje na upijajućem papiru.
8. U svaki bunarić dodato je po 200 μ l supstrata (tableta od 20 mg *p*-nitrofenil fosfata rastvorena u 21ml 50 mM NaHCO₃).
9. Inkubacija mikrotitar ploča na 37 °C tokom 15–30 minuta, sve dok vrednosti apsorbance merene na 405 nm za pozitivnu kontrolu nisu bile približno 1.
10. Očitavanje apsorbance uzoraka na 405 nm pomoću ELISA čitača (*Sunrise, Tecan, Switzerland*). Na osnovu standardne prave izračunata je koncentracija ABA u uzorku i dobijene vrednosti su predstavljene u vidu ng ABA po g sveže mase uzorka.

3.4.2. Ekstrakcija i kvantifikacija rastvornih ugljenih hidrata u listovima paradajza

Biljni materijal homogenizovan je u tečnom azotu i ekstrahovan u dejonizovanoj vodi (1:10, w:v) u ultrazvučnom kupatilu tokom 30 min na sobnoj temperaturi. Potom su uzorci centrifugirani 10 min na 14.000g na 4 °C. Dobijeni supernatant je sačuvan, a zatim je talog re-ekstrahovan pomoću metanola na isti način kao što je urađena ekstrakcija sa vodom. Dobijeni supernatanti su spojeni i korišćeni za dalju analizu (Vidović i sar. 2015b).

Identifikacija i kvantifikacija rastvornih ugljenih hidrata u listovima paradajza urađena je na sistemu za visoko efikasnu jonoizmenjivačku hromatografiju HPLC *DIONEX ICS 3000* (*Dionex, Sunnyvale, USA*) sa kvaternernom gradijentnom pumpom. Kolona korišćena u ovoj analizi bila je *CarboPac PA100* hidroksidselektivna anjon-izmenjivačka kolona dimenzija 250 \times 4 mm (*Dionex, Sunnyvale, USA*).

Elucija je postignuta sa tri mobilne faze: A: 600 mM NaOH, B: 500 mM Na-acetat i C: ultra čista voda, pri brzini protoka od 0,7 ml min⁻¹ na 30 °C. Gradijentni program sastojao se iz sledećih koraka: 0–5 min: A = 15%, C = 85% (izokratska elucija); 5,0–5,1 min: A =15%, B = 2%, C =83% (izokratska elucija); 5,1–12,0 min: A = 15%, B = 2%, C = 83% (izokratska elucija); 12,0–12,1 min: A = 15%, B = 4%, C = 81 % (izokratska elucija); 12,1–20,0 min: A = 15%, B = 4%, C= 81% (izokratska elucija); 20,0–20,1min: A = 20%, B = 20%, C = 60% (izokratska elucija); 20,1–30,0 min: A = 20%, B = 20%, C = 60% (izokratska elucija). Detekcija je vršena

pomoću elektrohemijskog detektora koji je za radnu imao zlatnu, a za referentnu Ag/AgCl elektrodu (Akšić i sar., 2019).

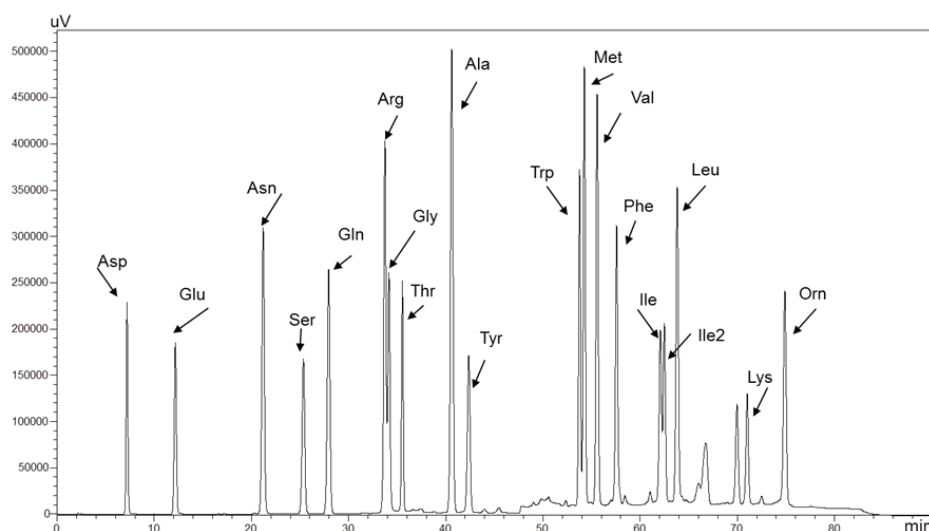
Standardi za glukozu, fruktozu i saharozu pripremljeni su u *Ultrapure TKA* vodi u koncentraciji 1.000 ng ml^{-1} , dok su standardi za ostale ugljene hidrate pripremljeni na isti način, ali u koncentraciji 100 ng ml^{-1} .

3.4.3. Ekstrakcija i analiza slobodnih aminokiselina u listovima paradajza

Prethodno zamrznuta tkiva listova paradajza homogenizovana su u avanu pomoću tučka u tečnom azotu, a zatim ekstrahovana u 50% MeOH (1:10, w:v). Homogenat je centrifugiran 10 min na 14.000 g na $4 \text{ }^\circ\text{C}$ i dobijeni supernatant je odmah zamrznut u tečnom azotu i sačuvan na $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ za dalju analizu. Alikvoti dobijeni iz supernatanta razblaženi su 10 puta i pomešani sa istom zapreminom derivatizacionog reagensa, nakon 5 min naneti na reverzno-faznu kolonu ($5,0 \text{ } \mu\text{m}$, $250 \times 4,6 \text{ mm}$ Luna C18(2), *Phenomenex Ltd., Torrance, CA, USA*) i analizirani na Shimadzu LC-20AB Prominence HPLC (*Shimadzu, Kjoto, Japan*) uređaju. Derivatizacioni reagens sastojao se od 20 mM natrijum-boratnog pufera pH 9,5, 0,4M *o*-ftalaldehida (*OPA, Sigma Aldrich*) i β -merkaptetanola (9:1:0,01, v:v:v). Natrijum-boradni pufer pripremljen je pomoću borne kiseline i natrijum-hidroksida, dok je OPA pripremljena rastvaranjem u MeOH. Derivatizacija standarda urađena je na isti način kao i derivatizacija uzorka.

Elucija je postignuta pomoću sledećih eluenata: A: 20 mM natrijum-fosfatni pufer pH 6,8 : metanol : tetrahidrofuran (90:9:1, v:v:v) i B: 20 mM natrijum-fosfatni pufer pH 6,8 : metanol : tetrahidrofuran (40:59:1, v:v:v) pri protoku od $1,2 \text{ ml min}^{-1}$ na $40 \text{ }^\circ\text{C}$. Da bi se postiglo razdvajanje proteinogenih aminokiselina (osim prolina, cisteina i histidina), primenjen je sledeći elucioni gradijent: 0–5 min: A=100%, B=0% (izokratska elucija); 5–30 min: A = 70%, B = 30% (izokratska elucija); 30–35 min: 30–60% B (linearni gradijent); 35–45 min: A = 50%, B = 50% (izokratska elucija); 45–70 min: 50–70% B (linearni gradijent); 70–90 min: A=0%, B = 100% (izokratska elucija). Injekciona zapremina bila je $20 \text{ } \mu\text{l}$, a intenzitet fluorescencije derivata meren je na 510 nm , nakon ekscitacije na 340 nm pomoću fluorescentnog detektora RF-10-AXL (*Prominence, Shimadzu*) (Noctor i Foyer, 1998b). Dobijeni hromatogrami obrađeni su u programu Shimadzu LC Solution software (*Shimadzu*).

Primer hromatograma za standarde aminokiselina sa odgovarajućim retencionim vremenima koji su korišćeni u ovoj metodi prikazan je na slici 12.



Slika 12. Hromatogram sa standardima aminokiselina

3.4.4. Ekstrakcija i spektrofotometrijsko određivanje koncentracije prolina u listovima paradajza

Usled toga što opisani metod derivatizacije za određivanje sadržaja aminokiselina nije primenljiv za detekciju prolina, njegova koncentracija u uzorcima određena je spektrofotometrijski, po metodi koju su opisali Bates i sar. (1973) i uz određene modifikacije. Koncentracija prolina određena je pomoću ninhidrinske reakcije, u kojoj pri reakciji imino grupe iz prolina sa ninhidrinom (eng. *2,2-dihydroxyindane-1,3-dione*) dolazi do formiranja žutog obojenog proizvoda (α -aminokiseline u reakciji sa ninhidrinom daju ljubičasti proizvod). Intenzitet obojenja proizvoda proporcionalan je koncentraciji prolina u uzorku.

Zaleđeno lisno tkivo homogenizovano je u tečnom azotu, ekstrahovano u 3% sulfosalicilnoj kiselini (1:10, w:v), a zatim centrifugirano 10 min na 14.000 g na 4 °C. Dobijeni supernatant pomešan je u istom zapreminskom odnosu sa kiselim ninhidrinom i glacijalnom sirćetnom kiselinom (1:1:1, v:v:v) i inkubiran 60 min na 100 °C. Reakcija je zaustavljena prebacivanjem uzoraka na led i dodavanjem toluena (1:1, v:v).

Kiseli ninhidrin pripremljen je rastvaranjem 1,25 g ninhidrina u 30 ml glacijalne sirćetne kiseline i 20 ml 6M fosforne kiseline, uz zagrevanje i mešanje do rastvaranja. Ovaj rastvor stabilan je 24 h na 4 °C.

Za detekciju prolina korišćena je gornja organska faza koja je sadržala žutu hromoforu, u kojoj je koncentracija prolina izračunata na osnovu standardne prave merenjem apsorbance na 520 nm na UV-VIS spektrofotometru (*Shimadzu UV-160, Kjoto, Japan*). Kao blank korišćen je čist toluen, dok je za standard korišćen rastvor D-prolina.

3.4.5. Ekstrakcija i kvantifikacija sadržaja fenolnih jedinjenja u listovima paradajza

Određivanje fenolnih jedinjenja u listovima paradajza urađeno je po protokolu opisanom u Vidović i sar. (2015a). Zaleđena tkiva listova paradajza sprášena su u avanu sa tučkom u tečnom azotu i ekstrahovana u metanolu sa 0,1% HCl (1:10, w:v). Ekstrakcija je trajala 60 min na šejkeru na ledu i u mraku, a nakon toga homogenat je centrifugiran 10 min na 14.000 g na 4 °C. Dobijeni supernatant je odvojen i korišćen za dalju analizu. 600 μ l supernatanta pomešano je sa 400 μ l dejonizovane vode i 600 μ l hloroforma, a zatim inkubirano na šejkeru u mraku i na ledu. Ovaj korak se primenjuje kako bi se odstranila lipofilna jedinjenja koja mogu da ometaju identifikaciju i kvantifikaciju fenolnih jedinjenja. Nakon 60 min homogenat je centrifugiran 10 min na 14.000 g na 4 °C i u 400 μ l dobijenog supernatanta dodato je 80 μ l koncentrovalne HCl kako bi se izvršila hidroliza radi detekcije aglikona (60 min na 85 °C). Iz dobijenih ekstrakata kiseonik je uklonjen barbotiranjem azotom, a nakon toga je fenolni sadržaj analiziran pomoću UPLC hromatografa (*Thermo Dionex Ultimate 3000*) kuplovanog sa fotodiodnim detektorom. Fenolna jedinjenja razdvajana su na reverzno-faznoj koloni (5,0 μ m, 250 \times 4,6 mm Luna C18(2), *Phenomenex Ltd., Torrance, CA, USA*). Elucioni gradijent postignut je pomoću sledećih mobilnih faza: A: acetonitril i rastvora B: sirćetna kiselina : acetonitril : fosfatna kiselina : voda (10:5:0,1:84,9,v:v:v), pri brzini protoka od 1 mL min⁻¹ na 25 °C. Gradijentni program sastojao se iz sledećih koraka: 0–5 min: B=100%, A=0% (izokratska elucija); 5–25 min: 100–80% B (linearni gradijent); 25–35 min: 80–60% B (linearni gradijent) i 35–40 min: 60–100% B (linearni gradijent). Hromatogrami su snimani na različitim talasnim dužinama: 280 nm za katehine, hidroksibenzojeve kiseline i njihove derivate; 320 nm za flavone, hidroksicimetne kiseline i njihove derivate; 360 nm za flavon-3-ole i 520 nm za antocijane. Pojedinačna fenolna

jedinjenja određivana su komparacijom retencionih vremena i njihovih apsorpcionih spektara sa autentičnim standardima. Kvantifikacija je bazirana na površini dobijenih pikova pomoću *Chromeleon 6.8* softvera.

3.4.6. Ekstrakcija i kvantifikacija ukupnog sadržaja askorbata u listovima paradajza i određivanje njegovog redoks statusa

Smrznuta tkiva listova paradajza homogenizovana su u avanu sa tučkom u tečnom azotu i ekstrahovana u 1,5% *meta*-fosfornoj kiselini (MPA), koja je sadržala 1 mM EDTA (1:10, w:v). Homogenat je centrifugiran 8 min na 14.000 g na 4 °C i dobijeni supernatant je odmah zamrznut u tečnom azotu i sačuvan na -80 °C za dalju analizu.

Redukovana forma askorbata urađena je po metodi koju su opisali Morina i sar. (2010). Reakciona smeša sastojala se od 950 µl 300 mM natrijum-fosfatnog pufera pH 5,5 sa 1 mM EDTA i 50 µl uzorka. Prilikom dodavanja jedne jedinice (IU) askorbat oksidaze (AO) u reakcionu smešu dolazilo je do smanjenja apsorbanca na 262 nm, što predstavlja količinu redukovanog askorbata ($\epsilon=14,3 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

Određivanje ukupnog sadržaja askorbata urađeno je po metodi opisanoj u Vidović i sar. (2015a) uz određene modifikacije. Svi uzorci su razbleženi osam puta sa 1,5% MPA i inkubirani 1 minut na sobnoj temperaturi sa 2,5 IU AO u natrijum-fosfatnom puferu pH 4,5 da bi se izvršila potpuna oksidacija askorbata do dehidroaskorbata (DHA). Nakon toga, pH vrednost reakcione smeše podešena je na 8 pomoću 1M KOH, a zatim je urađena derivatizacija DHA u trajanju od 10 min u mraku dodavanjem *orto*-fenilendiamina (*o*-PDA) u finalnoj koncentraciji 0,2 mM. Reakcija je zaustavljena dodavanjem 85% H₃PO₄ u finalnoj koncentraciji 1,65%. Ovako pripremljeni derivati (50 µl) naneti su na reverzno-faznu kolonu (5,0 µm, 250×4,6 mm *Luna C18(2)*, *Phenomenex Ltd., Torrance, CA, USA*) i analizirani na *Shimadzu LC-20AB Prominence HPLC (Shimadzu, Kjoto, Japan)* uređaju. Elucioni gradijent je formiran pomoću rastvora A: 20 mM kalijum-fosfatni pufer pH 6,8 i rastvora B: metanol, pri brzini protoka od 0,8 ml min⁻¹ na 25 °C: 0–6 min: 30% B (izokratska elucija) i 6,01–15 min, 55–30% B (linearni gradijent). Intenzitet fluorescencije *o*-PDA-DHA derivata meren je na 430 nm, nakon ekscitacije na 360 nm pomoću fluorescentnog detektora.

Količina DHA određena je kao razlika količine ukupnog askorbata izmerenog pomoću HPLC i redukovanog izmerenog spektrofotometrijski. Redoks stanje askorbata predstavljeno je kao procenat sadržaja redukovanog u odnosu na sadržaj totalnog askorbata.

3.4.7. Ekstrakcija i kvantifikacija sadržaja karboksilnih kiselina u listovima paradajza

Jedan deo uzorka dobijen pri ekstrakciji askorbata u 1,5% *meta*-fosfornoj kiselini (MPA), koja je sadržala 1 mM EDTA (1:10, w:v), odvojen je, sačuvan na -80 °C i kasnije korišćen za analizu karboksilnih kiselina.

Analiza karboksilnih kiselina urađena je pomoću tečne hromatografije visokih performansi na *Shimadzu LC-20AB Prominence HPLC (Shimadzu, Kjoto, Japan)* uređaju spregnutom sa fotodiodnim detektorom (*LC-20AB, Shimadzu, Kyoto, Japan*). Za razdvajanje je korišćena jon-ekskluziona *Rezex ROAH+ (8%)* kolona (8 µm, 300×7,8 mm, *Phenomenex Ltd., Torrance, CA, USA*), a elucioni gradijent postignut je pomoću mobilnih faza A (5 mM H₂SO₄) i B (acetonitril), pri brzini protoka od 0,2 ml min⁻¹ u prvih 45 min i 0,5 ml min⁻¹ od 45 do

60 min, na 25 °C prema metodi koju su opisali Lin i sar. (2011). Karboksilne kiseline detektovane su na 210 nm.

3.5. Molekularno biološke metode

3.5.1. Izolacija ukupne RNK

Za ekstrakciju RNK molekula korišćeno je 0,1 g biljnog materijala samlevenog u avanu korišćenjem tečnog azota, uz dodatak 800 µl TRIzol reagensa (TRIzol™ Reagent, *Invitrogene, Waltham, MA, USA*). Homogenat je kratko promešan na vorteksu, a zatim centrifugiran 5 min na 14.000 g na 4 °C. Dobijeni supernatant prebačen je u novu mikrotubu, a zatim je u njega dodato 160 µl hloroforma, blago promućkano i inkubirano 5 min na ledu. Homogenat je centrifugiran 15 min na 14.000 g na 4 °C. Odvojena je gornja vodena faza i u nju je dodato 400 µl izopropanola, sadržaj mikrotubica je inkubiran 10 min na sobnoj temperaturi, a zatim centrifugiran 10 min na 14.000 g na 4 °C. Supernatant je odbačen, a dobijeni RNK beli talog osušen. Suvi talog je zatim resuspendovan u 800 µl 75% etanola.

Integritet izolovane RNK proveren je spektrofotometrijski pomoću nanodropa (*NanoPhotometer® N60, IMPLEN, Munich, Germany*) i elektroforezom na agaroznom gelu.

Elektroforeza RNK urađena je na aparatu za horizontalnu elektroforezu (*SERVA, Electrophoresis GmbH, Gemany*), pri naponu od 90 V i jačini struje od 50 mA, a vizualizacija RNK traka urađena je posmatranjem pod UV svetlom na transiluminatoru (*Quantum-ST4, Vilber Lourmat, France*).

Kvalitet izolovane RNK određen je na nanodropu (*NanoPhotometer® N60, IMPLEN, Munich, Germany*) merenjem apsorbance na 230, 260 i 280 nm. Vrednosti količnika A260/A280 ukazuju na kontaminaciju uzorka proteinima, dok količnik A260/A230 ukazuje na kontaminaciju organskim hemikalijama. Za potrebna merenja na merno polje nanodropa nanet je 1 µl RNK izolata.

Gel za agaroznu elektroforezu pripremljen je u 1× TBE (tris-boratni pufer, 54g Tris, 27,5 g H₃BO₃ i 2,92 g EDTA) puferu pH 8,3 u koncentraciji agaroze od 1,5%. Uzorci RNK za nanošenje u bunariće agaroznog gela pripremljeni su tako što su razblaženi četiri puta vodom oslobođenom od ribonukleaza (eng. *RNA-free water*), a zatim je u njih dodata boja 6× *Loading Dye (Thermo Fisher)*. Finalna zapremina po uzorku iznosila je 10µl. Elektroforeza se odvijala pri naponu od 90 V i jačini struje 50 mA, a detekcija traka rađena je bojenjem sa etidijum-bromidom na UV svetlu (*Quantum-ST4, Vilber Lourmat, France*).

Da bi se ukonila eventualna DNK kontaminacija, dobijena RNK je tretirana sa DNAazom I (*Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA*) 10 min na 37 °C prema protokolu proizvođača.

3.5.2. Sinteza komplementarne DNK (cDNK) i primena Real Time –PCR

Prvi lanac komplementarne DNK (cDNK) sintetisan je reverznom transkripcijom 1 µg ukupne RNK pomoću RevertAid First strand cDNA Synthesis Kit-a (*Thermo Scientific™, Waltham, MA, USA*).

Ekspresija gena od interesa (*NCED1* i *PP2C*) praćena je pomoću Real Time-PCR sistema 7500 (*Applied Biosystems, USA*) uz upotrebu SYBR Green Master Mix kita. Reakciona smeša u

zapremeni od 10 μ l sadržala je 1 μ l produkta reverzne transkripcije, odgovarajuće *forward* i *reverse* prajmere i Maxima SYBR Green/Rox qPCR Master Mix (*Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA*). Termalni uslovi za Real-Time-PCR podrazumevali su: inicijalnu denaturaciju na 95 °C, zatim 40 ciklusa u trajanju od po 30 s na 95 °C, vezivanje prajmera (eng. *annealing*) na temperaturi od 55 °C, 30 s i ekstenziju na 72 °C, 30 s. Odsustvo formiranja primer-dimer provereno je kontrolama koje nisu sadržale templat, već vodu oslobođenu od RNAza. U reakciji amplifikacije, tačka u ciklusu u kojoj se DNK amplifikovala u tolikoj meri da je njena fluorescencija dostigla fiksni prag iznad pozadinske fluorescencije označava se kao Ct vrednost. Nivo ekspresije analiziranih gena normalizovan je na hauskeeping gen (eng. *housekeeping gene*) aktin i izračunat u odnosu na WT start kontrolu korišćenjem $\Delta\Delta C_t$ metode (Livak i Schmittgen, 2001). Rezultati su predstavljeni kao log₂ relativne ekspresije gena, a sva merenja rađena su u triplicatu. U tabeli 1 prikazani su nazivi gena koji su analizirani, kao i sekvence koje su se koristile u njihovoj ekspresiji.

Tabela 1. Sekvence prajmera za housekeeping gen i analizirane gene

Gen	Prajmer	Dužina amplikona (bp)	T _m °C
<i>Aktin</i>	F 5'GTCCTCTTCCAGCCATCCAT3'	126	55
	R 3'ACCACTGAGCACAATGTTACCG5'		
<i>NCED1</i>	F 5'AGGCAACAGTGAAACTTCCATCAAG3'	163	55
	R 3'TCCATTAAGAGGATATTACCGGGGAC5'		
<i>PP2C</i>	F 5'TCAAACCTCCACAGTGCGATG3'	84	55
	R 3'CCGCAATTGGAAACGATG5'		

3.5.3. Izolacija i detekcija nekodirajućih malih RNK molekula

Izolacija nekodirajućih RNK (nkRNK, eng. *noncoding RNAs*) urađena je po modifikovanom protokolu koji su opisali Rosas-Cárdenas i sar. (2011). Oko 0,1 g tkiva listova paradajza spraseno je u avanu sa tučkom u tečnom azotu i ekstrahovano u 500 μ l LiCl ekstrakcionog pufera (100 mM Tris-HCl, pH 9,0, 1% SDS, 100 mM LiCl, 10 mM EDTA) i 500 μ l fenola. Homogenat je inkubiran 5 min na 60 °C, a zatim centrifugiran 10 min na 10.000 g na 4 °C. Dobijeni supernatant prebačen je u novu mikrotubu i u nju je dodato 600 μ l smeše hloroform-izoamilalkohola (24:1, v/v). Reakciona smeša centrifugirana je 10 min 10.000 g na 4 °C. Gornja faza pažljivo je prebačena u novu mikrotubu i inkubirana 15 min na 65 °C. Nakon isteka pomenutog vremena u svaku mikrotubu dodato je 50 μ l 5M NaCl i 63 μ l 40% rastvora polietilglikola (PEG), sadržaj je kratko vorteksovan, a zatim inkubiran na ledu narednih 30 min. Homogenat je potom centrifugiran 10 min na 14.000 g na 4 °C. Dobijeni supernatant koji sadrži nkRNK prebačen je u novu mikrotubu, u koju je dodato 500 μ l reakcionog miksa koji je sadržao fenol, etanol i izoamil alkohol (23:24:1, v:v:v), promešan, a zatim centrifugiran na 10 min na 14.000 g na 4 °C. Dobijeni supernatant prebačen je u novu mikrotubu, a u cilju taloženja nkRNK dodato je 50 μ l Na-acetatnog pufera pH 5,2 i 1200 μ l apsolutnog etanola. Sadržaj je inkubiran preko noći na -20 °C. Nakon toga homogenat je centrifugiran 10 min na 14.000 g na 4 °C. Dobijeni supernatant je odbačen, a talog je osušen. Osušeni talog je zatim pažljivo resuspendovan u 20 μ l vode oslobođene od ribonukleaza.

Posuđe (avani, tučkovi i mikrotube) i nastavci koji su korišćeni tokom ove procedure bili su sterilni.

Nakon toga pristupilo se spektrofotometrijskom određivanju čistoće (kvaliteta) i koncentracije izolovane RNK. Kvalitet izolovane RNK ustanovljen je na nanodropu (*NanoPhotometer® N60, IMPLLEN, Munich, Germany*) merenjem apsorbance na 230, 260 i

280 nm. Za potrebe ovih merenja na površinu za merenje nanošeno je po 1 μ l RNK za svaki uzorak.

Da bi se ispitala zastupljenost pojedinih nkRNK u uzorcima, urađeno je njihovo razdvajanje vertikalnom elektroforezom. Za razdvajanje je korišćen 12,5% poliakrilamidni gel. Poliakrilamidni gel za razdvajanje pripremljen je rastvaranjem 11,875 g AA, 0,625 g bisAA i 42,042 uree u 100 ml 1 \times TBE pufera pH 8,3 (tris-boratni pufer). TBE napravljen je od 54g Tris, 27,5 g borne kiseline i 2,92 g EDTA. Pre nanošenja uzoraka gel je ekvilibrisan 1 \times TBE puferom u trajanju od 2h, pri fiksnoj jačini struje 20 mA i voltaži od 158 V. Uzorci su pripremljeni u zapremini koja odgovara koncentraciji od 2 μ g/ μ l, a zatim je dodata boja u zapremini 6,25 μ l. Finalna zapremina nanetog uzorka u bunarić gela iznosila je 25 μ l. Tako pripremljen uzorak inkubiran je 5 min na 65 °C, a zatim prebačen na led i nanet na gel. Uslovi elektroforeze na početku bili su: napon 95V, odnosno fiksna jačina struje 20 mA, dok je na kraju elektroforeze vrednost napona iznosila 323 V. Zajedno sa uzorcima na gel je nanet i sledeći marker: *GeneRuler UltraLow Range DNA Ladder, ready-to-use* (Thermo Fisher Scientific, USA). Za elektroforezu korišćen je aparat *LKB-2001-100* spregnut sa ispravljачem *LKB-Macrodribe 5* i *LKB-Multitemp* jedinicom za hlađenje (Pharmacia, Sweden).

Nakon završene elektroforeze gelovi su prebačeni u vodeni rastvor boje SYBR™ Gold Nucleic Acid Gel Stain (Thermo Fisher) i inkubirani u mraku 30 min. Nakon isteka vremena trake na gelovima vizualizirane su posmatranjem pod UV svetlom na transiluminatoru (*Quantum-ST4, Vilber Lourmat, France*).

3.6. Denzitometrijska analiza sRNA traka

Intenziteti traka nkRNK izmereni su denzitometrijski uz pomoć *ImageJ* softvera (verzija 1.8.0.) za analizu slika i izračunati kao procenat svake pojedinačne trake u odnosu na ukupnu površinu denzitograma.

3.7. Izolacija i prečišćavanje ćelijskog zida listova paradajza

Ćelijski zid listova paradajza izolovan je prema protokolu opisanom u Simonović Radosavljević i sar., 2017. Od osušenih listova biljaka paradajza koji su korišćeni za određivanje suve mase biljaka pažljivo je uklonjena lisna nervatura, kao i delovi drški. Biljni materijal je spraćen u avanu sa tućkom, a zatim ekstrahovan u 80% metanolu (1:8, w/v) na šejkeru na sobnoj temperaturi u trajanju od 60 min. Homogenat je centrifugiran 20 min na 1.000 g na sobnoj temperaturi, a zatim je dobijeni pelet ispran dva puta 80% metanolom. Nakon ispiranja, pelet je resuspendovan u 1M NaCl sa 0,5% Triton \times 100, a zatim ponovo centrifugiran na 1.000 g na sobnoj temperaturi 20 min. Nakon toga pelet je ispran jednom destilovanom vodom, jednom 100% metanolom i dva puta 100% acetonom. Ovako prečišćen ćelijski zid osušen je preko noći u digestoru, a zatim je dodatno usitnjen do praha u mlinu (*Mixer Mill MM 400 Retsch*) i korišćen za strukturnu analizu.

3.8. FTIR spektroskopija

Infracrvena (IC) spektroskopija je brza, neinvazivna spektroskopska metoda koja se zasniva na činjenici da molekuli apsorbuju IC zraćenje na određenim frekvencijama koje su karakteristične za njegovu strukturu, pri čemu ga pobuđuju na viši energetski nivo. Oni

apsorbuju na rezonantnim frekvencijama, tj. kada je frekvencija apsorbovanog zračenja jednaka frekvenciji veze ili grupe koja vibrira. Kao rezultat ove apsorpcije, dobija se grafik zavisnosti apsorbovane energije od frekvencije.

Infracrveni spektri (FTIR, eng. *Fourier-transform infrared*) izolovanih i prečišćenih zidova paradajza snimani su na instrumentu *Perkin Elmer Spectrum Two* povezanim sa *Universal ATR* u oblasti od 4000 do 400 cm^{-1} sa 200 skenova uz rezoluciju od 4 cm^{-1} . Korekcija bazne linije urađena je pomoću softverskog paketa *Spectra Gryph software*.

3.9. Statistička obrada podataka

Statistička obrada podataka urađena je pomoću softversog paketa *Statistica 8.0* (*StatSoft, Inc.*). Rezultati su predstavljeni u obliku srednjih vrednosti \pm standardna greška (SE), dobijene u četiri ili više ponavljanja. Za svaki skup podataka zasebno je proveravana homogenost varijanse pomoću Levinovog testa. Za utvrđivanje statistički značajnih razlika u okviru prvog dela eksperimenta (poglavlja 4.1.1, 4.1.2, 4.1.3, 4.1.4, 4.1.6) urađena je dvofaktorska analiza varijanse (eng. *two-way ANOVA*) uz Tukijev post hoc test, gde je korišćen nivo značajnosti od 5 %.

U drugom delu eksperimenta (4.2.1, 4.2.2, 4.2.3, 4.2.4, 4.2.5, 4.2.6, 4.3.1, 4.3.2, 4.3.3, 4.3.4, 4.3.5) korišćena je trofaktorska analiza varijanse (eng. *three-way ANOVA*), dok je Tukijev post hoc test korišćen za specifična poređenja u okviru grupa. Nivo značajnosti bio je podešen na 5%.

Razlike u sadržaju karboksilnih kiselina i kontroli i suši, kao i konstitutivne razlike između genotipova urađene su primenom jednofaktorske analize varijanse (eng. *one-way ANOVA*) uz Tukijev post hoc test gde je korišćen nivo značajnosti od 5 %, dok su poređenja konstitutivnih razlika u sadržaju fenolnih jedinjenja između genotipova urađena primenom Studentovog t-testa.

Vrednosti ekspresije gena i nkRNK statistički su obrađene korišćenjem Welch t-testa sa nivoom značajnosti od 5%.

Analiza glavnih komponenti (eng. *principal component analysis, PCA*) korišćena je u analizi FTIR spektara u regionu 1800–800 cm^{-1} radi utvrđivanja sličnosti i/ili razlika ispitivanih uzoraka (Bro i Smilde, 2014). PCA razlaže matricu podataka (X), na matricu skorova (T) (eng. *score matrix*), matricu pondera-opterećenja (P) (eng. *loading matrix*) i matricu reziduala (E) (eng. *residual matrix*): $X=TP^T+E$. Matrica pondera sadrži informaciju o talasnim brojevima, matrica skorova nosi informaciju o analiziranim uzorcima, dok matrica E predstavlja neobjašnjenu varijansu u matrici X. Vektori glavnih komponenti, sadržani u matrici P, odabrani su tako da prva glavna komponenta apsorbuje najveći procenat ukupne varijabilnosti, da druga glavna komponenta apsorbuje najveći procenat preostale varijabilnosti i da je nekorelisana sa prvom glavnom komponentom. Sličnosti između uzoraka mogu biti detektovane smanjenjem dimenzionalnosti vektorskog prostora, odnosno projekcijom uzoraka na potprostor koji je definisan sa manjim brojem dimenzija (glavnih komponenti). Ukoliko prve dve glavne komponente apsorbuju zadovoljavajući procenat ukupne varijanse, uzorci mogu biti projektovani na ravan koju razapinju vektori glavnih komponenti. Ukoliko se na ovu ravan projektuju i vektori originalnih varijabli, dobija se biplot koji može pružiti informacije i o korelisanosti polaznih varijabli.

Prethodna spektralna obrada nije bila potrebna, a za obradu dobijenih podataka korišćen je softverski paket *Unscrambler X 10.4* (*Camo Analytics, Oslo, Norway*).

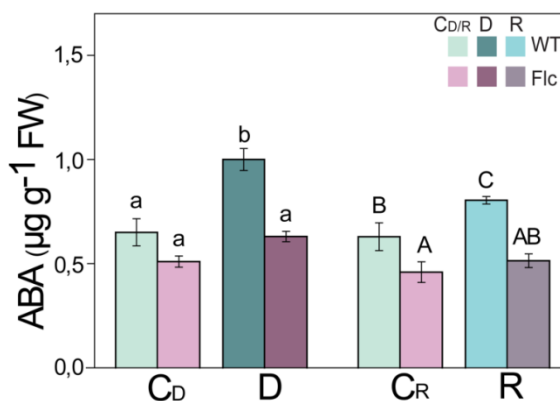
4. Rezultati

4.1. Uticaj jednog ciklusa suše na morfološke i metaboličke promene kod listova divljeg tipa paradajza i *flacca* mutanta gajenih na intenzitetu svetlosti $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$

U okviru ovog poglavlja prikazani su rezultati koji su dobijeni nakon što su biljake paradajza divljeg tipa (WT) i mutanta *flacca* (Flc) izlagane jednom ciklusu suše (suša i rehidratacija), pri intenzitetu svetlosti od $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Prikazani rezultati obuhvataju uticaj suše i rehidatacije na rastenje i razviće listova, provodljivost stoma, ukupni vodni potencijal, sadržaj ABA, rastvornih ugljenih hidrata i slobodnih aminokiselina u listovima paradajza.

4.1.1. Sadržaj ABA

Bez obzira na vodni status, pokazano je da je sadržaj ABA u listovima kod *flacca* mutanta niži nego kod divljeg tipa (prilog, tabela P1, efekat genotipa $P = 0,00110$). Izlaganje biljaka suši dovelo je do akumulacije ABA u listovima kod oba genotipa (slika 13, prilog, tabela P1). U suši kod divljeg tipa (WT D) sadržaj ABA povećan je za gotovo 50% u odnosu na odgovarajuću kontrolu (WT C_D), dok je to povećanje kod *flacca* (Flc D) iznosila približno 20%. Nakon šest dana rehidratacije sadržaj ABA u listovima mutanta (Flc R) vratio se na početne vrednosti, dok se kod divljeg tipa (WT R) i dalje zadržao povećan nivo za gotovo 25% u odnosu na odgovarajuću kontrolu WT C_R (slika 13).



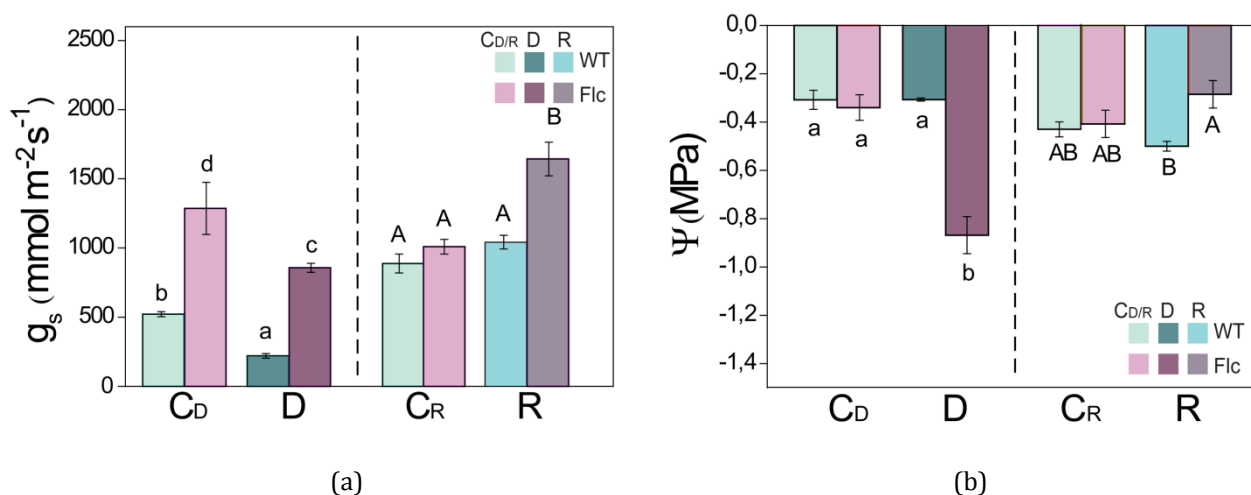
Slika 13. Sadržaj ABA u listovima divljeg tipa i *flacca* mutanta paradajza izloženih suši (D) i rehidrataciji (R) u trajanju od po šest dana. Odgovarajuće kontrole predstavljene su oznakama C_D i C_R. Vrednosti za sadržaj ABA izražene su u $\mu\text{g g}^{-1} \text{FW}$ i predstavljene su srednjim vrednostima \pm SE ($n \geq 4$). Različita slova predstavljaju statistički značajne razlike između proseka prema Tukey HSD post hoc testu ($p \leq 0,05$). Mala slova odnose se na razlike za tretman sušom, dok se velika slova odnose na razlike u periodu rehidratacije.

4.1.2. Provodljivost stoma i ukupni vodni potencijal

Na slici 14a prikazane su vrednosti za provodljivost stoma (g_s) na listovima paradajza WT i *flacca* mutanta, koji su bili izloženi jednom ciklusu suše i rehidratacije. Kod kontrolnih

biljaka uočen je različit trend otvorenosti stoma u zavisnosti od starosti biljaka. Tako kod kontrolnih biljaka koje su optimalno zalivane (C_D), na početku tretmana provodljivost kod *flacca* mutanta bila je duplo veća nego u listovima divljeg tipa. Nakon perioda rehidracije kod kontrolnih biljaka nisu uočene razlike u stomatalnoj provodljivosti između ova dva genotipa. Tretman suše je indukovao zatvaranje stoma kod oba genotipa. Kod WT zatvorenost se povećala za 2,5 puta u odnosu na onu kod kontrolnih biljaka, dok su se kod *flacca* mutanata stome zatvorile za oko 40% u odnosu na kontrolu. Biljke divljeg tipa su nakon perioda rehidracije imale ujednačenu provodljivost stoma sa onom kod optimalno zalivanih biljaka, dok je g_s kod *flacca* mutanta porasla gotovo dva puta u odnosu na kontrolu.

Izuzev provodljivosti stoma, parametar koji ukazuje na stepen stresa izazvan sušom i onog koji nastaje nakon rehidracije jeste ukupni vodni potencijal (ψ). U ovom eksperimentu promena vodnog potencijala koja je izazvana sušom je uočena jedino kod *flacca* mutanata. Tako, vrednost ψ kod *flacca* mutanta u suši je iznosila -0,87 MPa, što je za 2,5 puta manja vrednost od one koja izmerena u kontroli. Razlike ovog tipa nisu uočene između kontrolnih biljaka WT i *flacca*, kod njih su vrednosti ukupnog vodnog potencijala iznosile -0,31 MPa, odnosno -0,34 MPa. Sa druge strane, rehidratirane biljke imale su vrednosti vodnog potencijala koje su bile slične njihovim odgovarajućim kontrolama (slika 14b).

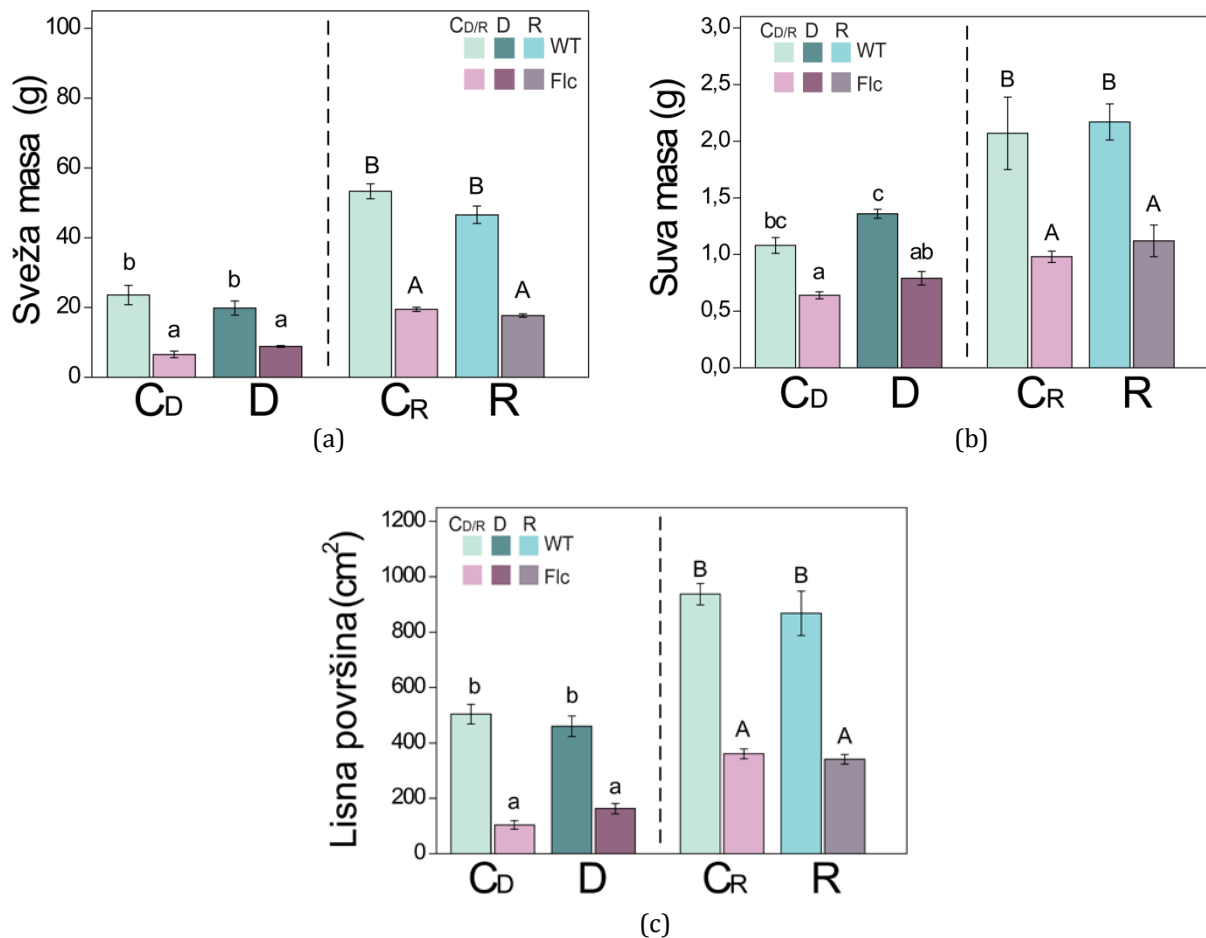


Slika 14. Provodljivost stoma, g_s (a) i ukupni vodni potencijal, ψ (b) kod listova divljeg tipa paradajza i *flacca* mutanta izloženih suši (D) i periodu rehidracije (R) u trajanju od po šest dana. Odgovarajuće kontrole predstavljene su oznakama C_D i C_R . Vrednosti za provodljivost stoma izražene su u $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ i predstavljene su srednje vrednosti \pm SE ($n \geq 4$). Različita slova predstavljaju statistički značajne razlike između proseka prema Tukey HSD post hoc testu ($p \leq 0,05$). Mala slova odnose se na razlike za tretman sušom, dok se velika slova odnose na razlike u periodu rehidracije.

4.1.3. Uticaj suše i rehidracije na rastenje biljaka paradajza

Uticaj primenjenog stresa suše na rastenje i razviće biljaka, praćen je i prikazan preko sledećih morfoloških parametara: površine listova, sveže i suve mase nadzemnog dela biljaka (slika 15). Kada su biljke bile snabdevene optimalnom količinom vode rastenje *flacca* bilo je redukovano u odnosu na biljke divljeg tipa (WT), što se da videti na osnovu nižih vrednosti za sve pomenute morfološke parametre. Stres kome su bile izložene biljke u trajanju od 6 dana nije izazvao statistički značajne promene u svežoj (slika 15a) i suvoj masi (slika 15b) kod WT i *flacca* u odnosu na kontrolne biljke. Međutim, primećuje se da je odnos sveže mase i lisne površine kod WT biljaka nepromenjen kako šestog, tako i dvanaestog dana trajanja eksperimenta i to bez obzira na vodni status (oko 0,05), dok je kod *flacca* mutanata u suši

odnos suve mase i lisne površine opao (oko 35%) u poređenju sa optimalno zalivanim biljkama. Takođe, kod WT i *flacca* biljaka nisu uočene promene u svežoj masi i lisnoj površini (slika 15c) između rehidratiranih i kontrolnih biljaka.



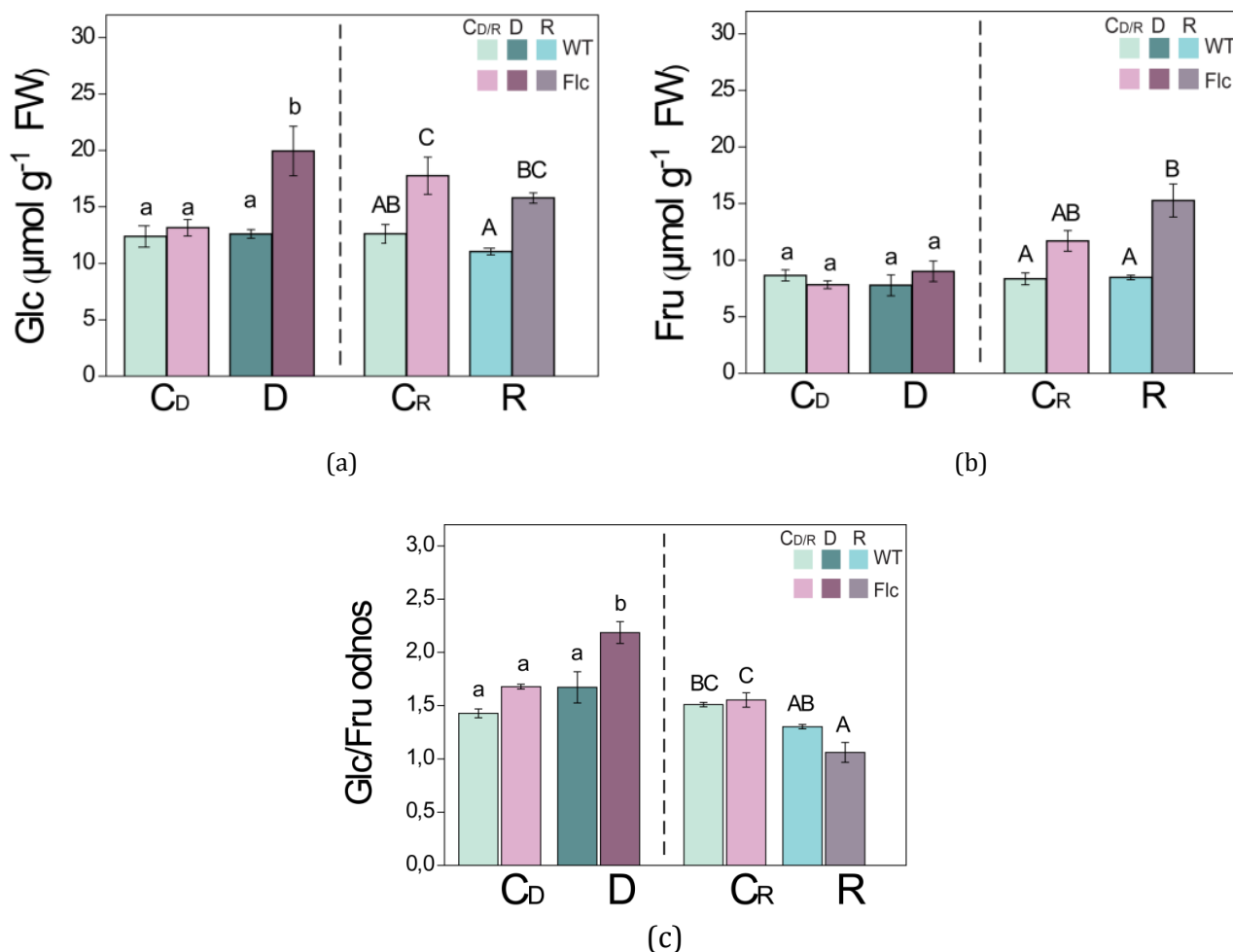
Slika 15. Sveža (a) i suva masa (b) nadzemnog dela biljaka i lisna površina (c) kod divljeg tipa i *flacca* mutanta paradajza izloženih suši (D) i periodu rehidratacije (R) u trajanju od po šest dana. Odgovarajuće kontrole predstavljene su oznakama C_D i C_R. Predstavljene su srednje vrednosti ± SE (n≥4). Različita slova predstavljaju statistički značajne razlike između proseka prema Tukey HSD post hoc testu (p ≤ 0,05). Mala slova odnose se na razlike za tretman sušom, dok se velika slova odnose na razlike u periodu rehidratacije.

4.1.4. Uticaj suše i rehidratacije na sadržaj rastvornih ugljenih hidrata u listovima

Primenom jonoizmenjivačke hromatografije sa elektrohemijom određeno je sadržaj solubilnih ugljenih hidrata kod optimalno zalivanih, izloženih suši i rehidratiranih WT i *flacca* biljaka paradajza (prilog, tabela P4). Tokom eksperimentalnog rada kada je sadržaj vode u zemljištu bio optimalan konstitutivni nivo ukupnih ugljenih hidrata bio je veći kod *flacca* u odnosu na biljke divljeg tipa WT (prilog, tabela P4). Takođe, suša nije uticala na sadržaj ukupnih ugljenih hidrata kod WT, dok je kod *flacca* zabeležen porast za oko 30%. Sa druge strane, rehidratacija nije prouzrokovala promene u ukupnom sadržaju ugljenih hidrata kod oba genotipa.

4.1.4.1. Uticaj suše i rehidracije na sadržaj monosaharida heksoza

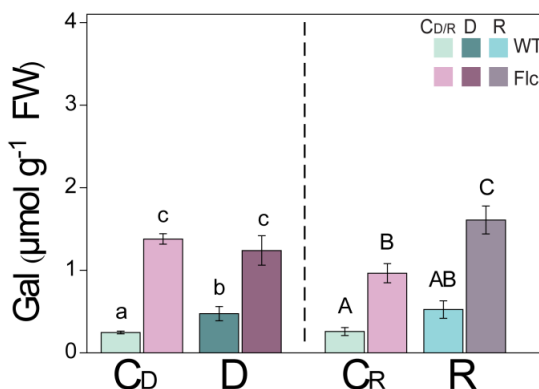
Izmereni najzastupljeniji ugljeni hidrati kod WT i *flacca* su glukoza i fruktoza, sa koncentracijama u opsegu od 11–20 $\mu\text{mol g}^{-1}$ FW, odnosno 7–16 $\mu\text{mol g}^{-1}$ FW. Ova dva monosaharida u zbiru predstavljaju oko 80% od ukupno izmerenih rastvornih ugljenih hidrata (slika 16, prilog, tabela P4).



Slika 16. Sadržaj (a) glukoze – Glc, (b) fruktoze – Fru i (c) njihov odnos – Glc/Fru u listovima divljeg tipa i *flacca* mutanta (Flc) paradajza izloženih suši (D) i periodu rehidracije (R) u trajanju od po šest dana. Odgovarajuće kontrole predstavljene su oznakama C_D i C_R . Predstavljene su srednje vrednosti \pm SE ($n \geq 4$). Različita slova predstavljaju statistički značajne razlike između proseka prema Tukey HSD post hoc testu ($p \leq 0,05$). Mala slova odnose se na razlike za tretman sušom, dok se velika slova odnose na razlike u periodu rehidracije.

Kod kontrolnih biljaka šestog dana sadržaj glukoze bio je sličan kod oba genotipa, dok je 12. dana kod *flacca* biljaka zabeležen porast za 40% u odnosu na WT. Za razliku od *flacca* mutanta gde je suša indukovala povećanu akumulaciju glukoze za 35%, kod WT biljaka je njen sadržaj ostao nepromenjen. Međutim, rehidracija nije uticala na promenu sadržaja glukoze kod WT i *flacca*, u odnosu na optimalno zalivane biljke (slika 16a). Sadržaj fruktoze između genotipova razlikovao se jedino kod biljaka nakon rehidracije, dok suša nije indukovala nikakve značajne promene posmatrano u okviru istog genotipa (slika 16b). Nakon suše odnos glukoze i fruktoze bio je povišen samo u *flacca* i to za oko 30%, dok je nakon rehidracije opao na vrednosti približne jedinici (slika 16c).

U odnosu na divlji tip, konstitutivno četiri puta viši sadržaj monosaharida galaktoze detektovan je u *flacca* biljkama, u kontrolnim uslovima. Takođe, *flacca* biljke koje su bile izložene suši i rehidraciji pokazale su 2,5 puta, odnosno 3 puta veći sadržaj ovog monosaharida u odnosu na WT. Sa druge strane, suša je indukovala statistički značajnu akumulaciju galaktoze jedino kod WT biljaka, dok je u *flacca* njen sadržaj ostao nepromenjen. Nakon rehidracije biljke oba genotipa pokazale su gotovo dva puta povećanu akumulaciju galaktoze u odnosu na optimalno zalivane biljke (slika 17, prilog, tabela P4).



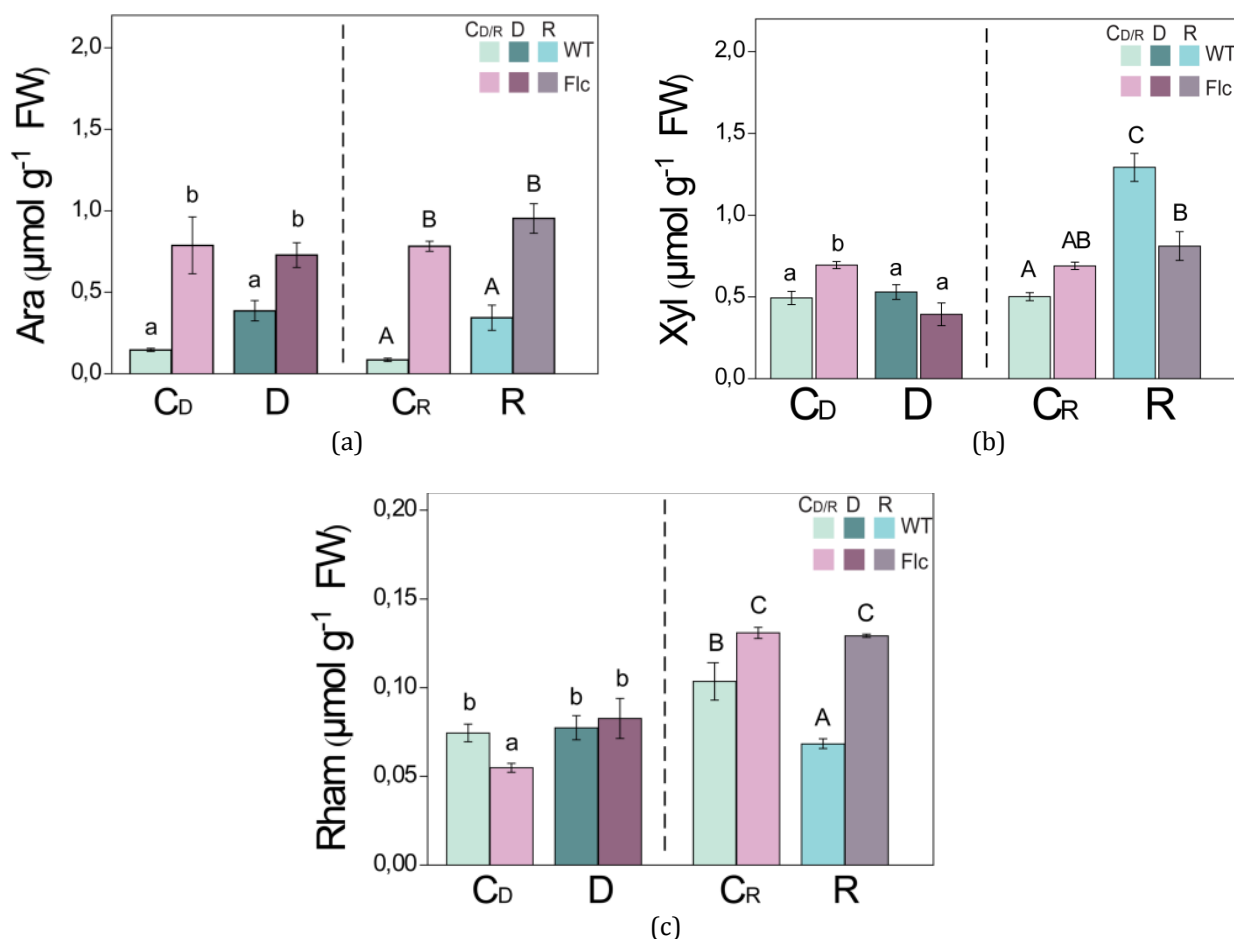
Slika 17. Sadržaj galaktoze – Gal u listovima divljeg tipa i *flacca* mutanta paradajza izloženih suši (D) i periodu rehidracije (R) u trajanju od po šest dana. Odgovarajuće kontrole predstavljene su oznakama C_D i C_R. Predstavljene su srednje vrednosti ± SE (n≥4). Različita slova predstavljaju statistički značajne razlike između proseka prema Tukey HSD post hoc testu ($p \leq 0,05$). Mala slova odnose se na razlike za tretman sušom, dok se velika slova odnose na razlike u periodu rehidracije.

4.1.4.2. Uticaj suše i rehidracije na sadržaj monosaharida pentozna

Na slici 18 prikazan je sadržaj pentozna arabinoze, ksiloze i ramnoze u listovima WT i *flacca* mutanta paradajza. Suša je indukovala akumulaciju arabinoze jedino u WT listovima, dok je kod *flacca* njena količina ostala nepromenjena, što se kasnije pokazalo i kod rehidratiranih biljaka. Međutim, u svim tačkama eksperimenta zabeležene su konstitutivno veće koncentracije arabinoze u *flacca* u odnosu na WT, koje se kreću u rasponu od 2 do 10 puta (slika 18a, prilog tabela P5.).

U slučaju ksiloze primećen je suprotan trend akumulacije u zavisnosti od genotipa. Kod WT biljaka suša nije uzrokovala nikakve promene u koncentraciji ksiloze, dok se u rehidraciji njena količina udvostručila u odnosu na optimalno zalivane biljke. Sa druge strane, u *flacca* biljkama suša je indukovala smanjenje koncentracije ksiloze, dok se nakon rehidracije njen sadržaj nije značajno promenio. I u slučaju ove pentoze zabeležen je konstitutivno veći nivo u *flacca* u odnosu na divlji tip (slika 18b).

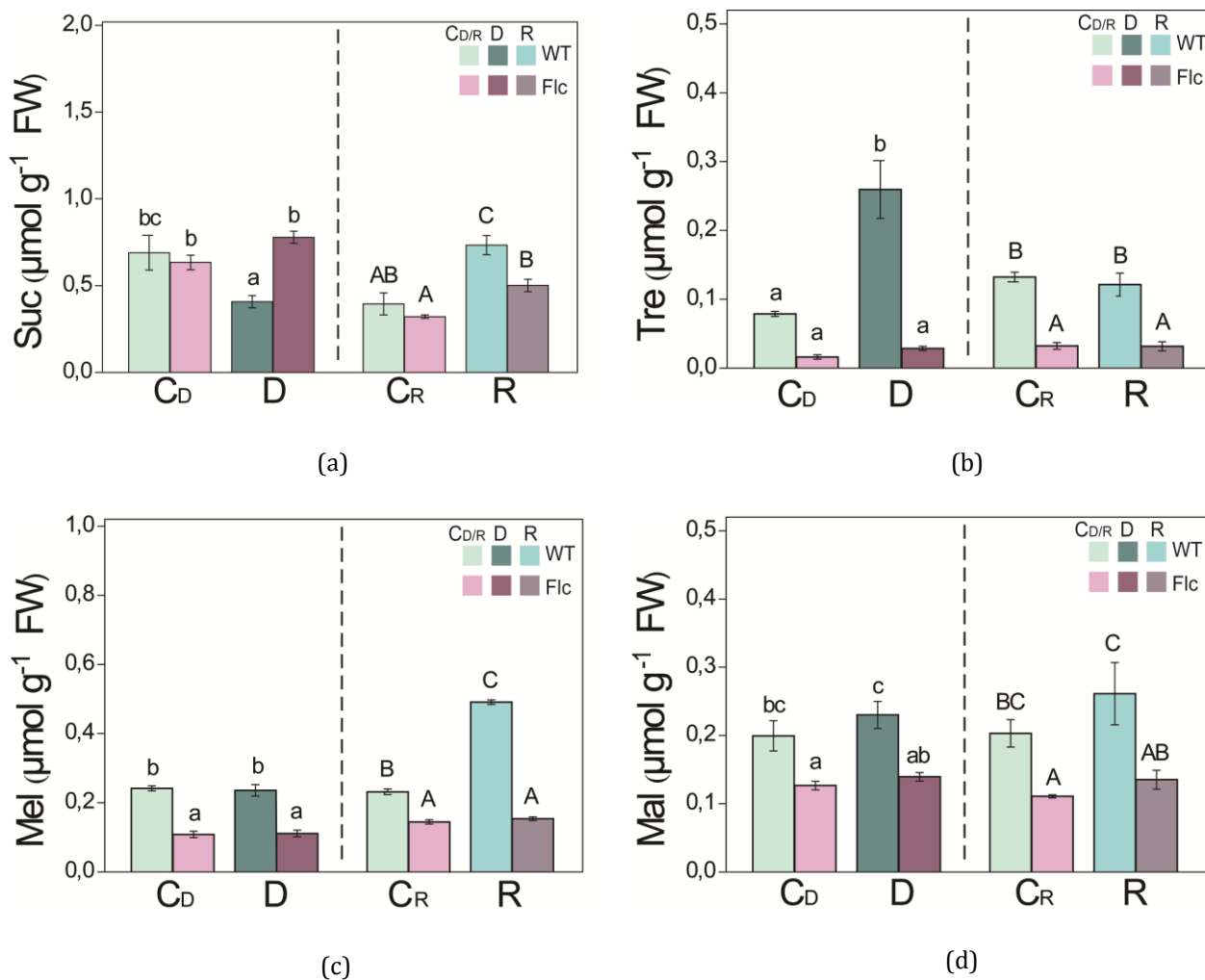
Suša je uticala na sadržaj ramnoze jedino u *flacca*, a takođe je primećena njena povećana akumulacija u WT biljkama u odnosu na *flacca* šest dana (C_D) nakon otpočinjanja eksperimenta (slika 18c).



Slika 18. Sadržaj (a) arabinoze – Ara, (b) ksiloze – Xyl i (c) ramnoze – Rham u listovima divljeg tipa i *flacca* mutanta paradajza izloženih suši (D) i periodu rehidracije (R) u trajanju od po šest dana. Odgovarajuće kontrole predstavljene su oznakama C_D i C_R . Predstavljene su srednje vrednosti \pm SE ($n \geq 4$). Različita slova predstavljaju statistički značajne razlike između proseka prema Tukey HSD post hoc testu ($p \leq 0,05$). Mala slova odnose se na razlike za tretman sušom, dok se velika slova odnose na razlike u periodu rehidracije.

4.1.4.3. Uticaj suše i rehidracije na sadržaj oligosaharida

Izlaganje biljaka suši drugačije je uticalo na sadržaj disaharida saharoze u WT i *flacca* mutantu (slika 19a). Tako je kod WT suša indukovala smanjenje njene koncentracije za približno 40%, dok je kod *flacca* taj sadržaj ostao nepromenjen. Uopšteno posmatrano, kod optimalno zalivanih biljaka nisu detektovane razlike u konstitutivnom sadržaju saharoze za dva posmatrana genotipa, dok je nakon rehidracije kod *flacca* uočeno opadanje u odnosu na WT za oko 30% (slika 19a). U optimalnim uslovima zalivanja (C_D i C_R) sadržaj disaharida trehaloze, melibioze i maltoze bio je niži kod *flacca* u odnosu na divlji tip (WT), a suša je uticala na povećanje koncentracije trehaloze jedino kod WT, i to za tri puta (slika 19).

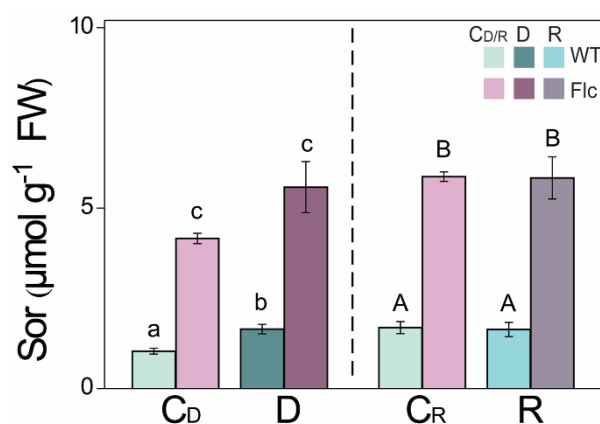


Slika 19. Sadržaj (a) saharoze – Suc, (b) trehaloze – Tre, (c) melibioze – Mel i (d) maltoze – Mal u listovima divljeg tipa i *flacca* mutanta paradajza izloženih suši (D) i periodu rehidracije (R) u trajanju od po šest dana. Odgovarajuće kontrole predstavljene su oznakama C_D i C_R. Predstavljene su srednje vrednosti \pm SE (n \geq 4). Različita slova predstavljaju statistički značajne razlike između proseka prema Tukey HSD post hoc testu (p \leq 0,05). Mala slova odnose se na razlike za tretman sušom, dok se velika slova odnose na razlike u periodu rehidracije.

U ovoj analizi kvantifikovani su i oligosaharidi koji su bili u manjoj meri zastupljeni kod oba genotipa paradajza, u odnosu na gore opisane ugljene hidrate. Dok tetrasaharid, stahioza i trisaharidi, maltotrioza i panoza, ne pokazuju statistički značajne konstitutivne razlike između genotipova, u WT je sadržaj trisaharida rafinoze u odnosu na *flacca* mutant bio uvećan za više od 20%. Sa druge strane, suša i rehidracija nisu indukovale promene u sadržaju ovih oligosaharida kod dva genotipa paradajza (prilog, tabela P4).

4.1.4.4. Uticaj suše i rehidracije na sadržaj sorbitola

Usled poznatog značaja šećernog alkohola sorbitola kao osmotski aktivnog jedinjenja, analizirana je njegova zastupljenost u suši i kontrolnim uslovima kod WT i *flacca* (Slika 20). U svim tretmanima uočeno je da u proseku uvećanje sadržaja sorbitola iznosi 3–4 puta kod *flacca* u odnosu na WT. Takođe, posmatrano unutar svakog genotipa suša je doprinela porastu sorbitola kod WT za 60 %, a kod *flacca* za oko 34 %. Sadržaj ovog alkohola u rehidratiranim biljkama kod oba genotipa bio je u rangi optimalno zalivanih biljaka.



Slika 20. Sadržaj sorbitola – Sor u listovima divljeg tipa paradajza i *flacca* mutanta izloženih suši (D) i periodu rehidracije (R) u trajanju od po šest dana. Odgovarajuće kontrole predstavljene su oznakama C_D i C_R. Predstavljene su srednje vrednosti \pm SE ($n \geq 4$). Različita slova predstavljaju statistički značajne razlike između proseka prema Tukey HSD post hoc testu ($p \leq 0,05$). Mala slova odnose se na razlike za tretman sušom, dok se velika slova odnose na razlike u periodu rehidracije.

4.1.5. Uticaj suše na sadržaj karboksilnih kiselina

Sadržaj jabučne i limunske kiseline u listovima WT i *flacca* mutanta prikazan je u tabeli 2. U zavisnosti od genotipa, konstitutivna zastupljenost ovih karboksilnih kiselina je različita. Tako je jabučna kiselina zastupljena u većoj koncentraciji kod biljaka divljeg tipa (WT) u kontroli (C_D i C_R), dok limunske ima više kod *flacca*. Takođe, ova dva genotipa su imala drugačiji odgovor u akumulaciji ovih kiselina u uslovima suše. Dok je kod divljeg tipa u suši došlo do povećanja u akumulaciji limunske kiseline za oko dva puta, sadržaj jabučne se smanjio gotovo za dva puta. Sa druge strane, kod *flacca* mutanta suša je indukovala povećanje u koncentraciji jabučne i limunske kiseline za oko 1,5 puta.

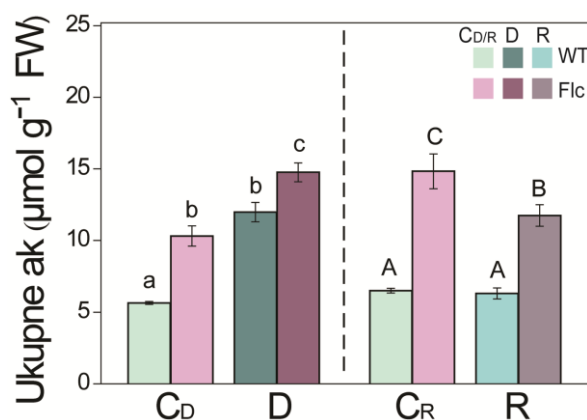
Tabela 2. Sadržaj jabučne i limunske kiseline u listovima paradajza divljeg tipa (WT) i *flacca* mutanta u suši (D). Odgovarajuće kontrole predstavljene su oznakama C_D. Predstavljene su srednje vrednosti \pm SE ($n \geq 3$). Različita slova predstavljaju statistički značajne razlike između proseka prema Tukey HSD post hoc testu ($p \leq 0,05$).

	WT		<i>flacca</i>	
	C _D	D	C _D	D
mg g ⁻¹ FW				
Jabučna kiselina	1,92 \pm 0,05 ^b	1,05 \pm 0,10 ^a	1,58 \pm 0,10 ^b	2,52 \pm 0,06 ^c
Limunska kiselina	0,96 \pm 0,03 ^a	1,79 \pm 0,03 ^b	1,67 \pm 0,03 ^{ab}	2,56 \pm 0,32 ^c

4.1.6. Uticaj suše i rehidracije na sadržaj slobodnih aminokiselina

U cilju sagledavanja uticaja stresa suše na zastupljenost slobodnih aminokiselina u listovima divljeg tipa i *flacca* mutanta paradajza određen je njihov sadržaj primenom HPLC metode sa fluorescentnom detekcijom, kao i sprektrofotometrijski. Aminokiseline su analizirane kod optimalno zalivanih, izloženih suši i rehidratiranih biljaka (slika 7, priloga, tabela P6). Pokazano je da je sadržaj ukupnih slobodnih aminokiselina kao i pojedinačnih promenljiv tokom razvića biljaka kod oba genotipa. Međutim, akumulacija ukupnih aminokiselina bila je za dva puta veća u listovima *flacca* u odnosu na WT, bez obzira na vodni status (slika 21, priloga, tabela P6).

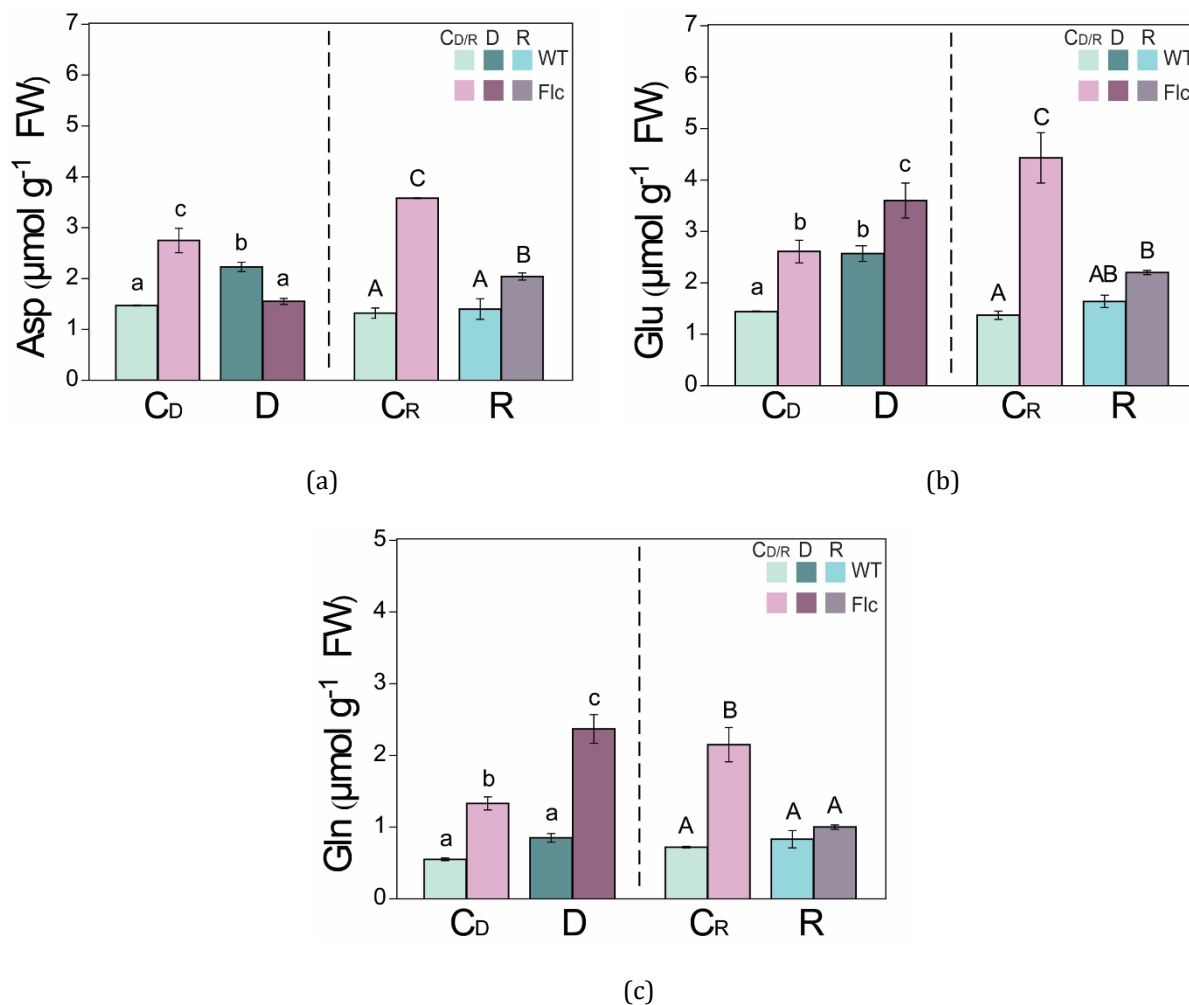
Sadržaj najviše zastupljenih aminokiselina, kao i aminokiselina posebno značajnih za metabolizam biljaka u suši prikazan je u okviru ovog poglavlja, dok su vrednosti ostalih identifikovanih aminokiselina prikazane u tabeli P6 u poglavlju Prilozi.



Slika 21. Sadržaj ukupnih aminokiselina u listovima divljeg tipa i *flacca* mutanta paradajza izloženih suši (D) i periodu rehidracije (R) u trajanju od po šest dana. Odgovarajuće kontrole predstavljene su oznakama C_D i C_R. Predstavljene su srednje vrednosti ± SE (n≥4). Različita slova predstavljaju statistički značajne razlike između proseka prema Tukey HSD post hoc testu ($p \leq 0,05$). Mala slova odnose se na razlike za tretman sušom, dok se velika slova odnose na razlike u periodu rehidracije.

Aminokiseline koje su bile najzastupljenije kod oba genotipa u svim ispitivanim tačkama jesu asparaginska kiselina (Asp), glutaminska kiselina (Glu) i glutamin (Gln), pri čemu su sve tri pokazale konstitutivno viši sadržaj u *flacca* za 2 ili 3 puta u odnosu na WT u kontrolnim uslovima (C_D i C_R) (slika 22). Nakon izlaganja biljaka suši asparaginska kiselina je pokazala drugačiji trend u *flacca* u odnosu na WT. Dok je suša indukovala povećanje u akumulaciji Asp kod WT za oko 35%, kod *flacca* se njen sadržaj smanjio za 40%. Nakon rehidracije kod WT se sadržaj Asp vratio na kontrolne vrednosti, dok je kod *flacca* i dalje pokazivao opadajući trend (slika 22a). U slučaju glutaminske kiseline i glutamina suša je u oba genotipa indukovala njihov porast. Tako je kod WT količina Glu gotovo duplirana, a kod *flacca* je uvećana samo za trećinu. Sa druge strane, rehidracija nije uticala na sadržaj Glu kod WT, dok je kod *flacca* njena koncentracija značajno opala (slika 22b). Sličan trend je dobijen i za glutamin (Gln), nakon izlaganja suši WT biljke su akumulirale 35% više, a kod *flacca* 44%. Dok je nakon rehidracije njegov nivo kod WT postigao kontrolne vrednosti, odnosno kod *flacca* je opao za dva puta u odnosu na optimalno zalivane biljke (Slika 22c).

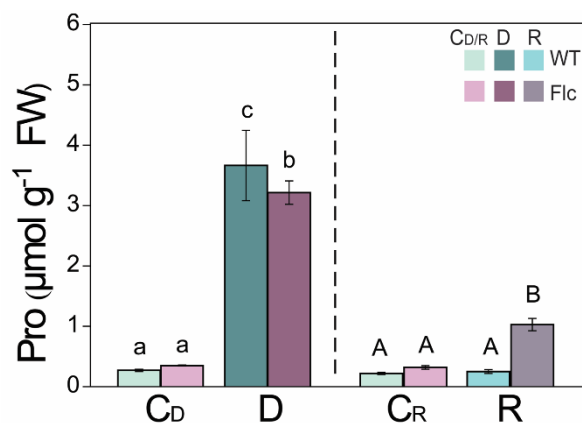
Takođe, distribucija ovih aminokiselina značajno se promenila nakon suše i rehidracije u odnosu na optimalno zalivane biljke. Tako je, nakon suše procentualna zastupljenost asparaginske kiseline u ukupnom sadržaju aminokiselina kod oba genotipa opala sa 27% na 19% kod WT, odnosno na 11% kod *flacca*, dok se njena zastupljenost nakon rehidracije izjednačila sa udelom Asp kod optimalno zalivanih biljaka. Nakon rehidracije u *flacca* udeo Glu i Gln se smanjio, dok je u WT ostao relativno nepromenjen (slika 26).



Slika 22. Sadržaj ukupnih aminokiselina u listovima divljeg tipa i *flacca* mutanta paradajza izloženih suši (D) i periodu rehidracije (R) u trajanju od po šest dana. Odgovarajuće kontrole predstavljene su oznakama C_D i C_R. Predstavljene su srednje vrednosti \pm SE ($n \geq 4$). Različita slova predstavljaju statistički značajne razlike između proseka prema Tukey HSD post hoc testu ($p \leq 0,05$). Mala slova odnose se na razlike za tretman sušom, dok se velika slova odnose na razlike u periodu rehidracije.

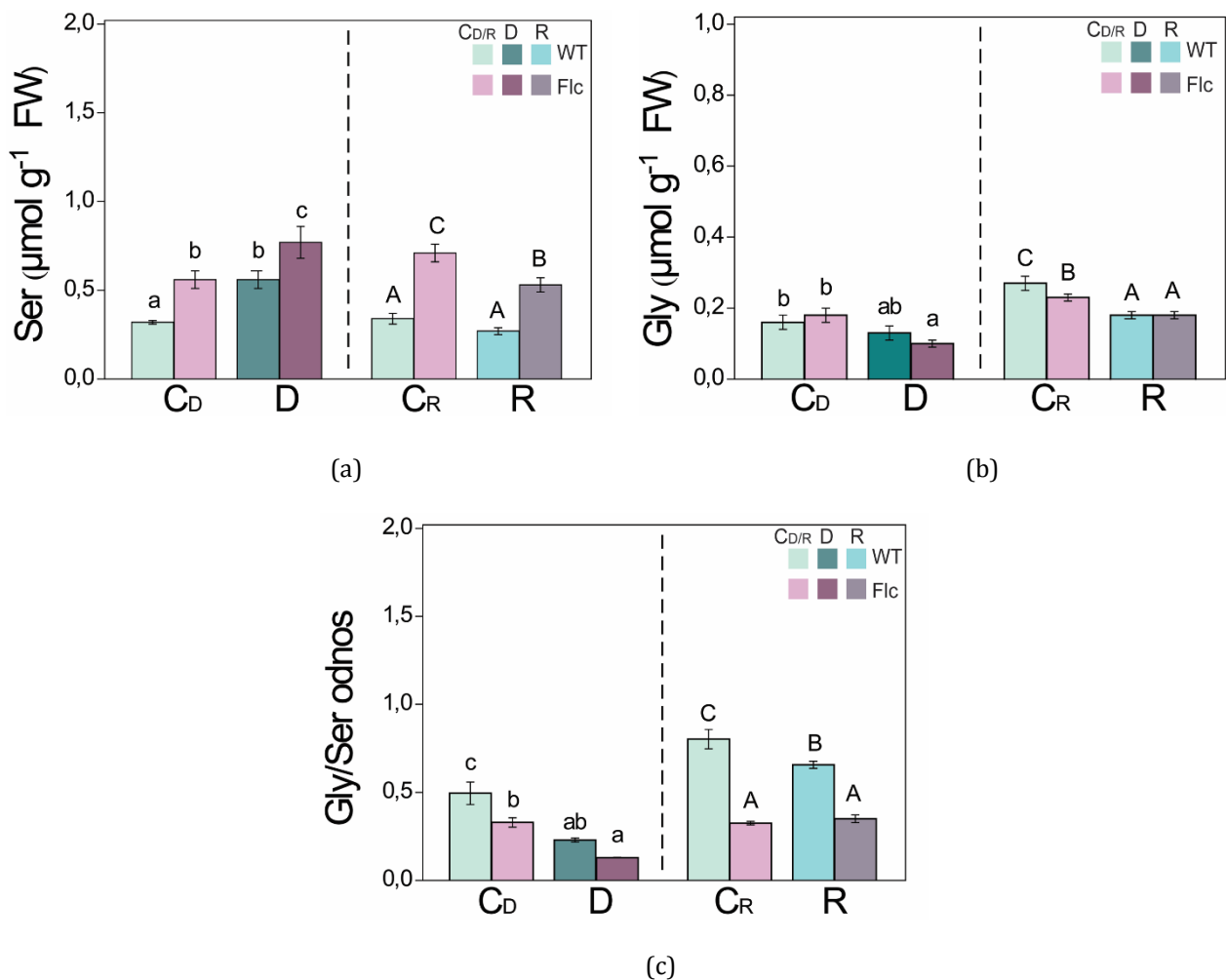
Pri izlaganju biljaka suši, dolazi do značajne akumulacije prolina, kao osmotski aktivnog jedinjenja, te se u ovom radu pristupilo njegovoj analizi. Prolin je aminokiselina na čiji sadržaj u listovima je vodni deficit pokazao najveći efekat. Tako je kod WT sadržaj prolina povećan za više od 13 puta nakon izlaganja suši, dok je kod *flacca* to povećanje iznosila oko 10 puta, poređeno sa kontrolom (C_D). Nakon rehidracije kod WT biljaka, sadržaj prolina izjednačio se sa onim kod optimalno zalivanih biljkaka, dok je kod *flacca* njegov nivo bio povišen u odnosu na kontrolu (C_R) tri puta (slika 23).

Suša je uticala i na procentualni udeo prolina u ukupnom sadržaju aminokiselina. Kod WT u kontrolnim uslovima doprinos prolina u sadržaju svih aminokiselina iznosio je 5%, dok je nakon izlaganja suši njegov udeo porastao na 30%. Sličan trend uočen je kod *flacca*, gde se zastupljenost prolina nakon suše povećala sedam puta (slika 26). Konstitutivni sadržaj prolina tokom razvoja biljaka u optimalnim uslovima bio je relativno ujednačen između genotipova.



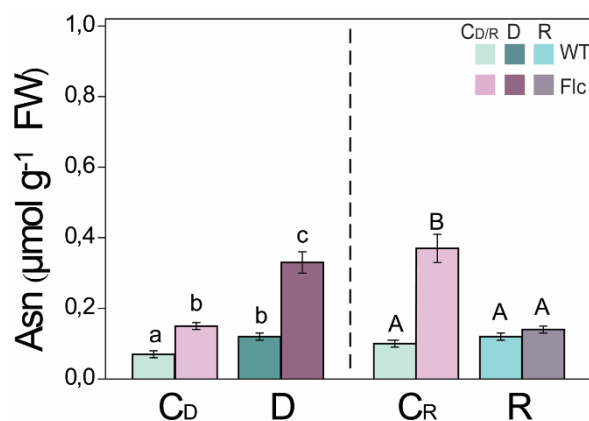
Slika 23. Sadržaj prolina – Pro u listovima divljeg tipa i *flacca* mutanta paradajza izloženih suši (D) i periodu rehidracije (R) u trajanju od po šest dana. Odgovarajuće kontrole predstavljene su oznakama C_D i C_R. Predstavljene su srednje vrednosti ± SE (n≥4). Različita slova predstavljaju statistički značajne razlike između proseka prema Tukey HSD post hoc testu ($p \leq 0,05$). Mala slova odnose se na razlike za tretman sušom, dok se velika slova odnose na razlike u periodu rehidracije.

Na slikama 24a i 24b prikazane su promene u sadržaju aminokiselina glicin i serin u suši, a čiji se značaj ogleda u tome što su direktno uključene u fotorespiraciju. Izmereni osnovni nivo serina veći je u *flacca* za 40% u odnosu na WT biljke, a suša je indukovala akumulaciju u oba genotipa za 40% u WT, odnosno 30% u *flacca*. Međutim, nakon rehidracije zadržala se povećana koncentracija ove aminokiseline kod oba genotipa. Sa druge strane, konstitutivne razlike u nivou glicina između genotipova zabeležene su samo u biljkama nakon 12. dana od početka eksperimenta (C_R), ali ne i u C_D, dok je suša indukovala njegovo smanjenje u *flacca*. Takođe, rehidracija je uticala na smanjenje koncentracije glicina u oba genotipa u odnosu na optimalno zalivane biljke. Smanjenje količine glicina u *flacca* nakon suše uticalo je na dvostruko smanjenje odnosa glicina i serina u poređenju sa kontrolnim biljkama. U WT biljkama nakon suše takođe je došlo do smanjenja odnosa glicina i serina, ali to se može pripisati povećanoj koncentraciji serina pri vodnom deficitu (slika 24c).

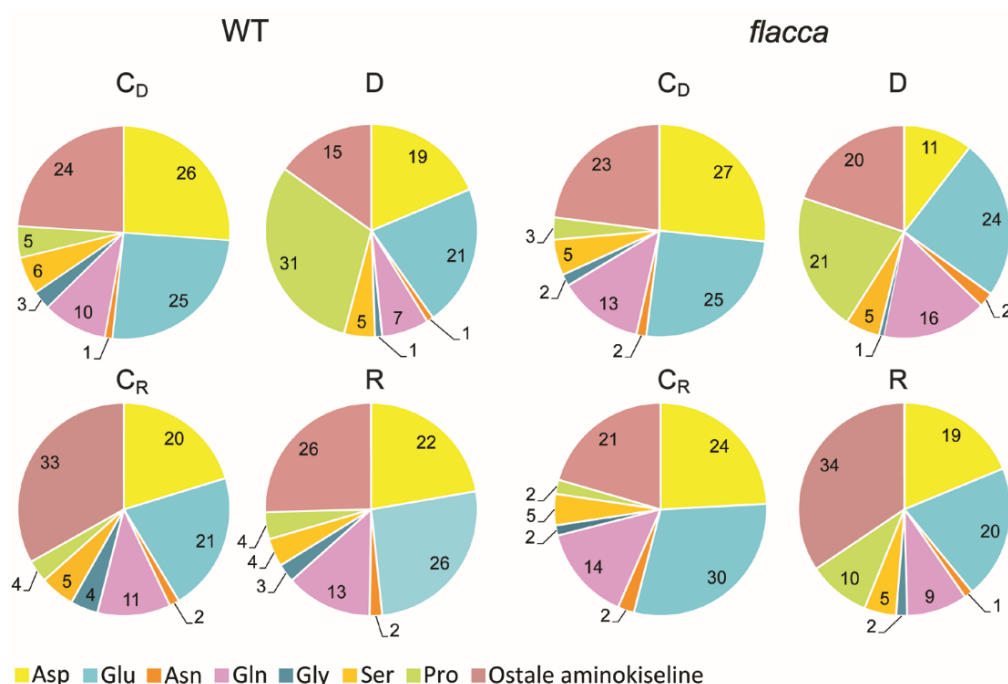


Slika 24. Sadržaj serina –Ser, glicina – Gly i njihov odnos u listovima divljeg tipa i *flacca* mutanta paradajza izloženih suši (D) i periodu rehidracije (R) u trajanju od po šest dana. Odgovarajuće kontrole predstavljene su oznakama C_D i C_R . Predstavljene su srednje vrednosti \pm SE ($n \geq 4$). Različita slova predstavljaju statistički značajne razlike između proseka prema Tukey HSD post hoc testu ($p \leq 0.05$). Mala slova odnose se na razlike za tretman sušom, dok se velika slova odnose na razlike u periodu rehidracije.

Zbog činjenice da je asparagin (Asn) značajan izvor azota koji je neophodan za rastenje biljaka, posebno je bilo od interesa analizirati kako suša utiče na njegov sadržaj u listovima (slika 25). Pokazano je da *flacca* konstitutivno sadrži 2 do 3 puta više ove aminokiseline nego divlji tip (WT), dok je suša u oba genotipa indukovala povećanu akumulaciju do dva puta. Uticaj rehidracije bio je takav da su se vrednosti Asn u WT izjednačile sa kontrolnim, dok je u *flacca* bila zabeležena smanjena akumulacija u odnosu na optimalno zalivane biljke.



Slika 25. Sadržaj asparagina – Asn u listovima divljeg i *flacca* mutanta paradajza izloženih suši (D) i periodu rehidracije (R) u trajanju od po šest dana. Odgovarajuće kontrole predstavljene su oznakama C_D i C_R. Predstavljene su srednje vrednosti ± SE (n≥4). Različita slova predstavljaju statistički značajne razlike između proseka prema Tukey HSD post hoc testu ($p \leq 0.05$). Mala slova odnose se na razlike za tretman sušom, dok se velika slova odnose na razlike u periodu rehidracije.



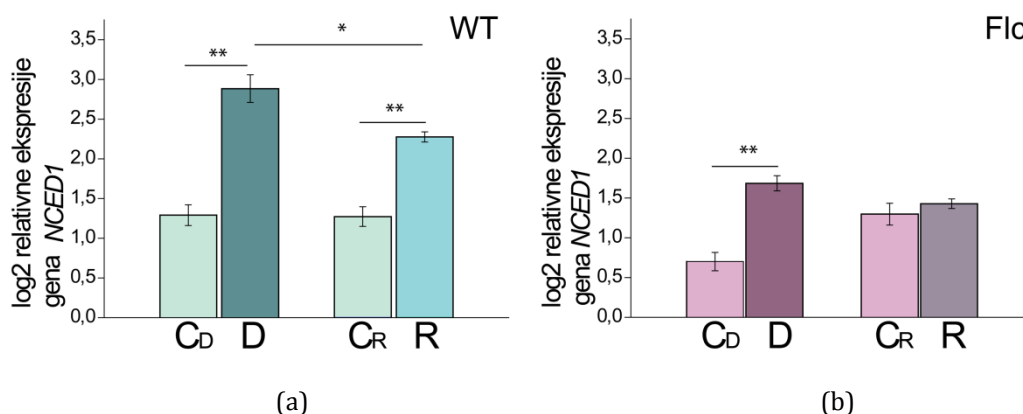
Slika 26. Distribucija slobodnih aminokiselina u listovima divljeg tipa i *flacca* mutanta paradajza izloženih suši (D) i periodu rehidracije (R) u trajanju od po šest dana. Odgovarajuće kontrole predstavljene su oznakama C_D i C_R. Predstavljene su srednje vrednosti ± SE (n≥4).

Primena suše odrazila se i na sadržaj manje zastupljenih aminokiselina u listovima paradajza u oba genotipa (prilog, tabela P6). Aminokiseline razgranatog bočnog lanca, leucin (Leu) i valin (Val) bile su konstitutivno više zastupljene u mutantu, nego u divljem tipu, dok je nivo izoleucina (Ile) bio izjednačen. Nakon izlaganja biljaka vodnom deficitu koncentracija valina bila je povećana u oba genotipa, dok rehidracija nije uticala na njegov sadržaj u WT, odnosno dovela je do smanjenja u *flacca*. Nivo leucina u WT nakon suše ostao je nepromenjen, dok se u *flacca* mutantu smanjio gotovo dva puta. Izoleucin je pokazao suprotan trend nakon suše, u WT se njegov sadržaj smanjio 2.5 puta, dok je u *flacca* uvećan dvostruko. Nakon rehidracije u oba genotipa nivo izoleucina bio je izjednačen sa vrednostima dobijenim kod optimalno zalivanih biljaka. Sadržaj alanina (Ala) ostao je nepromenjen nakon izlaganja suši

kod oba genotipa, dok se kod rehidratisanih biljaka smanjio u odnosu na kontrolne biljke. Suša je direktno uticala na sadržaj tirozina (Tyr) i kod WT i kod *flacce*, gde je zabeleženo njegovo povećanje za dva puta, dok je u rehidraciji promena prisutna jedino u *flacca* gde je došlo do smanjenja njegove akumulacije. Na nivo fenilalanina (Phe) suša je uticala samo kod *flacca*, gde je došlo do smanjenja njegovog sadržaja. Uopšteno posmatrajući ove tri aminokiseline (Ala, Tyr i Phe) konstitutivno su više bile zastupljene u *flacca*, nego u biljkama divljeg tipa. Posmatrajući ornitin, takođe se mogu uočiti konstitutivne razlike u korist mutanta, dok je izlaganje suši uticalo na njegovu akumulaciju kod oba genotipa (prilog, tabela P6).

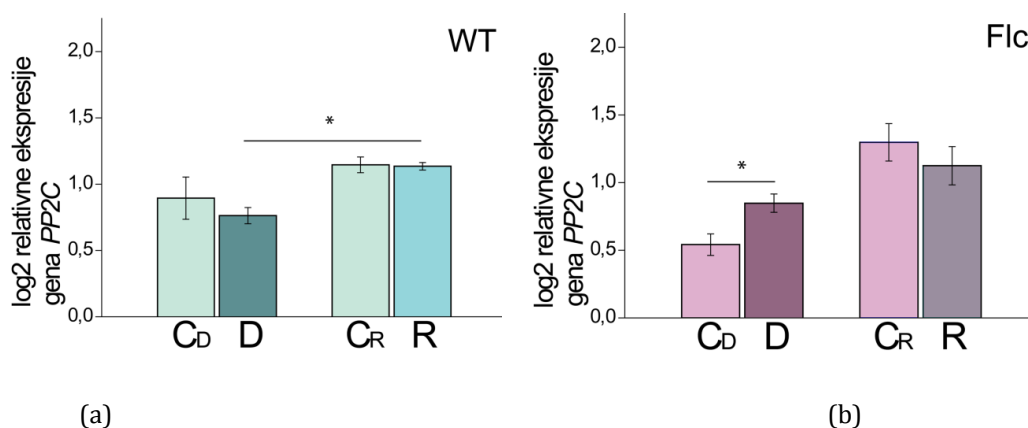
4.1.7. Uticaj suše i rehidracije na ekspresiju gena odovornih za sintezu ABA i transdukciju signala

Izlaganje biljaka suši indukovalo je ekspresiju *NCED1* gena kod oba genotipa, sa povećanjem ekspresije preko dva puta u odnosu na optimalno zalivane biljke i kod WT (slika 27a), i kod *flacca* mutanta (slika 27b). Sa druge strane, u rehidratisanim WT biljkama uočava se povećan nivo ekspresije u odnosu na kontrolne biljke za oko 70%, ali i smanjenje ekspresije u odnosu na biljke koje su bile izložene suši za gotovo 20%. Međutim, kod *flacca* biljaka je pokazano da je rehidracija uticala da se ekspresija *NCED1* gena izjednači sa ekspresijom kod kontrolnih (C_R) biljaka.



Slika 27. Ekspresija *NCED1* gena u listovima divljeg tipa (a) i *flacca* mutanta (b) paradajza izloženih suši (D) i periodu rehidracije (R) u trajanju od po šest dana. Odgovarajuće kontrole predstavljene su oznakama C_D i C_R . Relativna ekspresija gena dobijena je pomoću qRT PCR, normalizovana je na hauskiping gen i izračunata u odnosu na WT start kontrolu. Predstavljene su srednje vrednosti \pm SE ($n \geq 4$). Zvezdice predstavljaju statistički značajne razlike između kontrole C_D i biljaka u suši (D), odnosno kontrole C_R i rehidratisanih biljaka (R), kao i između D i R biljaka unutar svakog genotipa prema Welch t-testu (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).

Izlaganje biljaka jednom ciklusu suše nije indukovalo povećanje ekspresije *PP2C* gena u listovima WT biljaka, te su vrednosti ostale slične kao i kod kontrolnih biljaka. Ovakav trend je zadržan i kod rehidratisanih biljaka (28a). Sa druge strane, u *flacca* mutantu suša je indukovala povećanje ekspresije *PP2C* gena čiji se nivo nakon rehidracije izjednačava sa nivoom ekspresije kao kod optimalno zalivanih C_R biljaka (28b).



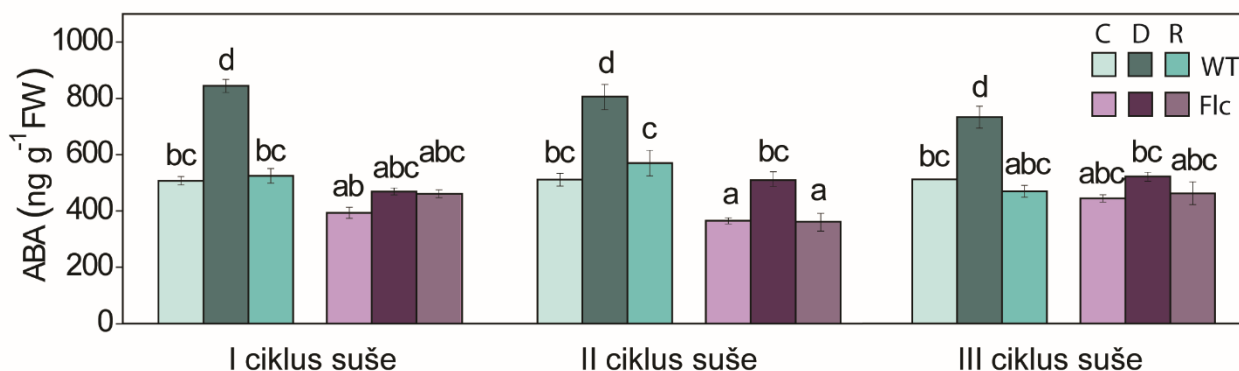
Slika 28. Ekspresija *PP2C* gena u listovima divljeg tipa (a) i *flacca* mutanta (b) paradajza izloženih suši (D) i periodu rehidracije (R) u trajanju od po šest dana. Odgovarajuće kontrole predstavljene su oznakama C_D i C_R. Relativna ekspresija gena dobijena je pomoću qRT PCR, normalizovana je na hauskiping gen i izračunata u odnosu na WT start kontrolu. Predstavljene su srednje vrednosti ± SE (n≥4). Zvezdice predstavljaju statistički značajne razlike između kontrole C_D i biljaka u suši (D), odnosno kontrole C_R i rehidratiranih biljaka (R), kao i između D i R biljaka unutar svakog genotipa prema Welch t-testu (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).

4.2. Uticaj tri ciklusa suše na morfološke i metaboličke promene kod divljeg tipa paradajza i *flacca* mutanta gajenih na 800 μmol m⁻² s⁻¹

Nakon što su u prvom delu istraživanja praćeni efekti koji nastaju primenom jednog ciklusa suše kod divljeg tipa i *flacca* mutanta pri svetlosti intenziteta 250 μmol m⁻² s⁻¹, u ovom delu analizirani su uticaji tri ciklusa suše pri višem intenzitetu (800 μmol m⁻² s⁻¹) svetlosti na rastenje i razviće biljaka, praćenjem statusa fizioloških procesa preko: sadržaja apscisinske kiseline, provodljivosti stoma, ukupnog vodnog potencijala, pH ksilemskog soka, sadržaja metabolita (aminokiseline prolin i pojedinih ugljenih hidrata) i ekspresije gena uključenih kao odgovor na stres izazvan deficitom vode u zemljištu. U okviru ovog poglavlja nalaze se rezultati analize konstituenata ćelijskog zida u listovima kod oba genotipa nakon produženog oporavka posle prvog ciklusa suše i nakon trećeg ciklusa suše.

4.2.1. Efekti primene tri ciklusa suše na sadržaj ABA

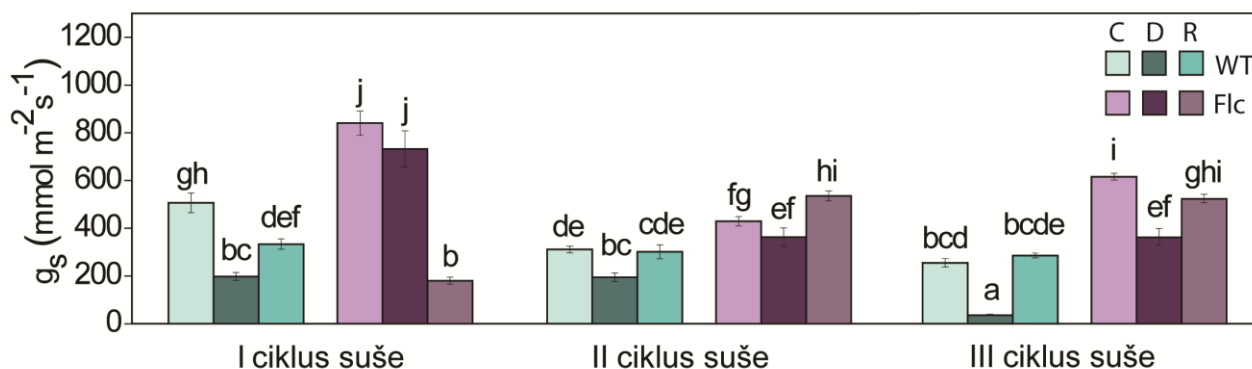
Kao i u prvom delu istraživanja, i ovde je pokazano da *flacca* mutant sadrži niži sadržaj ABA u odnosu na WT (slika 29, prilog, tabela P8, efekat genotipa $p = 0,00000$). Tokom čitavog vegetativnog perioda sadržaj ABA u *flacca* bio je niži za 20–30% u odnosu na svoju roditeljsku liniju Ailsa Craig. Izlaganje biljaka prvom ciklusu suše, u trajanju od šest dana (do postizanja 11% SWC), indukovao je povećanje u sadržaju ovog hormona za 65% kod WT, odnosno za 15% kod *flacca*. Svaki sledeći ciklus suše imao je sličan trend akumulacije ABA kod oba genotipa. Nakon drugog ciklusa suše sadržaj ABA u WT listovima uvećao se za 57%, odnosno za 39% kod *flacca*, dok je treći ciklus indukovao ovo povećanje ABA kod WT za 43% i 20% kod *flacca*. Kod biljaka sve tri ponovljene suše bile su praćene periodima rehidracije, u kojima je nivo ABA vraćen na nivo kontrolnih vrednosti kod WT, dok je to kod *flacca* postignuto samo nakon drugog i trećeg ciklusa.



Slika 29. Sadržaj ABA u listovima divljeg tipa i *flacca* mutanta paradajza izloženih trima ciklusima suše (D) praćenih periodom rehidracije u trajanju od tri dana (R) i u optimalno zalivanim biljkama (C). Predstavljene su srednje vrednosti \pm SE ($n \geq 7$). Različita slova predstavljaju statistički značajne razlike između proseka prema Tukey HSD post hoc testu ($p \leq 0,05$).

4.2.2. Efekti primene tri ciklusa suše na provodljivost stoma

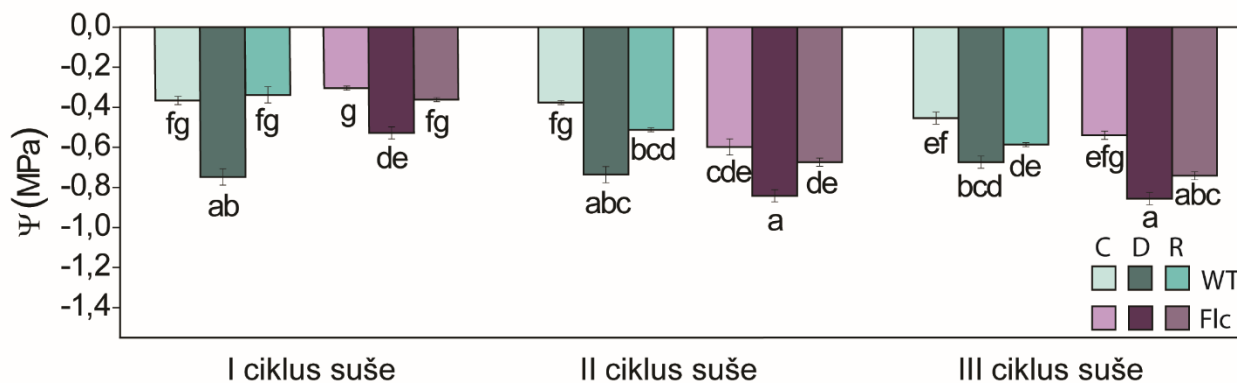
Pri optimalnom sadržaju vode u zemljištu, provodljivost stoma kod *flacca* mutanta bila je značajno veća u odnosu na WT, tokom celokupnog vremena trajanja eksperimenta (slika 30). Najveća razlika u stomatalnoj provodljivosti između genotipova primećena je u periodu trećeg, a najmanja za vreme drugog ciklusa suše (prilog, tabela P8). Kod WT biljaka izlaganje suši uticalo je na smanjenje provodljivosti stoma, pri čemu se primećuje da su dobijene vrednosti bile obrnuto proporcionalne sadržaju ABA. Ova pojava bila je najviše izražena u trećem ciklusu suše. Mnogo manja promena u provodljivosti stoma izazvanih sušom zabeležena je kod mutanta u drugom i trećem ciklusu suše. Međutim, primećuje se da su stome ostvarile najveći stepen zatvaranja tokom prvog perioda rehidracije, naročito kod *flacca*. Tokom drugog i trećeg perioda rehidracije kod WT i *flacca* provodljivost stoma vratila se na nivo koji odgovara vrednostima koje su dobijene za kontrolne biljake.



Slika 30. Provodljivost stoma – g_s u listovima divljeg tipa i *flacca* mutanta paradajza izloženih trima ciklusima suše (D) praćenih periodom rehidracije u trajanju od tri dana (R) i u optimalno zalivanim biljkama (C). Predstavljene su srednje vrednosti \pm SE ($n \geq 7$). Različita slova predstavljaju statistički značajne razlike između proseka prema Tukey HSD post hoc testu ($p \leq 0,05$).

4.2.3. Efekti primene tri ciklusa suše na ukupni vodni potencijal

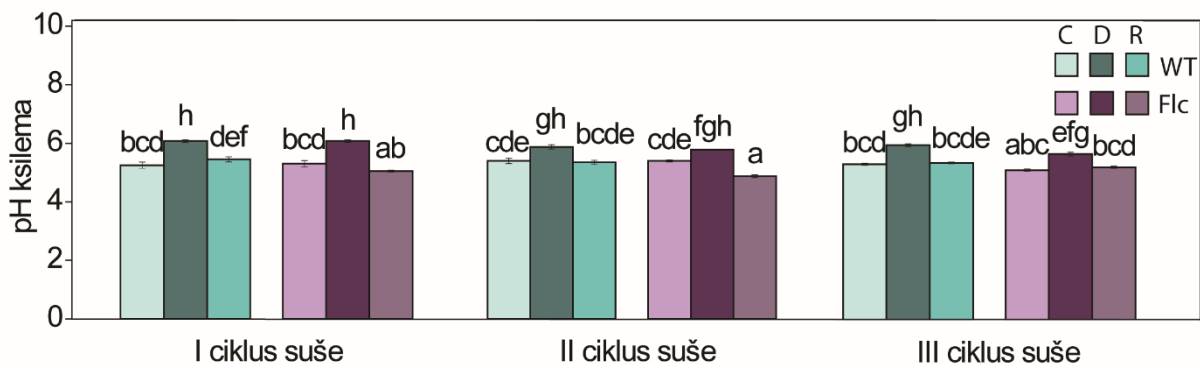
Na slici 31. prikazane su vrednosti ukupnog vodnog potencijala (ψ) izmerenog na listovima biljaka kod WT i *flacca*. Kod optimalno zalivanih biljaka nisu uočene razlike u ukupnom vodnom potencijalu između WT i *flacca* mutanta, ali se primećuje da su WT biljke pri izlaganju prvoj suši dostigle niže vrednosti ψ nego *flacca*. Tokom dva naredna ciklusa suše kod listova oba genotipa došlo je do opadanja ukupnog vodnog potencijala, pri čemu je niža vrednost dobijena kod *flacca*. Nakon perioda rehidracije u trajanju od tri dana vrednosti vodnog potencijala izjednačile su se sa kontrolnim samo u prvom ciklusu suše, dok nakon drugog i trećeg perioda ukupni vodni potencijal teži da dostigne kontrolne vrednosti.



Slika 31. Ukupni vodni potencijal – ψ u listovima divljeg tipa i *flacca* mutanta paradajza izloženih trima ciklusima suše (D) praćenih periodom rehidracije u trajanju od tri dana (R) i u optimalno zalivanim biljakama (C). Predstavljene su srednje vrednosti \pm SE ($n \geq 7$). Različita slova predstavljaju statistički značajne razlike između proseka prema Tukey HSD post hoc testu ($p \leq 0.05$).

4.2.4. Uticaj primene tri ciklusa suše na promenu pH ksilemskog soka

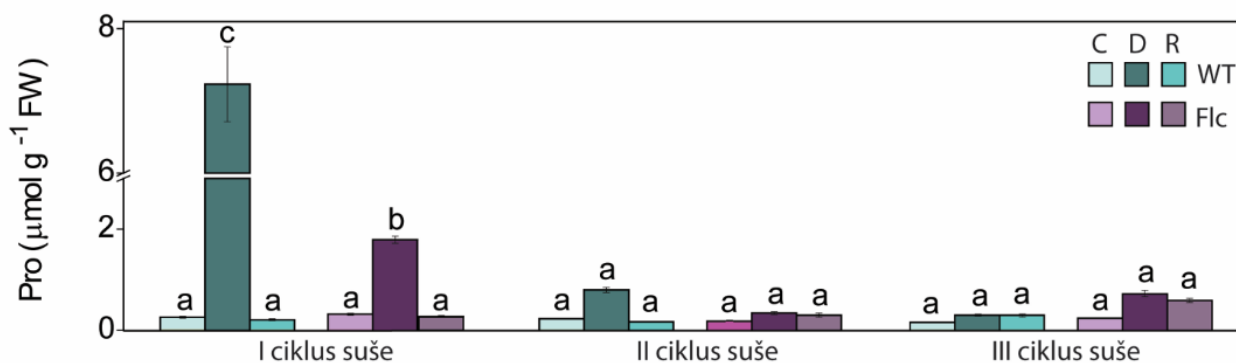
pH vrednosti ksilemskog soka dobijenog iz lisne drške za oba genotipa paradajza prikazane su na slici 32. Prilikom izlaganja biljaka suši, pH vrednost ksilema kod oba genotipa bila je alkalnija u odnosu na kontrolne biljke, dok su biljke nakon rehidracije imale vrednosti slične kontrolnim. Ovakav obrazac alkalizacije i vraćanja na kontrolne pH vrednosti ponovio se u sva tri ciklusa suše kod WT, dok kod *flacca* je došlo do odstupanja od ovog trenda u drugom ciklusu (slika 32).



Slika 32. pH vrednost ksilemskog soka u lisnoj dršci biljaka divljeg tipa i *flacca* mutanta paradajza izloženih trima ciklusima suše (D) praćenih periodom rehidracije u trajanju od tri dana (R) i u optimalno zalivanim biljakama (C). Predstavljene su srednje vrednosti \pm SE ($n \geq 7$). Različita slova predstavljaju statistički značajne razlike između proseka prema Tukey HSD post hoc testu ($p \leq 0.05$).

4.2.5. Uticaj primene tri ciklusa suše na sadržaj prolina

Izlaganje biljaka suši indukovalo je akumulaciju prolina kod oba genotipa, pri čemu je u mnogo većem stepenu to povećanje izraženo kod WT biljaka. Sadržaj prolina u WT povećao se 25 puta u odnosu na optimalno zalivane biljke, dok je u *flacca* mutantu to povećanje iznosilo više od 5 puta. Nakon rehidracije vrednosti prolina su bile slične onima kod kontrolnih biljaka kod oba genotipa. U druga dva ciklusa suše, vrednosti sadržaja prolina nisu se značajno razlikovale od kontrolnih vrednosti. Kao pri delovanju manjeg intenziteta svetlosti, tako i ovde pri većem intenzitetu svetlosti ne postoje konstitutivne razlike u sadržaju prolina između WT i *flacca* koje se nalaze u zemljištu sa optimalnim sadržajem vode (slika 33).

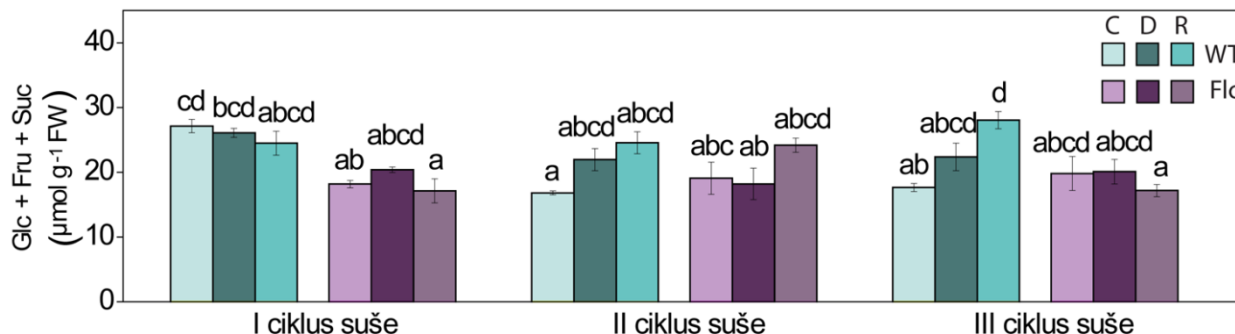


Slika 33. Sadržaj prolina –Pro u listovima divljeg tipa i *flacca* mutanta paradajza izloženih trima ciklusima suše (D) praćenih periodom rehidracije u trajanju od tri dana (R) i u optimalno zalivanim biljakama (C). Predstavljene su srednje vrednosti \pm SE ($n \geq 7$). Različita slova predstavljaju statistički značajne razlike između proseka prema Tukey HSD post hoc testu ($p \leq 0,05$).

4.2.6. Uticaj tri ciklusa suše na sadržaj rastvornih ugljenih hidrata

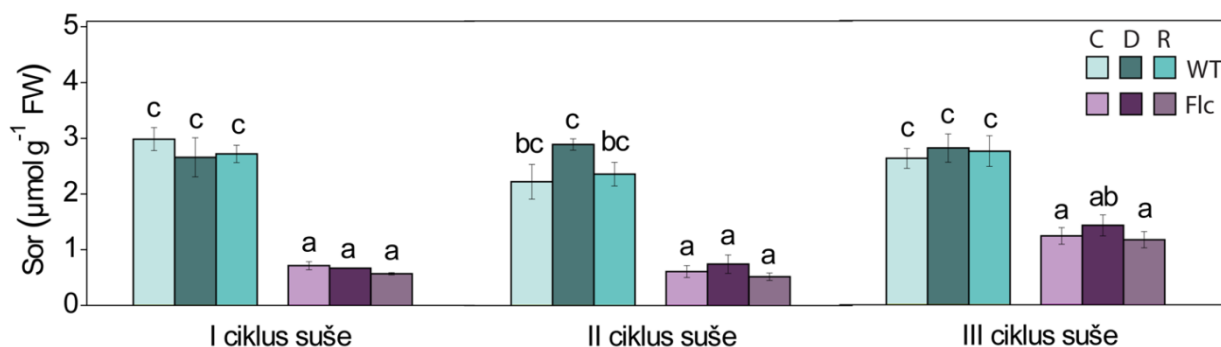
Na slici 34 nalazi se sumarni prikaz sadržaja glukoze, fruktoze i saharoze u listovima divljeg tipa i *flacca*. Na početku eksperimenta uočene su konstitutivne razlike u sadržaju ovih ugljenih hidrata, gde se primećuje da je njihova akumulacija 1,5 puta veća u WT nego u *flacca* biljkama. Sa odmicanjem faze razvoja kod biljaka te razlike se gube između genotipova, ali se smanjuje i sadržaj ova tri šećera u WT kontrolnim biljkama, dok je u *flacca* njihova vrednost

sve vreme konstantna. Sa druge strane, izlaganje WT biljaka suši u prvom ciklusu nije uticalo na promenu u sadržaju ova tri ugljena hidrata, dok se u drugom i trećem ciklusu uočava blagi trend porasta u korist biljaka koje su bile pod uticajem stresa (prilog, tabela P8). U *flacca* mutantu nijedan ciklus suše, kao ni rehidracija nije imala značajniji uticaj na promenu sadržaja ovih ugljenih hidrata (slika 34).



Slika 34. Ukupni sadržaj glukoze, fruktoze i saharoze u listovima divljeg tipa i *flacca* mutanta paradajza izloženih trima ciklusima suše (D) praćenih periodom rehidracije u trajanju od tri dana (R) i u optimalno zalivanim biljkama (C). Predstavljene su srednje vrednosti \pm SE ($n \geq 7$). Različita slova predstavljaju statistički značajne razlike između proseka prema Tukey HSD post hoc testu ($p \leq 0,05$).

Pri gajenju biljaka na višem intenzitetu svetlosti sadržaj sorbitola bio je konstitutivno viši u WT u odnosu na *flacca* mutant, kako u kontrolnim, tako i u uslovima stresa suše u sva tri ciklusa. Takođe, povećani nivo sorbitola kod WT u odnosu na *flacca* uočen je i kod rehidratiranih biljaka. Suša nije značajno indukovala akumulaciju sorbitola u oba genotipa, a nisu primećene značajne promene u rehidratiranim biljkama u odnosu na kontrolne biljke kod oba genotipa (slika 35).



Slika 35. Sadržaj sorbitola u listovima divljeg tipa i *flacca* mutanta paradajza izloženih trima ciklusima suše (D) praćenih periodom rehidracije u trajanju od tri dana (R) i u optimalno zalivanim biljkama (C). Predstavljene su srednje vrednosti \pm SE ($n \geq 7$). Različita slova predstavljaju statistički značajne razlike između proseka prema Tukey HSD post hoc testu ($p \leq 0,05$).

4.2.7. Konstitutivne razlike u sadržaju fenolnih jedinjenja između divljeg tipa i *flacca* mutanta

U tabeli 3 prikazane su vrednosti fenolnih jedinjenja izmerenih u listovima biljaka WT i *flacca* mutanta koje su gajene na svetlosti intenziteta $800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Uopšteno posmatrano, primećuju se konstitutivne razlike u svim ovde prikazanim klasama fenolnih jedinjenja. U

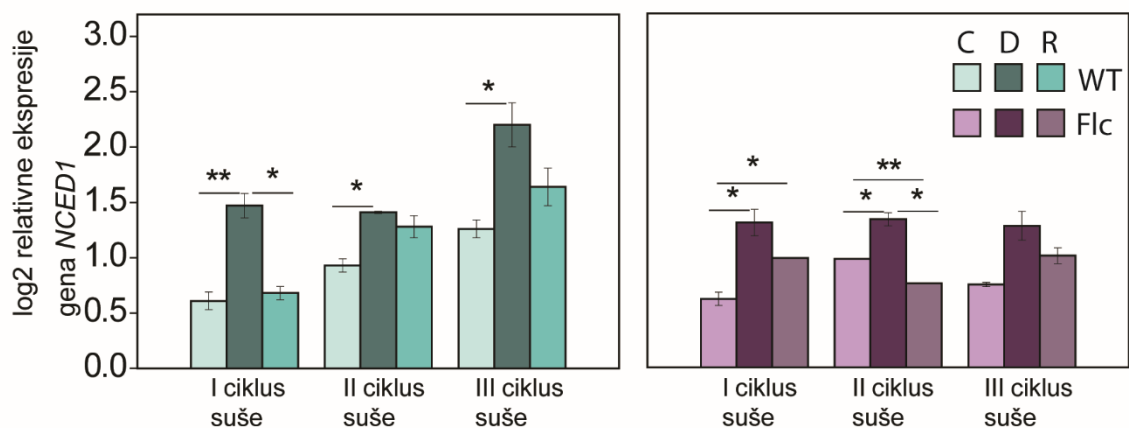
okviru grupe jedinjenja hidroksibenzoevih kiselina (HBA) uočava se njihova smanjena akumulacija u *flacca* za oko tri puta u odnosu na WT (HBA i siringinska kiselina). Sa druge strane, hidroksicimetne kiseline (HCA) pokazale su različiti trend akumulacije kod oba genotipa. Tako je pokazano da je sadržaj hlorogene kiseline (CGA) i njenih derivata dva puta veći u WT biljkama, nego u *flacca*, dok je sadržaj kafeinske kiseline (CA) tri puta veći u WT, nego u mutantu. Međutim, nisu primećene razlike u sadržaju *p*-kumarne kiseline (*p*-CA) i ferulinske kiseline (FA) i njihovih derivata između ova dva genotipa. Što se tiče flavon-3-ola, nisu uočene konstitutivne razlike između WT i *flacca* u sadržaju kampferola (K), dok je sadržaj kvercetina (Q) više od dva puta veći u WT, nego u *flacca*. Gajenje biljaka na intenzitetu ove svetlosti indukovalo je tri puta manju akumulaciju antocijana cijanidina (Cy) u *flacca*, nego u WT.

Tabela 3. Sadržaj fenolnih jedinjenja u listovima WT i *flacca* mutanta paradajza. Predstavljene su srednje vrednosti \pm SE ($n \geq 7$). Zvezdice predstavljaju statistički značajne razlike između WT i *flacca* prema Studentovom t-testu (* $p < 0,05$, *** $p < 0,001$).

Fenolno jedinjenje ($\mu\text{g/g FW}$)	WT	<i>flacca</i>
<i>HBA</i>		
hidroksibenzoevе kiseline (HBA)	0,383 \pm 0,019	0,131 \pm 0,027 ***
siringinska kiselina (SyA)	0,350 \pm 0,013	0,120 \pm 0,025 ***
HBA derivati	0,154 \pm 0,041	0,164 \pm 0,040
<i>HCA</i>		
hlorogena kiselina (CGA)	0,086 \pm 0,012	0,042 \pm 0,009 *
<i>p</i> -kumarna kiselina (<i>p</i> -CA)	0,002 \pm 0,001	0,005 \pm 0,002
kafeinska kiselina (CA)	0,038 \pm 0,003	0,012 \pm 0,003 ***
ferulinska kiselina (FA)	0,007 \pm 0,001	0,004 \pm 0,001
<i>flavon-3-oli</i>		
kvercetin (Q)	0,018 \pm 0,001	0,008 \pm 0,002 ***
kampferol (K)	0,0016 \pm 0,0004	0,0010 \pm 0,0002
<i>antocijani</i>		
cijanidin (Cy)	0,0010 \pm 0,0001	0,0003 \pm 0,00007 *

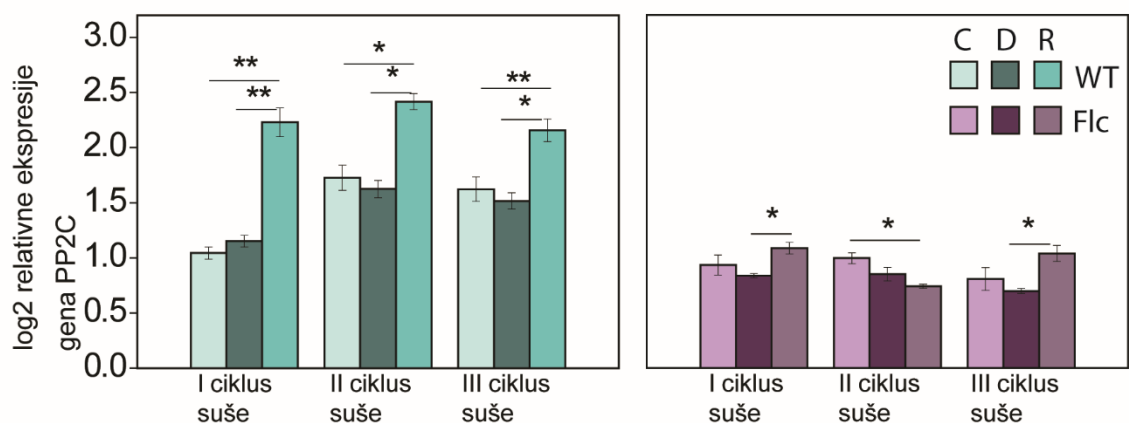
4.2.8. Uticaj tri ciklusa suše na ekspresiju gena odovornih za sintezu ABA i transdukciju signala

Izlaganje biljaka suši u sva tri ciklusa indukovalo je povišenu ekspresiju *NCED1* gena kod oba genotipa, pri čemu je taj nivo ekspresije bio mnogo više izražen kod WT biljaka, nego kod *flacca* mutanta (slika 36). Najizraženije vrednosti za ekspresiju *NCED1* kod WT dobijene su u suši u trećem ciklusu, gde su dobijene vrednosti relativne ekspresije bile četiri puta veće nego u kontrolnim biljkama u prvom ciklusu. Takođe, progresivni porast ekspresije *NCED1* gena u rehidratiranim biljkama u svakom sledećem ciklusu suše zabeležen je kod WT biljaka, ali ne i kod *flacca* mutanta (slika 36).



Slika 36. Ekspresija *NCED1* gena u listovima divljeg tipa i *flacca* mutanta paradajza izloženih trima ciklusima suše (D) praćenih periodom rehidracije u trajanju od tri dana (R) i u optimalno zalivanim biljkama (C). Relativna ekspresija gena dobijena je pomoću qRT PCR, normalizovana na hauskiping gen i izračunata u odnosu na WT start kontrolu. Predstavljene su srednje vrednosti \pm SE ($n \geq 4$). Zvezdice predstavljaju statistički značajne razlike između kontrola, biljaka u suši i rehidratiranih biljaka unutar svakog genotipa i u svakom ciklusu pojedinačno prema Welch t-testu (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).

Ekspresija *PP2C* gena kod WT je povećana jedino u rehidratiranim biljkama u svakom ciklusu u odnosu na sušu i optimalno zalivane biljke. Sa druge strane, nisu uočene razlike u nivou ekspresije *PP2C* između kontrolnih i biljaka u suši. Kod mutanta u prvom i trećem ciklusu se primećuje povećana ekspresija *PP2C* u rehidratiranim biljkama u odnosu na biljke iz suše, dok u drugom ciklusu uočava se snižena ekspresija kod rehidratiranih u odnosu na biljke na koje je delovao stres suše (slika 37).



Slika 37. Ekspresija *PP2C* gena u listovima divljeg tipa i *flacca* mutanta paradajza izloženih trima ciklusima suše (D) praćenih periodom rehidracije u trajanju od tri dana (R) i u optimalno zalivanim biljkama (C). Relativna ekspresija gena dobijena je pomoću qRT PCR, normalizovana na hauskiping gen i izračunata u odnosu na WT start kontrolu. Predstavljene su srednje vrednosti \pm SE ($n \geq 4$). Zvezdice predstavljaju statistički značajne razlike između kontrola, biljaka u suši i rehidratiranih biljaka unutar svakog genotipa i u svakom ciklusu pojedinačno prema Welch t-testu (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).

4.2.9. Produženi oporavak nakon jednog i tri ciklusa suše

4.2.9.1. Efekat produženog oporavka nakon prve suše i oporavka nakon treće suše na parametre rasta kod divljeg tipa paradajza i *flacca* mutanta gajenih na svetlosti intenziteta 800 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$

U cilju ispitivanja efekta ponovljenih ciklusa suše i produženog oporavka na rastenje biljaka i razvijanje kratkotrajne memorije, u ovom delu eksperimentalnog rada su praćeni morfološki parametri na kraju vegetativne faze kod tri grupe biljaka. Prvu grupu činile su kontrolne biljke (C) koje su optimalno zalivane tokom tajanja eksperimenta. U drugoj grupi nalazile su se biljke koje su bile izložene samo jednom ciklusu suše, a zatim su optimalno zalivane u narednih 15 dana do kraja eksperimenta (R_1). U trećoj grupi nalazile su se biljke koje su bile izložene delovanju tri ciklusa suše (R_3).

Ako se posmatra kao izolovani događaj, vodni deficit koji je bio praćen rehidratacijom narednih 15 dana uticao je na porast sveže mase i lisne površine kod oba genotipa, ali sa većim efektom kod *flacca* mutanta, nego kod biljaka divljeg tipa (tabela 4).

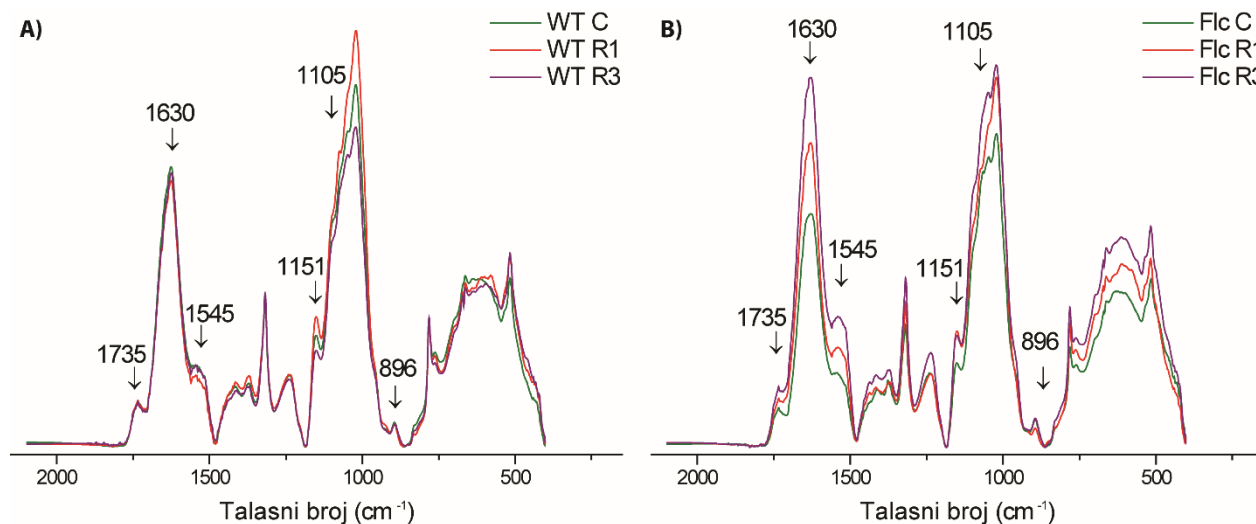
Tabela 4. Sveža (FW) i suva masa (DW) listova, stabala i celih biljaka, lisna površina (LA) i specifična lisna površina (SLA) kod WT i *flacca* mutanta paradajza na kraju eksperimenta. R_1 predstavlja biljke koje su bile izložene jednom ciklusu suše, a zatim optimalno zalivane narednih 15 dana. R_3 označava oporavljene biljke na kraju trećeg ciklusa suše, dok C označava kontrolne biljke. Predstavljene su srednje vrednosti \pm SE ($n \geq 4$). Različita slova predstavljaju statistički značajne razlike između proseka prema Tukey HSD post hoc testu ($p \leq 0,05$) za svaki genotip pojedinačno u svakom ciklusu.

WT			
	C	R_1	R_3
Listovi FW (g)	31,86 \pm 0,94 b	40,75 \pm 1,97 c	19,89 \pm 1,63 a
Stablo FW (g)	26,14 \pm 0,59 ab	23,84 \pm 2,63 a	33,47 \pm 1,65 b
Cela biljka FW (g)	58,01 \pm 1,53 a	64,59 \pm 4,60 a	53,37 \pm 3,3 a
Listovi DW (g)	2,08 \pm 0,02 b	2,36 \pm 0,05 c	1,63 \pm 0,07 a
Stablo DW (g)	2,10 \pm 0,06 a	2,17 \pm 0,30 a	1,70 \pm 0,19 a
Cela biljka DW (g)	5,78 \pm 0,11 ab	6,09 \pm 0,41 b	4,50 \pm 0,36 a
LA (cm ²)	1019,9 \pm 63,1 ab	1137,9 \pm 5,9 b	880,8 \pm 13,9 a
SLA (cm ² g ⁻¹ DW)	490,6 \pm 26,8 a	483,2 \pm 7,7 a	541,5 \pm 16,1 a
<i>flacca</i>			
	C	R_1	R_3
Listovi FW (g)	27,26 \pm 0,63 a	38,49 \pm 2,07 b	27,08 \pm 3,69 a
Stablo FW (g)	15,84 \pm 0,60 b	15,55 \pm 0,71 ab	13,01 \pm 0,50 a
Cela biljka FW (g)	43,10 \pm 0,1 ab	54,1 \pm 1,6 b	40,1 \pm 4,2 a
Listovi DW (g)	1,13 \pm 0,01 a	2,23 \pm 0,01 b	1,97 \pm 0,16 b
Stablo DW (g)	1,05 \pm 0,02 a	1,56 \pm 0,01 b	0,88 \pm 0,09 a
Cela biljka DW (g)	2,91 \pm 0,01 a	5,28 \pm 0,02 b	4,16 \pm 0,46 b
LA (cm ²)	630,1 \pm 3,8 a	963,9 \pm 8,7 b	544,1 \pm 41,7 a
SLA (cm ² g ⁻¹ DW)	557,7 \pm 3,8 c	433,1 \pm 3,2 b	276,7 \pm 1,1 a

Povećanje sveže mase bilo je praćeno i sa dva puta povećanom suvom masom kod *flacca*, kao i redukcijom SLA za 30%, dok kod WT te promene nisu uočene. Takođe, kod *flacca* mutanta u tretmanu R₁ zabeležen je i porast suve mase stabljika za 40%. Kod *flacca* koje su iskusile tri ciklusa suše vrednosti za svežu masu listova, kao i cele biljke bile su slične vrednostima kod kontrolnih biljaka, dok su suve mase listova i celih biljaka bile uvećane gotovo dva puta u odnosu na kontrolu. Međutim, na račun povećanja suve mase listova došlo je do smanjenja SLA za polovinu u odnosu na optimalno zalivane biljke. Upoređujući odnos suve mase za tretman R₁ i R₃ kod *flacca* primećuje se blagi porast u korist R₁, što je praćeno i većom SLA. WT biljke nakon tri ciklusa suše imale su smanjenu masu listova, ali i blagi porast sveže biomase u odnosu na C i R₁ (tabela 4).

4.2.9.2. Efekat produženog oporavka nakon prve i treće suše na sastav ćelijskog zida kod divljeg tipa paradajza i *flacca* mutanta

Sastav ćelijskih zidova listova WT i *flacca* mutanta paradajza u C, R₁ i R₃ tretmanu analiziran je primenom FTIR spektroskopije i to u opsegu od 800 – 1800 cm⁻¹ (slika 38). Trake koje su karakteristične za celulozu, kao što je simetrična CH₂ vibracija na 1370 cm⁻¹, deformaciona CH₂ klanjajuća na 1317 cm⁻¹, O–C–O asimetrična istežuća glikozilna vibracija na 1151 cm⁻¹ i C–O istežuća vibracija na 1105 cm⁻¹ pronađene su u svim uzorcima ćelijskih zidova. U uzorcima su detektovane i sledeće trake na: 1735 cm⁻¹ (C = O istežuća vibracija od alkil estara), 1635 cm⁻¹ (COO– antisimetrična istežuća vibracija od poligalakturonskih kiselina), 1420 cm⁻¹ (COO istežuća), 1240 cm⁻¹ (C–O istežuća) i one su karakteristične za pektine, dok su trake na 1517 cm⁻¹ karakteristične za lignin. Detektovane su i trake na 1147 cm⁻¹ (O–C–O asimetrična istežuća vibracija vezana za glikozilne ostatke) i 1071 cm⁻¹ (C–O i C–C istežuća) koje su tipične za ksiloglukane, dok je traka na 896 cm⁻¹ karakteristična za celulozu, hemicelulozu i pektin.

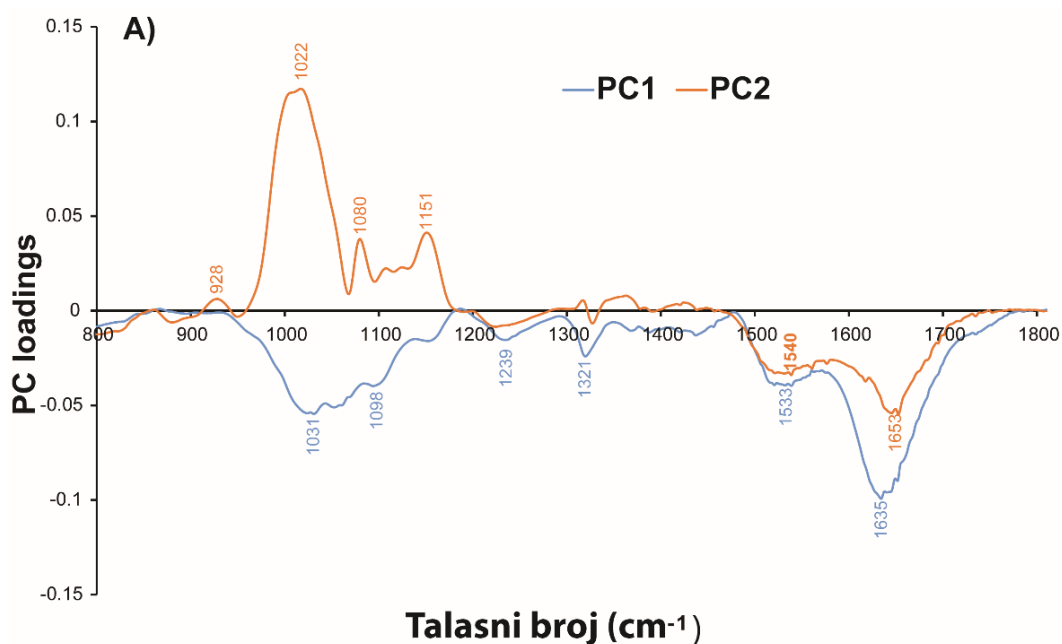


Slika 38. FTIR spektri ćelijskih zidova A) WT i B) *flacca* (Flc) listova paradajza na kraju eksperimenta. R1 predstavlja biljke koje su bile izložene jednom ciklusu suše a zatim optimalno zalivane narednih 15 dana. R3 predstavlja biljke koje su 3 dana oporavljene nakon 3 ciklusa suše, dok C predstavlja kontrolne biljke.

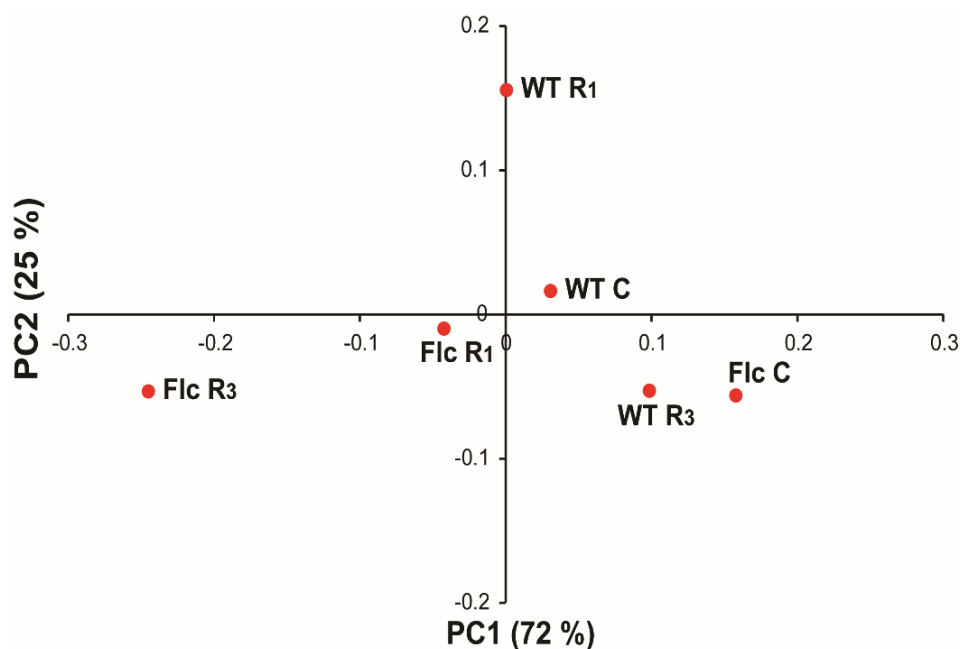
Rezultati koji su dobijeni FTIR spektroskopijom, a koji govore o uticaju prolongiranog oporavka nakon jednog, odnosno tri ciklusa suše na sadržaj pojedinih komponenti ćelijskog zida u listovima WT i *flacca* mutanta paradajza analizirani su pomoću analize glavnih

komponentata (PCA). PCA je primenjena u analizi spektralnih regiona u opsegu 800 –1800 cm^{-1} , gde je prva komponenta PC1 obuhvatala 72%, a druga PC2 je obuhvatala 25% od ukupnog varijabiliteta (slike 39 i 40). Kumulativna varijansa je objašnjena pomoću prve dve komponente i iznosila je 97%. PC1 negativno je korelirala sa sledećim talasnim brojevima: 1031 cm^{-1} , 1098 cm^{-1} , 1239 cm^{-1} , 1321 cm^{-1} , 1533 cm^{-1} and 1635 cm^{-1} . PC2 je pozitivno korelirala sa talasnim brojevima 928 cm^{-1} , 1022 cm^{-1} , 1080 cm^{-1} , 1151 cm^{-1} , a negativno sa 1540 cm^{-1} i 1653 cm^{-1} . Na osnovu vrednosti skorova i doprinosa u PC2 pokazano je da apsorpcione trake karakteristične za celulozu i ksilogukan su najintenzivnije kod WT u R1 tretmanu, u poređenju sa WT u R3 i odgovarajućom kontrolom. Sa druge strane, intenziteti traka na 1540 cm^{-1} i 1635 cm^{-1} (asignacija za pektin i proteine) negativno su korelirali sa PC2. Na osnovu rezultata i doprinosa za PC1, trake karakteristične za celulozu, pektin i lignin bile su najdominantnije kod *flacca* u R3 tretmanu, a manje kod kontrolnih biljaka. Na osnovu dobijenih rezultata primećuje se da *flacca* biljke nakon tri ciklusa suše imaju povišeni nivo celuloze, pektina i lignina u odnosu na R1 tretman i kontrolne biljke.

Na osnovu analize FTIR spektara može se primetiti da sadržaj pektina u biljkama divljeg tipa ostaje nepromenjen nakon produženog oporavka, odnosno tri ciklusa suše. Sa druge strane, kod *flacca* je suša uzrokovala akumulaciju pektina, pre svega u listovima biljaka nakon tri ciklusa suše. Kod WT biljaka relativni intenzitet traka karakterističnih za celulozu i ksiloglukan bio je najveći u uzorcima iz produženog oporavka, a takođe, bio je povišen i u biljkama nakon tri sušne epizode u odnosu na kontrolne biljke. Nasuprot tome, kod *flacca* biljaka tri ciklusa suše uzrokovala su najveću akumulaciju celuloze, hemiceluloze i klisoglukana, dok je u produženom oporavku uočen njihov blagi porast u odnosu na kontrolne biljke.



Slika 39. Grafički prikaz opterećenja (eng. *loading*) za prve dve komponente dobijene analizom FTIR spektara u regionu 800–1800 cm^{-1} za uzorke listova paradajza.



Slika 40. Grafički prikaz skorova za prve dve komponente dobijene analizom FTIR spektara u regionu 800–1800 cm^{-1} za uzorke listova paradajza.

4.3. Uticaj različitog intenziteta svetlosti i ciklusa suše na fiziološke i metaboličke promene kod divljeg tipa paradajza i *flacca* mutanta

U ovom poglavlju pristupilo se analizi rezultata sa ciljem ispitivanja da li ciklusi suše praćeni rehidracijom dovode do pojave kratkotrajne memorije na različitim intenzitetima svetlosti. S tim u vezi analiziran je sadržaj ukupnog askorbata i njegovo redoks stanje kod biljaka koje su iskusile tri ciklusa suše, a koje su gajene pri intezitetima svetlosti od $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ i $800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Između ostalog, urađena je i analiza nekodirajućih RNK fragmenata (nkRNK) veličine 30–300 nukleotida, radi praćenja uticaja svetlosti i ponovljene suše na njihov profil kod ova dva genotipa.

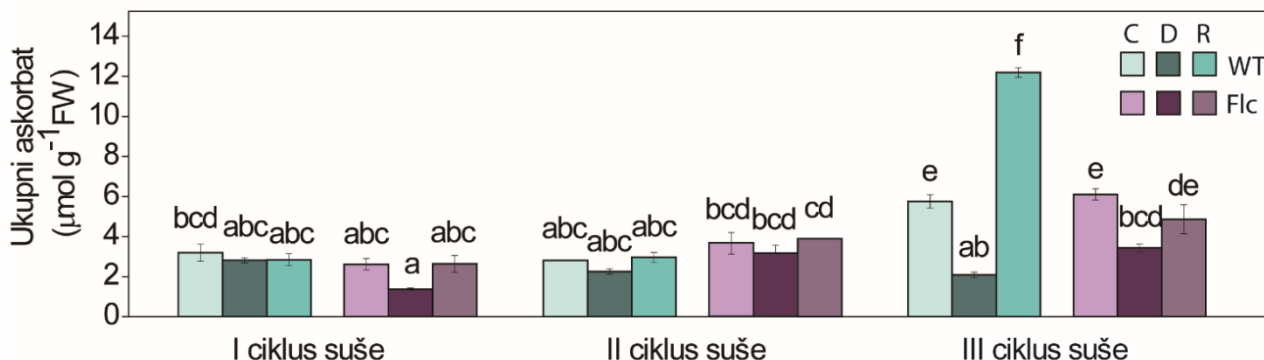
Takođe, u okviru ovog poglavlja prikazane su vrednosti sadržaja hlorofila, epidermalnih flavonoida, antocijana, kao i azotni indeks (NBI) izmeren na listovima oba genotipa.

4.3.1. Efekat različitog inteziteta svetlosti i ciklusa suše na sadržaj ukupnog askorbata i njegovo redoks stanje u listovima paradajza

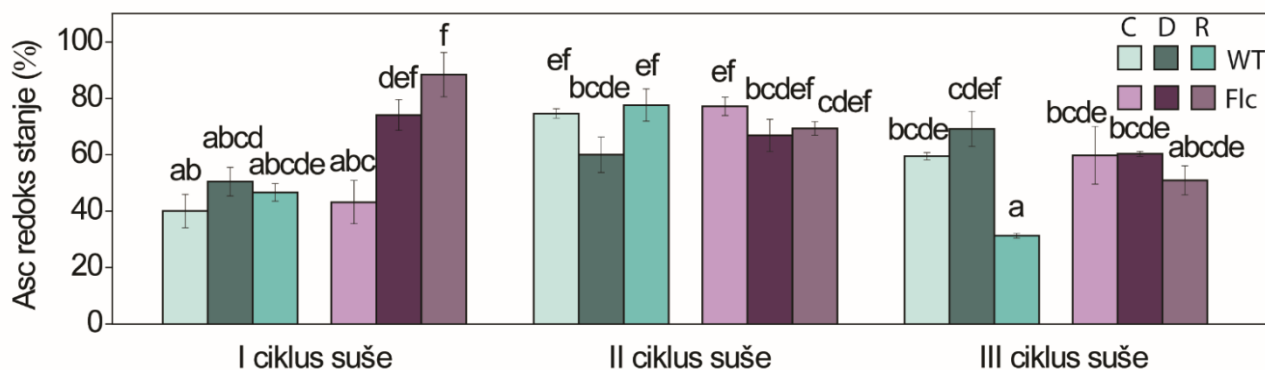
Na slikama 41 i 42 prikazane su vrednosti ukupnog askorbata i njegovo redoks stanje kod biljaka divljeg tipa i *flacca* mutanta koje su bile izlagane trima ciklusima suše na intenzitetu svetlosti $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Primećuje se da u WT biljkama stres suše nije doveo do akumulacije ukupnog askorbata kod biljkama u prva dva ciklusa, odnosno ne postoje statistički značajne promene u njegovoj koncentraciji između kontrolnih, biljaka nakon suše i rehidratiranih biljaka. Međutim, u trećem ciklusu stres suše je izazvao smanjenje ukupnog askorbata u odnosu na kontrolu, dok je rehidracija indukovala njegovu povećanu akumulaciju (slika 41). Dok u prvom ciklusu suše nema promena u redoks stanju askorbata kod WT, u drugom se primećuje njegovo blago opadanje u odnosu na kontrolne i

rehidratirane biljke, ali bez statističke značajnosti. Sa druge strane, u trećem ciklusu suše vrednost za redoks stanje askorbata u rehidratiranim biljkama značajno opada u odnosu na kontrolne i biljke u suši, što ukazuje na povećane vrednosti oksidovanog askorbata (slika 42).

U *flacca* mutantu konstitutivni nivo ukupnog askorbata sličan je onom koji je dobijen kod WT optimalno zalivanih biljaka u sva tri ciklusa. Međutim, primećuje se blago opadanje njegovog sadržaja kod biljaka u suši, naročito u trećem ciklusu, dok su nivoi askorbata kod rehidratiranih biljaka ujednačeni sa kontrolnim vrednostima (slika 41). Povećano redoks stanje askorbata kod biljaka u suši uočava se samo u prvom ciklusu, dok kod ostala dva ciklusa nema bitnijih promena u odnosu na kontrolne i rehidratirane biljke (slika 42).



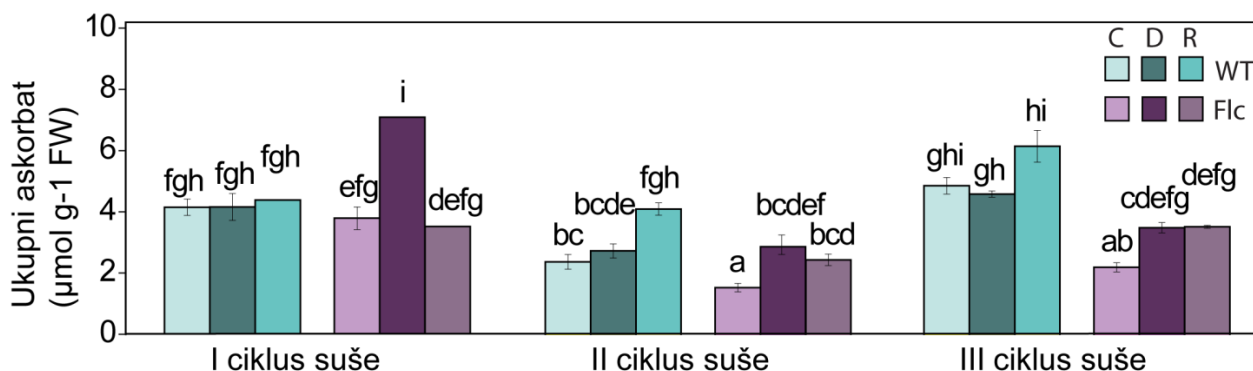
Slika 41. Sadržaj ukupnog askorbata u listovima divljeg tipa i *flacca* mutanta paradajza izloženih trima ciklusima suše (D) praćenih periodom rehidratacije u trajanju od tri dana (R) i u optimalno zalivanim biljkama (C) gajenim na intenzitetu svetlosti 250 µmol m⁻² s⁻¹. Predstavljene su srednje vrednosti ± SE (n≥7). Različita slova predstavljaju statistički značajne razlike između proseka prema Tukey HSD post hoc testu ($p \leq 0.05$).



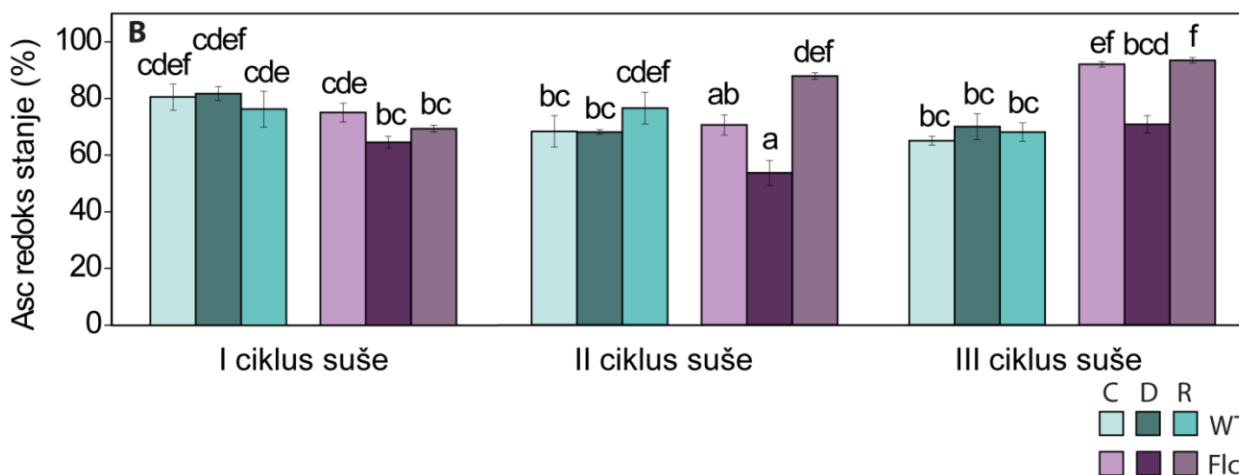
Slika 42. Redoks stanje askorbata u listovima divljeg tipa i *flacca* mutanta paradajza izloženih trima ciklusima suše (D) praćenih periodom rehidratacije u trajanju od tri dana (R) i u optimalno zalivanim biljkama (C) gajenim na intenzitetu svetlosti 250 µmol m⁻² s⁻¹. Predstavljene su srednje vrednosti ± SE (n≥7). Različita slova predstavljaju statistički značajne razlike između proseka prema Tukey HSD post hoc testu ($p \leq 0.05$).

Prilikom gajenja biljaka na svetlosti intenziteta 800 µmol m⁻² s⁻¹ sadržaj ukupnog askorbata kod biljaka u suši u sva tri ciklusa bio je povišen jedino kod *flacca* mutanta, dok je u WT bio nepromenjen (slika 43). Kod mutanta je najveći zabeležen porast askorbata indukovano sušom u prvom ciklusu, a praćen je najvećim padom tokom rehidratacije. Sa druge strane, u sledeća dva ciklusa suše, nivo ukupnog askorbata u rehidratiranim biljkama bio je veoma sličan nivou kao kod biljaka u suši, odnosno nije opao na kontrolne vrednosti. Nivo askorbata kod WT biljaka nakon rehidratacije bio je značajno povećan u odnosu na sušu i

kontrolu u drugom i trećem ciklusu, dok je u prvom bio sličan kontrolnim i vrednostima za sušu (C_D). U svakom ciklusu vrednosti askorbata između WT i mutanta su imale drugačiji trend. U prvom ciklusu suše konstitutivne vrednosti askorbata između genotipova nisu se razlikovale, dok su u drugom i trećem ciklusu bile snižene kod *flacca* za 30–50% u odnosu na WT (slika 43). Redoks stanje askorbata u WT biljkama bilo je nepromenjeno u sva tri ciklusa, dok se kod *flacca* uočava njegovo opadanje u suši tokom sva tri ciklusa, a u odnosu na kontrolne i rehidratirane biljke (slika 44).



Slika 43. Sadržaj ukupnog askorbata u listovima divljeg tipa i *flacca* mutanta paradajza izloženih trima ciklusima suše (D) praćenih periodom rehidratacije u trajanju od tri dana (R) i u optimalno zalivanim biljkama (C) gajenim na intenzitetu svetlosti $800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Predstavljene su srednje vrednosti \pm SE ($n \geq 7$). Različita slova predstavljaju statistički značajne razlike između proseka prema Tukey HSD post hoc testu ($p \leq 0.05$).

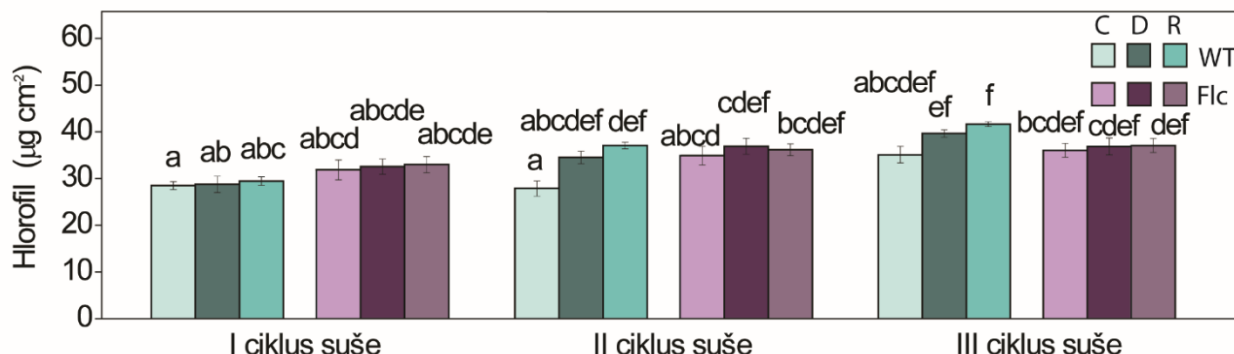


Slika 44. Sadržaj ukupnog askorbata i njegovo redoks stanje u listovima divljeg tipa i *flacca* mutanta paradajza izloženih trima ciklusima suše (D) praćenih periodom rehidratacije u trajanju od tri dana (R) i u optimalno zalivanim biljkama (C) gajenim na intenzitetu svetlosti $800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Predstavljene su srednje vrednosti \pm SE ($n \geq 7$). Različita slova predstavljaju statistički značajne razlike između proseka prema Tukey HSD post hoc testu ($p \leq 0.05$).

4.3.2. Efekat različitog inteziteta svetlosti i ciklusa suše na sadržaj hlorofila u listovima paradajza

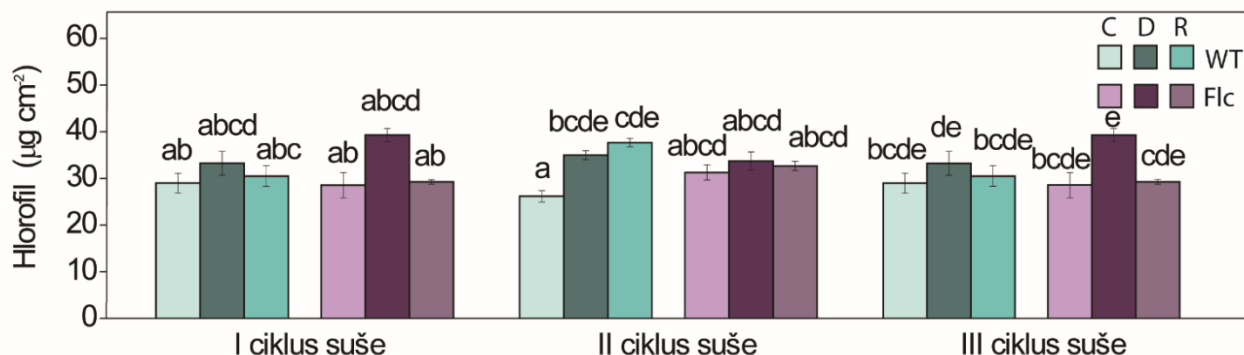
Izlaganje biljaka oba genotipa ciklusima suše pri intenzitetu svetlosti $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ nije uticalo na sadržaj hlorofila u listovima (slika 45). Takođe, nisu primećene ni konstitutivne razlike u sadržaju hlorofila između divljeg tipa i *flacca* mutanta kod optimalno zalivanih

biljaka tokom trajanja eksperimenta. Jedina promena u nivou hlorofila koja se uočava je kod WT u trećem ciklusu, gde biljke pokazuju neznatno više vrednosti u odnosu na one iz prve i druge suše. Takođe, nivo hlorofila kod rehidratisanih biljaka se povećava sa sledećim ciklusom (prilog, tabela P11). Sa druge strane, nivo hlorofila kod *flacca* održava se konstantnim tokom sva tri ciklusa kod svim tretmanima.



Slika 45. Sadržaj hlorofila u listovima divljeg tipa i *flacca* mutanta paradajza izloženih trima ciklusima suše (D) praćenih periodom rehidracije u trajanju od tri dana (R) i u optimalno zalivanim biljkama (C) gajenim na intenzitetu svetlosti $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Predstavljene su srednje vrednosti \pm SE ($n \geq 7$). Različita slova predstavljaju statistički značajne razlike između proseka prema Tukey HSD post hoc testu ($p \leq 0.05$).

Prilikom izlaganja biljaka ciklusima suše na intenzitetu svetlosti $800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ nivo hlorofila je bio sličan između biljaka divljeg tipa i *flacca* mutanta (slika 46). Što se tiče WT biljaka, najznačajnija promena uočava se u drugom ciklusu gde biljke nakon suše i rehidracije imaju 30 i 40% veći sadržaj hlorofila, u odnosu na onaj kod kontrolnih biljaka. Kod *flacca* u prvom i trećem ciklusu suše uočava se blago povećanje sadržaja hlorofila u suši, a u odnosu na kontrolne i rehidratisane biljke.

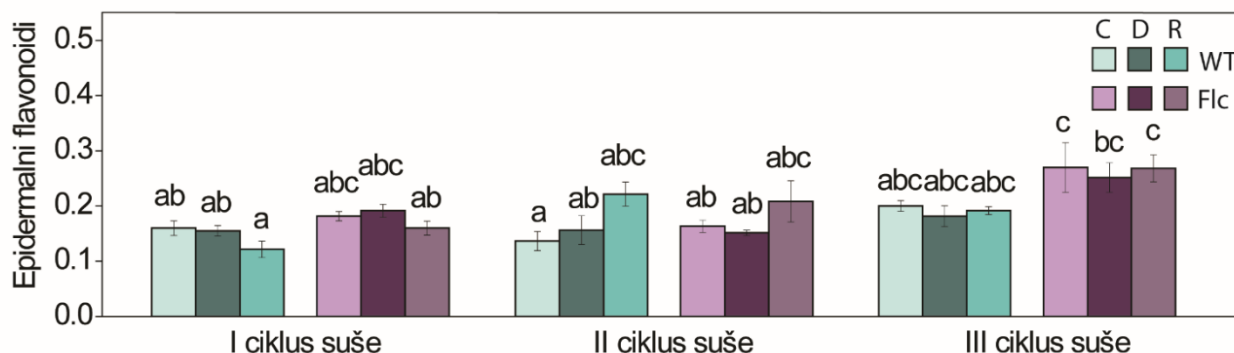


Slika 46. Sadržaj hlorofila u listovima divljeg tipa i *flacca* mutanta paradajza izloženih trima ciklusima suše (D) praćenih periodom rehidracije u trajanju od tri dana (R) i u optimalno zalivanim biljkama (C) gajenim na intenzitetu svetlosti $800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Predstavljene su srednje vrednosti \pm SE ($n \geq 7$). Različita slova predstavljaju statistički značajne razlike između proseka prema Tukey HSD post hoc testu ($p \leq 0.05$).

4.3.3. Efekat različitog inteziteta svetlosti i ciklusa suše na sadržaj epidermalnih flavonoida

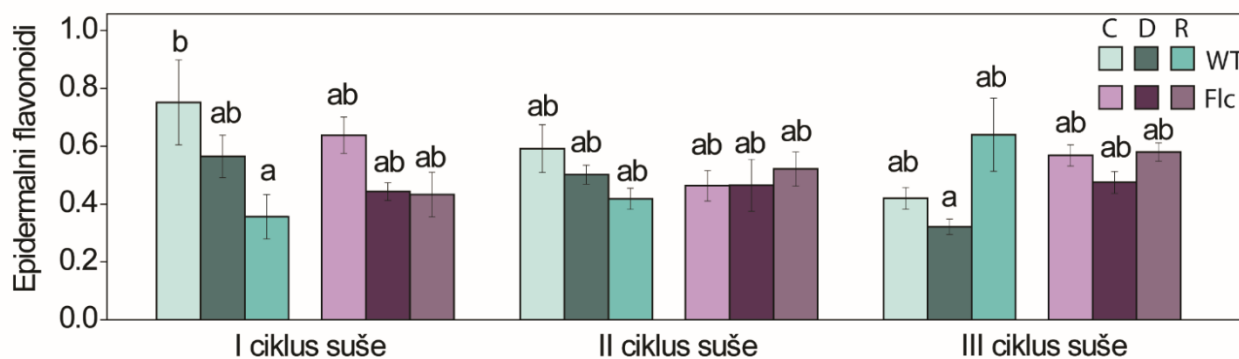
Na slici 47 prikazan je sadržaj epidermalnih flavonoida u listovima divljeg tipa paradajza i *flacca* mutanta gajenih na intenzitetu svetlosti $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Kod optimalno zalivanih biljaka primećuje se veći sadržaj epidermalnih flavonoida u listovima *flacca* u

odnosu na WT (prilog, efekat genotipa $p = 0,0452$). Takođe, uočavaju se razlike u akumulaciji epidermalnih flavonoida u suši između genotipova. Kod *flacca* u prvoj i trećoj suši postignuta je veća akumulacija nego kod WT, dok se u drugoj suši ne uočavaju promene. Takođe, rehidracija je izazvala promene u sadržaju epidermalnih flavonoida između genotipova samo u prvom i trećem ciklusu (prilog, tabela P12, efekat tretmana $p = 0,000509$).



Slika 47. Sadržaj epidermalnih flavonoida u listovima divljeg tipa i *flacca* mutanta paradajza izloženih trima ciklusima suše (D) praćenih periodom rehidracije u trajanju od tri dana (R) i u optimalno zalivanim biljakama (C) gajenim na intenzitetu svetlosti $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Predstavljene su srednje vrednosti \pm SE ($n \geq 7$). Različita slova predstavljaju statistički značajne razlike između proseka prema Tukey HSD post hoc testu ($p \leq 0.05$).

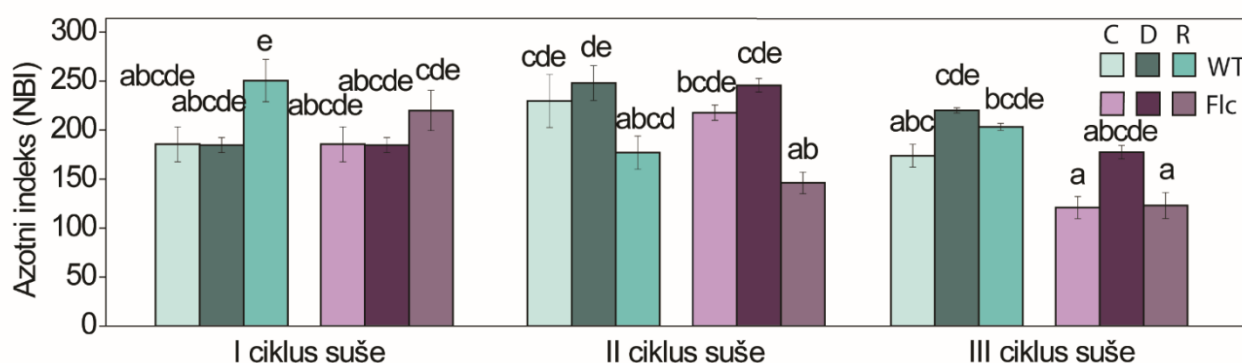
Kod biljaka gajenih pri intenzitetu svetlosti $800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ne uočavaju se konstitutivne razlike između genotipova u kontrolnim uslovima (slika 48). Međutim, u sva tri ciklusa suše kod WT, odnosno u prvom i trećem ciklusu kod *flacca* mutanta uočava se blago opadanje u akumulacija epidermalnih flavonoida u odnosu na odgovarajuće kontrole (prilog, tabela P12, efekat tretmana $p = 0,0227$). Nakon rehidracije, do opadanja u sadržaju epidermalnih flavonoida kod WT dolazi u prvom i drugom ciklusu, a do povećanja u odnosu na kontrolu i sušu u trećem ciklusu. Što se tiče *flacca*, rehidracija nije bitno promenila akumulaciju epidermalnih flavonoida u odnosu na biljke koje su bile izložene suši (slika 48).



Slika 48. Sadržaj epidermalnih flavonoida u listovima divljeg tipa i *flacca* mutanta paradajza izloženih trima ciklusima suše (D) praćenih periodom rehidracije u trajanju od tri dana (R) i u optimalno zalivanim biljakama (C) gajenim na intenzitetu svetlosti $800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Predstavljene su srednje vrednosti \pm SE ($n \geq 7$). Različita slova predstavljaju statistički značajne razlike između proseka prema Tukey HSD post hoc testu ($p \leq 0.05$).

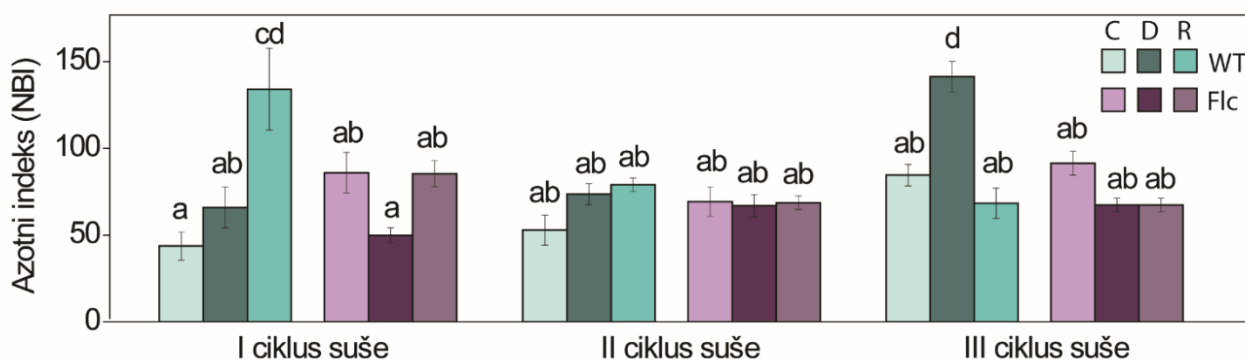
4.3.4. Efekat različitiog inteziteta svetlosti i ciklusa suše na azotni indeks (NBI)

Azotni indeks kod optimalno zalivanih biljaka menjao se kod oba genotipa tokom vegetativnog razvoja pri intenzitetu svetlosti $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (slika 49). Tako NBI u kontrolnim uslovima u prvom i trećem ciklusu kod WT pokazuje slične vrednosti, dok su u drugom ciklusu te vrednosti blago povišene (prilog, tabela P14, efekat ciklusa $p=0,000008$). Kod optimalno zalivanih *flacca* biljaka uočava se blagi porast azotnog indeksa u drugom kao i blagi pad u trećem, u odnosu na biljke iz prvog, odnosno prvog i drugog ciklusa. Efekat tretmana suše kod WT biljaka primetan je samo u trećem ciklusu gde dolazi do porasta vrednosti NBI, dok je rehidracija pozitivno dejstvo iskazala u prvom u trećem ciklusu. Kod *flacca* mutanta jedino u trećem ciklusu suše dolazi do porasta NBI, takođe u odnosu na sušu je zabeležen pad azotnog indeksa nakon rehidracije u drugom i trećem ciklusu.



Slika 49. Azotni indeks (NBI) u listovima divljeg tipa paradajza i *flacca* mutanta izloženih trima ciklusima suše (D) praćenih periodom rehidracije u trajanju od tri dana (R) i u optimalno zalivanim biljakama (C) gajenim na intenzitetu svetlosti $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Predstavljene su srednje vrednosti \pm SE ($n \geq 7$). Različita slova predstavljaju statistički značajne razlike između proseka prema Tukey HSD post hoc testu ($p \leq 0.05$).

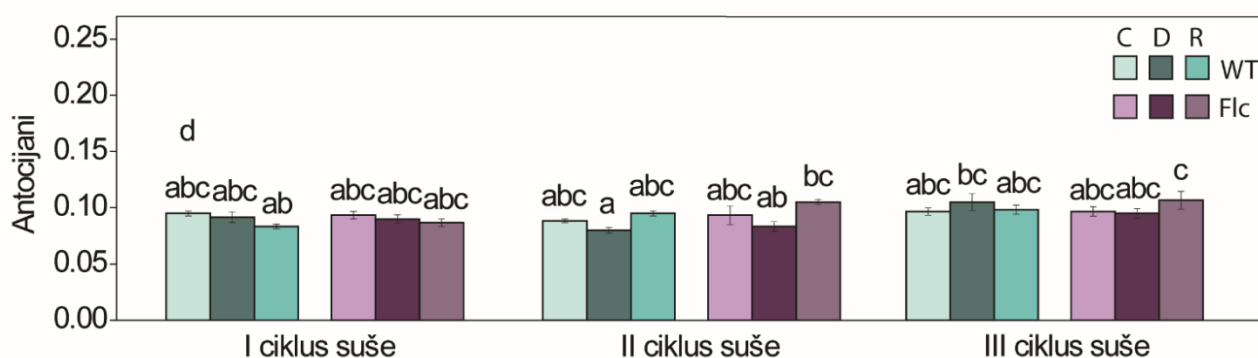
Vrednosti azotnog indeksa (NBI) kod biljaka oba genotipa gajenih na intenzitetu svetlosti od $800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ prikazane su na slici 50. Kod WT biljaka, za razliku od *flacca*, suša je u sva tri ciklusa indukovala povećanje azotnog indeksa u odnosu na kontrolne biljke (prilog, efekat tretmana $p=0,000082$). Uticaj rehidracije kod oba genotipa bio je takav da je u prvom ciklusu vrednost azotnog indeksa bila povećana u odnosu na kontrolne i biljke u suši. Tokom trećeg ciklusa ove vrednosti su opale kod WT u odnosu na kontrolu i sušu, a kod *flacca* samo u odnosu na kontrolu. U drugom ciklusu vrednosti NBI nakon rehidracije kod oba genotipa bile su slične onim koje su dobijene kod biljaka u suši (prilog, tabela P14, efekat genotip x ciklus x tetman $p=0,000003$).



Slika 50. Azotni indeks (NBI) u listovima divljeg tipa i *flacca* mutanta paradajza izloženih trima ciklusima suše (D) praćenih periodom rehidratacije u trajanju od tri dana (R) i u optimalno zalivanim biljkama (C) gajenim na intenzitetu svetlosti $800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Predstavljene su srednje vrednosti \pm SE ($n \geq 7$). Različita slova predstavljaju statistički značajne razlike između proseka prema Tukey HSD post hoc testu ($p \leq 0.05$).

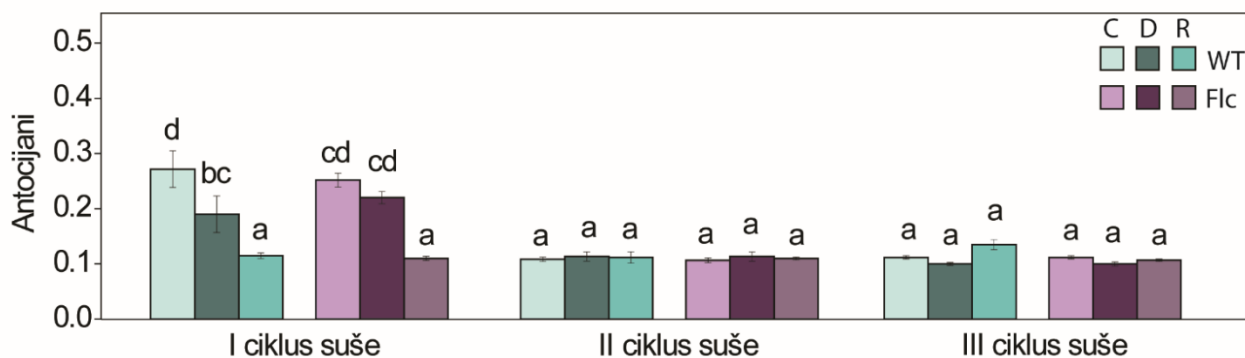
4.3.5. Uticaj različitog intenziteta svetlosti i ciklusa suše na sadržaj antocijana u listovima

Vrednosti za antocijane kod biljaka iz sva tri ciklusa pri intenzitetu svetlosti od $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ pokazane su na slici 51. U datim uslovima ne uočavaju se konstitutivne razlike između WT i *flacca* genotipa. Takođe, ne može se potvrditi da su suša i rehidratacija imale statistički značajan uticaj na sadržaj antocijana.



Slika 51. Sadržaj antocijana u listovima divljeg tipa paradajza i *flacca* mutanta izloženih trima ciklusima suše (D) praćenih periodom rehidratacije u trajanju od tri dana (R) i kod optimalno zalivanih biljakama (C) gajenim na intenzitetu svetlosti $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Predstavljene su srednje vrednosti \pm SE ($n \geq 7$). Različita slova predstavljaju statistički značajne razlike između proseka prema Tukey HSD post hoc testu ($p \leq 0.05$).

Promene u sadržaju antocijana uočljive su jedino u prvom ciklusu kod biljaka WT i *flacca*, koje su gajene na svetlosti intenziteta $800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (slika 52). Kod WT suša je indukovala njihovu smanjenu akumulaciju u odnosu na optimalno zalivane biljke, a takav trend je prisutan i kod rehidratacije. Smanjena akumulacija antocijana kod *flacca* zabeležena je u rehidatisanim u odnosu na kontrolne i biljke u suši. Drugi i treći ciklus nisu uticali na sadržaj antocijana, te je njihova vrednost skoro istovetna kao kod kontrolnih i biljaka iz tretmana za oba genotipa. Takođe, nisu uočene ni konstitutivne razlike u sadržaju antocijana između WT i *flacca* mutanta.



Slika 52. Sadržaj antocijana u listovima divljeg tipa i *flacca* mutanta paradajza izloženih trima ciklusima suše (D) praćenih periodom rehidracije u trajanju od tri dana (R) i u optimalno zalivanim biljkama (C) gajenim na intenzitetu svetlosti $800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Predstavljene su srednje vrednosti \pm SE ($n \geq 7$). Različita slova predstavljaju statistički značajne razlike između proseka prema Tukey HSD post hoc testu ($p \leq 0.05$).

4.3.6. Efekat različitiog inteziteta svetlosti i ciklusa suše na sintezu malih RNK u listovima paradajza

Sadržaj nekodirajućih RNK (30–300 nukleotida) u listovima WT i *flacca* biljaka koje su bile gajene na svetlosti intenziteta $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ i koje su bile izložene prvom, drugom i trećem ciklusu suše prikazan je na slikama 53, 54 i 55. Vrednosti su bile izražena u odnosu na kontrolne WT vrednosti iz prvog ciklusa suše, tj. početka eksperimenta.

Može se primetiti da je izlaganje biljaka niskoj svetlosti ($250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) tokom prvog ciklusa u kontrolnim uslovima kod *flacca* dovelo do povećanja sadržaja nkRNK veličine 35 nukleotida (nt) i 50 nt, kao i opadanje u sadržaju za 65, 90 i 100 nt, a u odnosu na WT (slika 53a i 53b).

U WT biljkama prva suša je indukovala povećanu sintezu nkRNK veličine 35 nt, 65 nt i 75 nt, suprimirala je sintezu nkRNK veličine 250 nt, a nije imala uticaj na sintezu nkRNK veličine 50, 90 i 100 nt (slika 53c). Povećani trend sinteze nkRNK kod WT biljaka u rehidraciji je još uvek prisutan za nkRNK veličine 75 nt, dok je smanjena akumulacija primećena u nkRNK od 65 nt, 90 nt i 100 nt (slika 53e).

Izlaganje *flacca* biljaka prvoj suši indukovalo je povećanu sintezu nkRNK veličine 35 nt i 50 nt i 75 nt za 80% u odnosu na kontrolne WT biljke, dok je sinteza nkRNK veličine 65 nt bila uvećana za 44% u odnosu na WT kontrolu. Sa druge strane, kod *flacca* suša nije bitnije uticala na količinu nkRNK od 90 nt, 100 nt i 250 nt (slika 53d). Nakon rehidracije zabeležena je povećana sinteza nkRNK veličine 75 nt, kao i smanjena sinteza nkRNK veličine 100 nt (slika 53f).

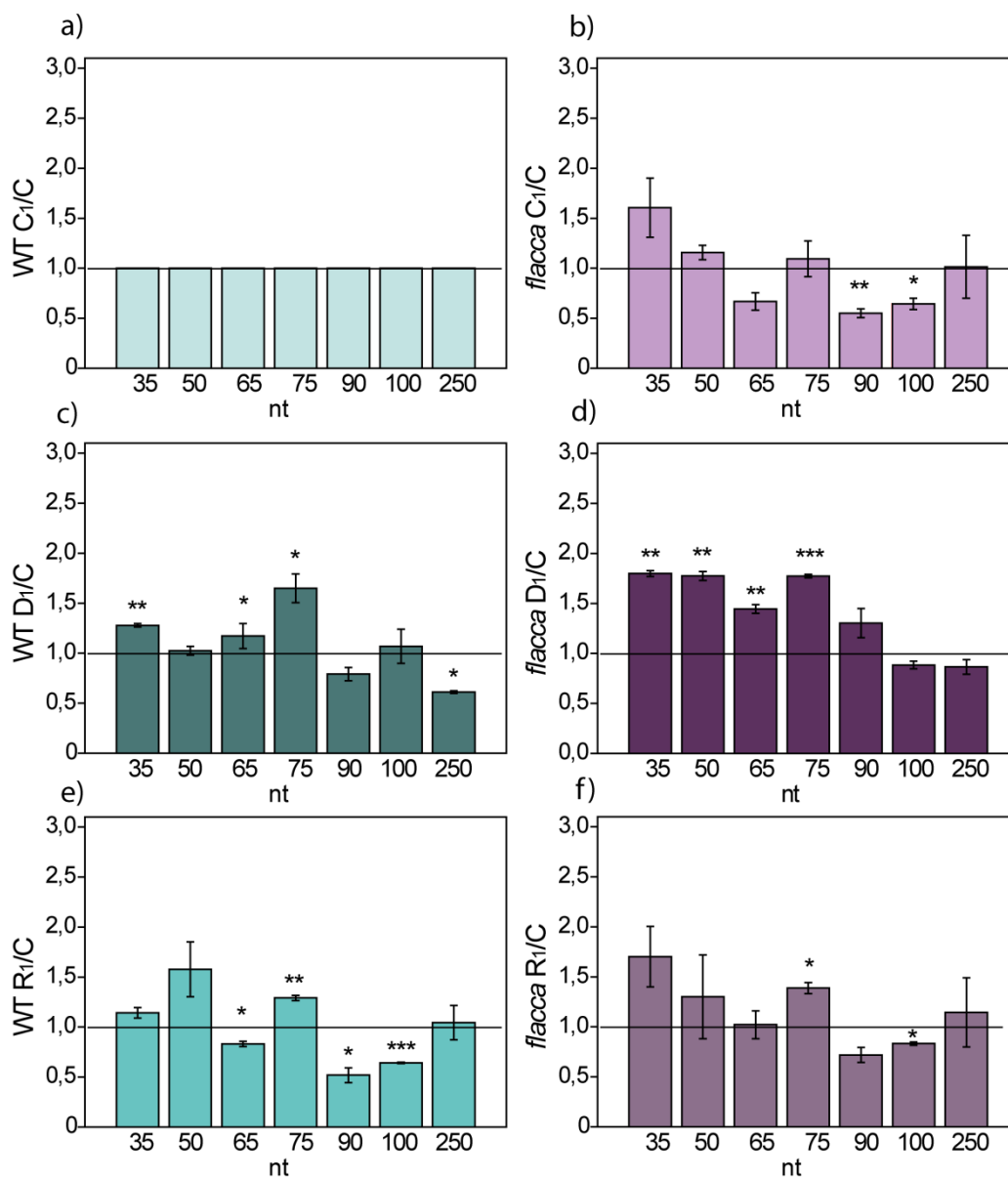
U drugom ciklusu suše optimalno zalivane WT biljke imale su smanjenu akumulaciju nkRNK veličine 65 nt i 100 nt, dok je nivo ostalih bio sličan kao u kontrolnim WT biljkama na početku eksperimenta (54a). Takođe, u listovima *flacca* biljaka količina sinteze nkRNK bila je slična kao kod kontrolnih WT biljaka sa početka eksperimenta (slika 54b i 54a).

Kod WT biljaka tokom drugog ciklusa suše došlo je do smanjene sinteze nkRNK veličine 65 nt, 90 nt i 100 nt za oko 40%, dok je nivo sinteze nkRNK od 250 nt bio povećan u odnosu na optimalno zalivane biljke za oko 20% (slika 54c). Zanimljivo, u rehidraciji nisu prisutne trake koje odgovaraju veličini 35 nt i 50 nt, dok je nivo nkRNK veličine 65 nt bio smanjen, u odnosu na kontrolne WT biljke sa početka eksperimenta. Sa druge strane, rehidracija je indukovala sintezu nkRNK veličine 100 nt koja je u drugom ciklusu suše bila smanjena (slika 54e).

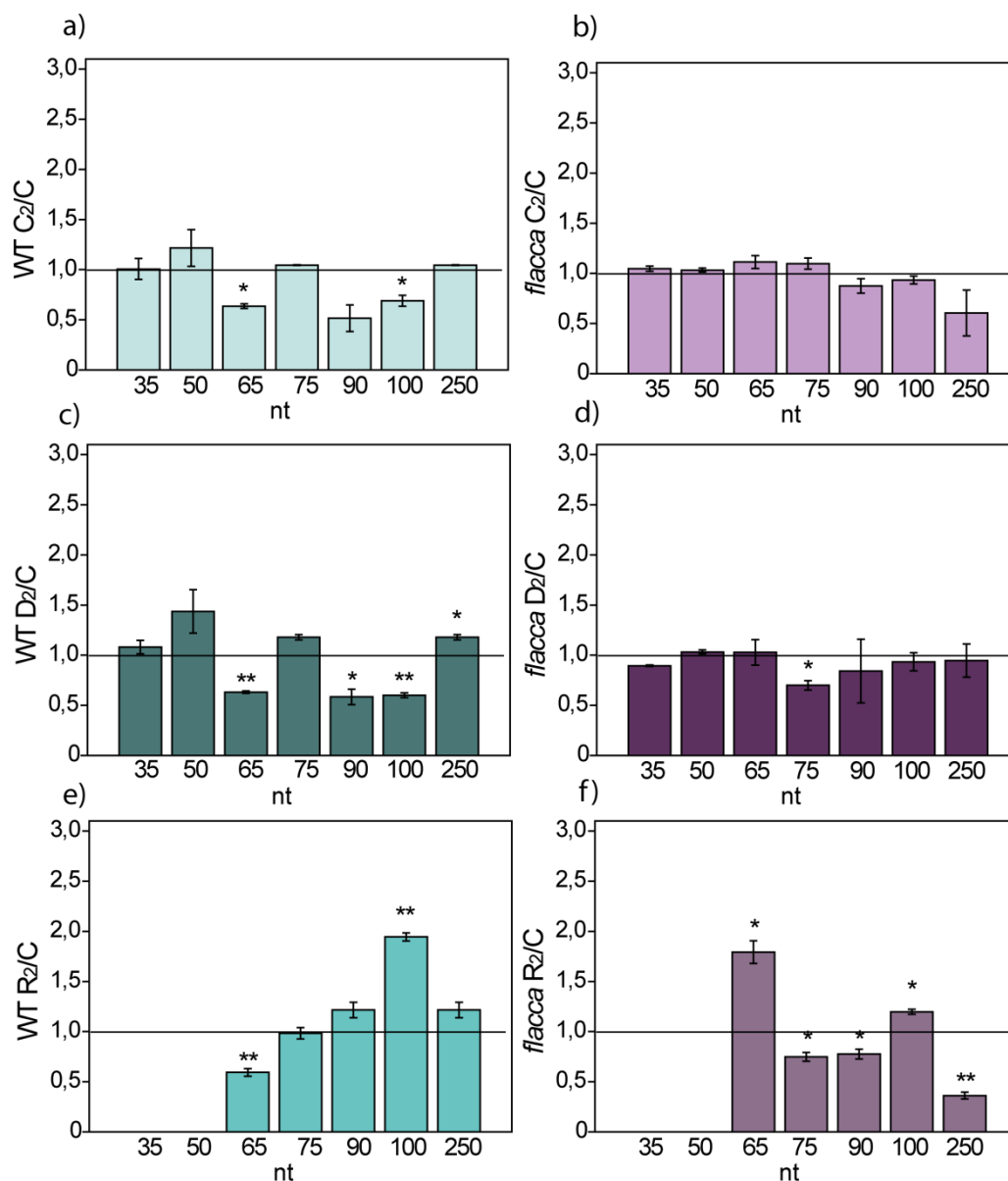
Kod *flacca* biljaka drugi ciklus suše je indukovao smanjenje sinteze nkRNK veličine 75 nt, dok je nivo ostalih nkRNK ostao nepromenjen u odnosu na optimalno zalivane WT biljke (slika 54d). Kao i kod WT biljaka, u *flacca* je rehidratacija dovela do gubitka traka na 35 nt i 55 nt, dok je količina nkRNK veličine 75 nt, 90 nt i 250 nt bila suprimirana. Za razliku od biljaka u suši, sinteza nkRNK veličine 65 nt i 100 nt bila je indukovana u rehidraciji (slika 54f).

Tokom trećeg ciklusa suše u optimalno zalivanim WT biljkama došlo je do gubitka traka veličine 35 nt i 50 nt, dok je nivo nkRNK veličine 65 nt, 75 nt, 90 nt, 100 nt i 250 nt ostao nepromenjen u odnosu na optimalno zalivane biljke sa početka eksperimenta (slike 55a i 53a). Takođe, u kontrolnim *flacca* biljkama nije došlo do pojave traka koje odgovaraju veličini 35 nt i 50 nt, dok je sinteza nkRNK veličine 75 nt, 100 nt i 250 nt bila smanjena u odnosu na optimalno zalivane WT biljke sa početka eksperimenta (slika 55b i 53a). Gubitak traka koje odgovaraju veličini nkRNK od 35 nt i 50 nt uočio se u suši i rehidraciji kod biljaka oba genotipa. U WT biljkama nakon trećeg ciklusa suše sinteza nkRNK veličine 65 nt bila je udvostručena u odnosu na optimalno zalivanje WT biljke sa početka eksperimenta, dok je akumulacija nkRNK veličine 75 nt i 250 nt bila smanjena (slika 55c). Nakon rehidracije zabeležena je smanjena akumulacija nkRNK veličine 90 nt i 250 nt, dok je nivo ostalih nkRNK ostao nepromenjen u odnosu na optimalno zalivane WT biljke (slika 55e).

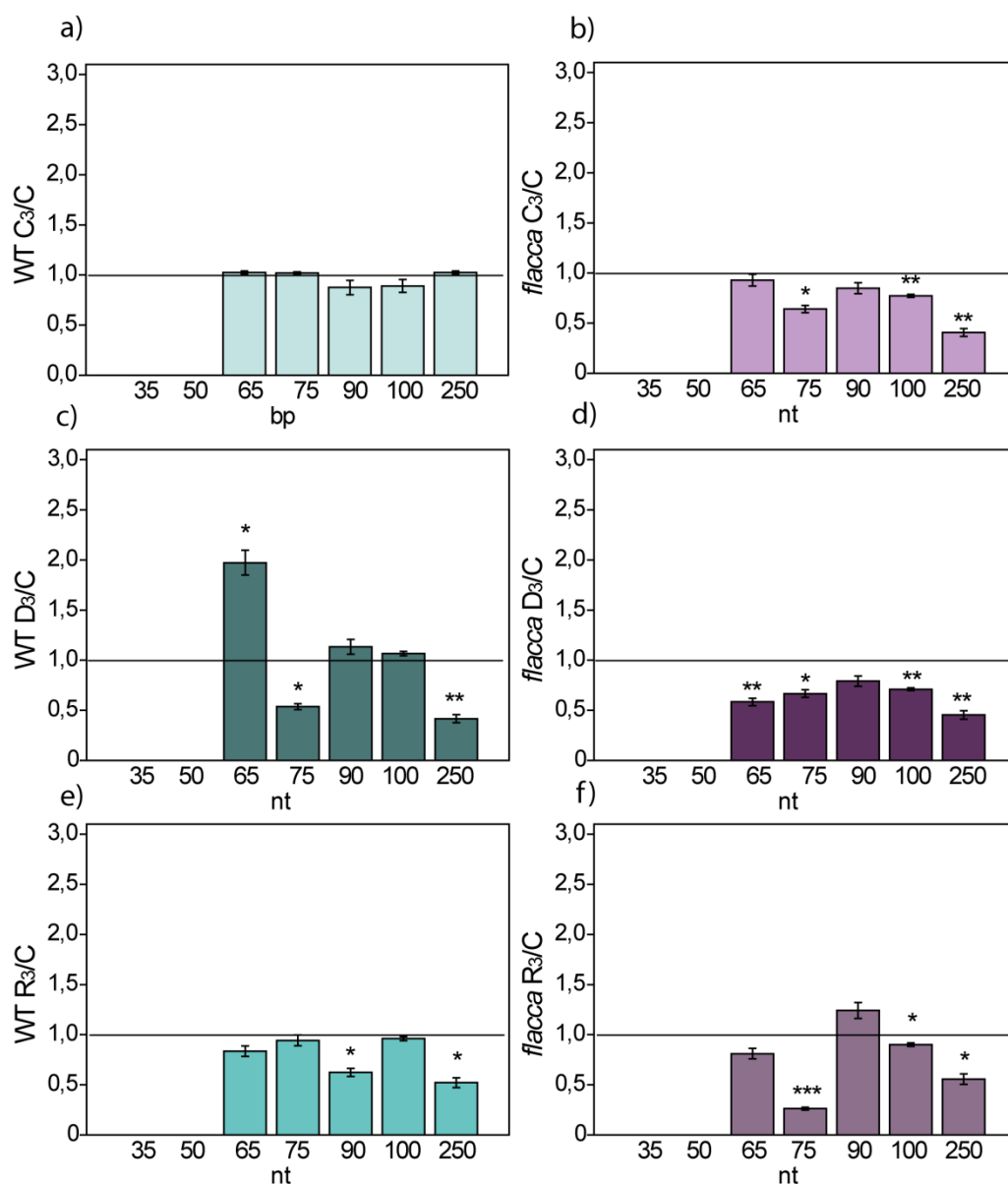
U listovima *flacca* biljaka treći ciklus suše (55d) i rehidratacija (55f) indukovali su smanjenu sintezu nkRNK veličine 65 nt, 75 nt, 100 nt i 250 nt, dok je količina nkRNK veličine 90 nt ostala nepromenjena u odnosu na optimalno zalivane WT biljke s početka eksperimenta (53a).



Slika 53. Sadržaj ncRNK u listovima divljeg tipa i *flacca* mutanta paradajza, na svetlosti od $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, izloženih prvom ciklusu suše (D_1) koji je praćen periodom rehidracije (R_1) i u optimalno zalivanim biljakama (C_1). Predstavljene su srednje vrednosti \pm SE ($n \geq 7$). Zvezdice predstavljaju statistički značajne razlike između kontrola, biljaka u suši i rehidratiranih biljaka unutar svakog genotipa prema Welch t-testu (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).



Slika 54. Sadržaj ncRNK u listovima divljeg tipa i *flacca* mutanta paradajza, na svetlosti od $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, zloženih drugom ciklusu suše (D_2) koji je praćen periodom rehidracije (R_2) i u optimalno zalivanim biljkama (C_2). Predstavljene su srednje vrednosti \pm SE ($n \geq 7$). Zvezdice predstavljaju statistički značajne razlike između kontrola, biljaka u suši i rehidratiranih biljaka unutar svakog genotipa prema Welch t-testu (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).



Slika 55. Sadržaj nkRNK u listovima divljeg tipa i *flacca* mutanta paradajza, na svetlosti od 250 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, izloženih tečjem ciklusu suše (D₃) koji je praćen periodom rehidracije (R₃) i u optimalno zalivanim biljakama (C₃). Predstavljene su srednje vrednosti \pm SE ($n \geq 7$). Zvezdice predstavljaju statistički značajne razlike između kontrola, biljaka u suši i rehidratiranih biljaka unutar svakog genotipa prema Welch t-testu (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

Uopšteno posmatrano (slike 53, 54 i 55), u eksperimentu na nižem intenzitetu svetlosti, veličina najmanjih detektovanih nkRNK iznosila je 35 nt i njihova povećana sinteza detektovana je samo u prvom ciklusu suše u oba genotipa. Svaku sledeći ciklus nije uticao na njihovu akumulaciju, tačnije tokom drugog ciklusa suše njihov nivo ostao je nepromenjen u odnosu na kontrolne biljke, dok se u trećem nisu ni razdvojile na poliakrilamidnom gelu. Sa druge strane, kod rehidratiranih WT i *flacca* biljaka uočene su samo u prvom ciklusu, dok se u drugom i trećem ciklusu rehidracije nisu pojavile. Povećana sinteza nkRNK veličine 50 nt primećena je samo kod *flacca* u prvom ciklusu suše, dok gubitak trake na gelu koji odgovara ovoj veličini primećen je u trećem ciklusu suše. Rehidracija nije uticala na njihovu akumulaciju kod oba genotipa u prvom ciklusu, dok je u drugom i trećem primećeno odsustvo traka na gelu koje odgovaraju ovoj veličini. U prvom ciklusu suše nkRNK veličine 65 nt povećano su se sintetisale, dok je u trećem ciklusu pokazan suprotan trend između

genotipova. Kod *flacca* dolazi do opadanja u sadržaju ove male RNK tokom drugog i trećeg ciklusa suše, dok kod WT opadanje je prisutno tokom drugog a povećanje nakon trećeg ciklusa suše. Nakon rehidracije u prvom i trećem ciklusu nivo nkRNK veličine 65 nt u WT biljkama bio je snižen, a kod *flacca* je ostao nepromenjen u prvom a zatim se znatno povećao u drugom ciklusu, a sve u odnosu na optimalno zalivane biljke. Povećana sinteza nkRNK veličine 75 nt je prisutna u prvom ciklusu tokom suše i rehidracije kod oba genotipa, dok drugi i treći ciklus nije uticao na promenu ili je doveo do opadanja nivoa. Nepromenjeni sadržaj nkRNK veličine 90 nt zabeležen je u *flacca* u sva tri ciklusa, odnosno u drugom i trećem ciklusu u WT. Sa druge strane, u rehidraciji u WT je primećena smanjena sinteza ove nkRNK u prvom i trećem ciklusu, odnosno u *flacca* u drugom. Izlaganje biljaka oba genotipa ciklusima suše odrazilo se na smanjenu produkciju nkRNK veličine 100 nt u drugom ciklusu kod WT, odnosno u trećem kod *flacca*. Rehidracija je kod oba genotipa u prvom ciklusu izazvala smanjenu sintezu ove nkRNK, odnosno njeno povećanje u drugom ciklusu. Treći ciklus je imao suprotan efekat na WT i *flacca*, kod WT nije indukovao nikakve promene, odnosno u *flacca* je izazvao blago smanjenje sinteze ove nkRNK. Prvi i drugi ciklus suše nisu uticali na produkciju nkRNK veličine 250 nt u *flacca*, dok je treći ciklus izazvao njenu smanjenu sintezu. U WT biljkama prvi i treći ciklus su inhibitorno delovali na njihovu sintezu, dok je drugi ciklus suše imao pozitivan efekat na produkciju ove nkRNK. Rehidracija je indukovala smanjenje nkRNK veličine 250 nt jedino u trećem ciklusu kod WT, odnosno u drugom i trećem kod *flacca*.

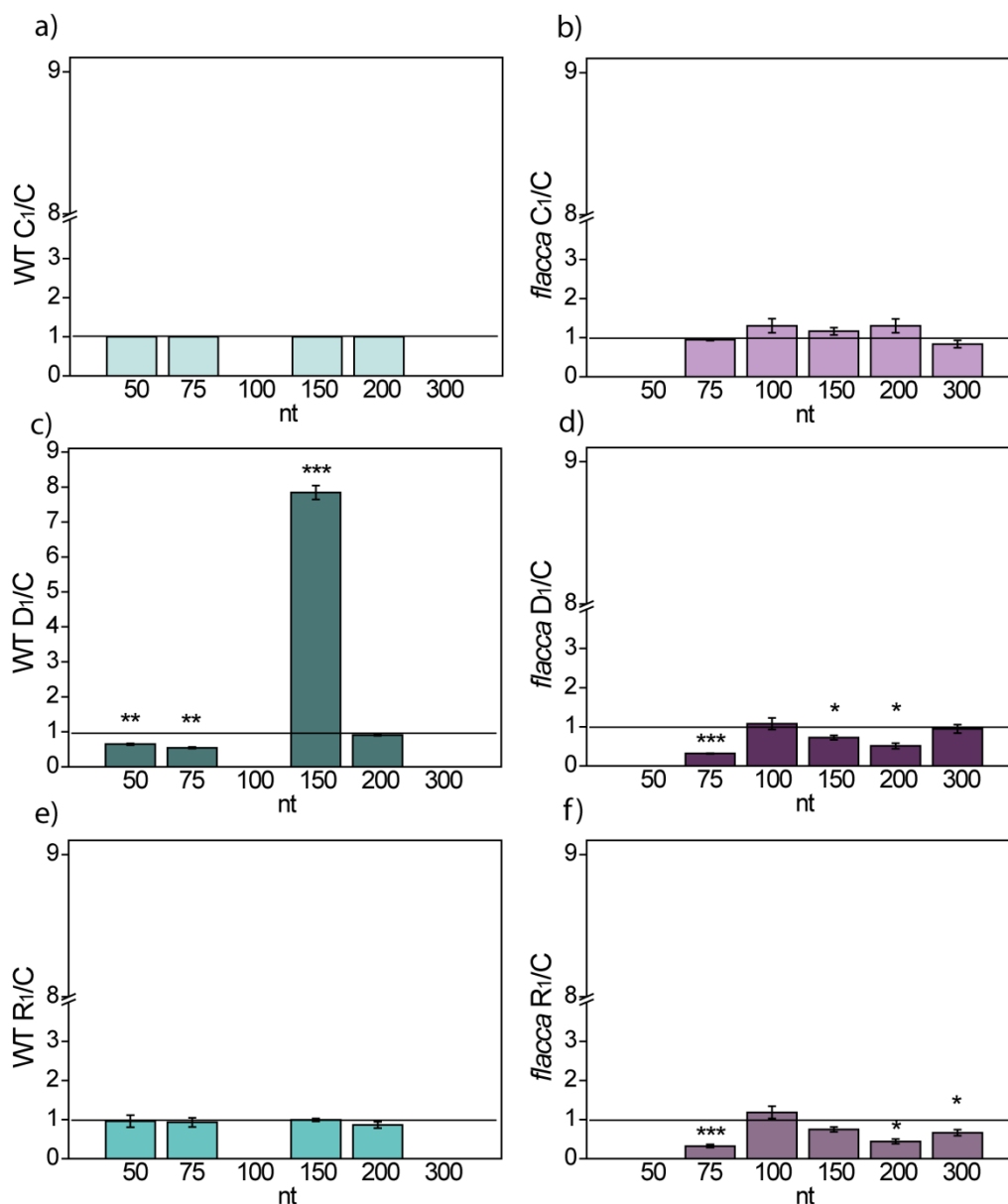
Sadržaj nekodirajućih nkRNK u listovima WT i *flacca* biljaka koje su bile gajene na svetlosti intenziteta $800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ i bile izložene prvom, drugom, odnosno trećem ciklusu suše prikazan je na slikama 56, 57 i 58. U poređenju sa profilom nkRNK indukovanih na svetlosti intenziteta $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (slika 53, 54 i 55), na svetlosti ovog intenziteta uočava se produkcija nkRNK različite veličine; tj. ne uočava se pojava nkRNK veličine 35 nt, dok su sa druge strane, detektovane nkRNK veličine 200 i 300 nt. Takođe, na poliakrilamidnom gelu nisu uočene trake koje odgovaraju veličini nkRNK od 65 nt i 250 nt. U ovim uslovima je pokazano da se u WT biljkama u svim vrstama tretmana (C, D i R) i u svim ciklusima uočava odsustvo nkRNK veličine 100 nt i 300 nt koje se pojavljuju u *flacca*, odnosno prisustvo nkRNK veličine 50 nt kojih nema u *flacca*.

Između WT i *flacca* kontrolnih biljaka u prvom ciklusu suše nisu uočene konstitutivne razlike u sadržaju bilo koje nkRNK, tj. njihova sinteza bila je približno ista između genotipova (slike 56a i 56b).

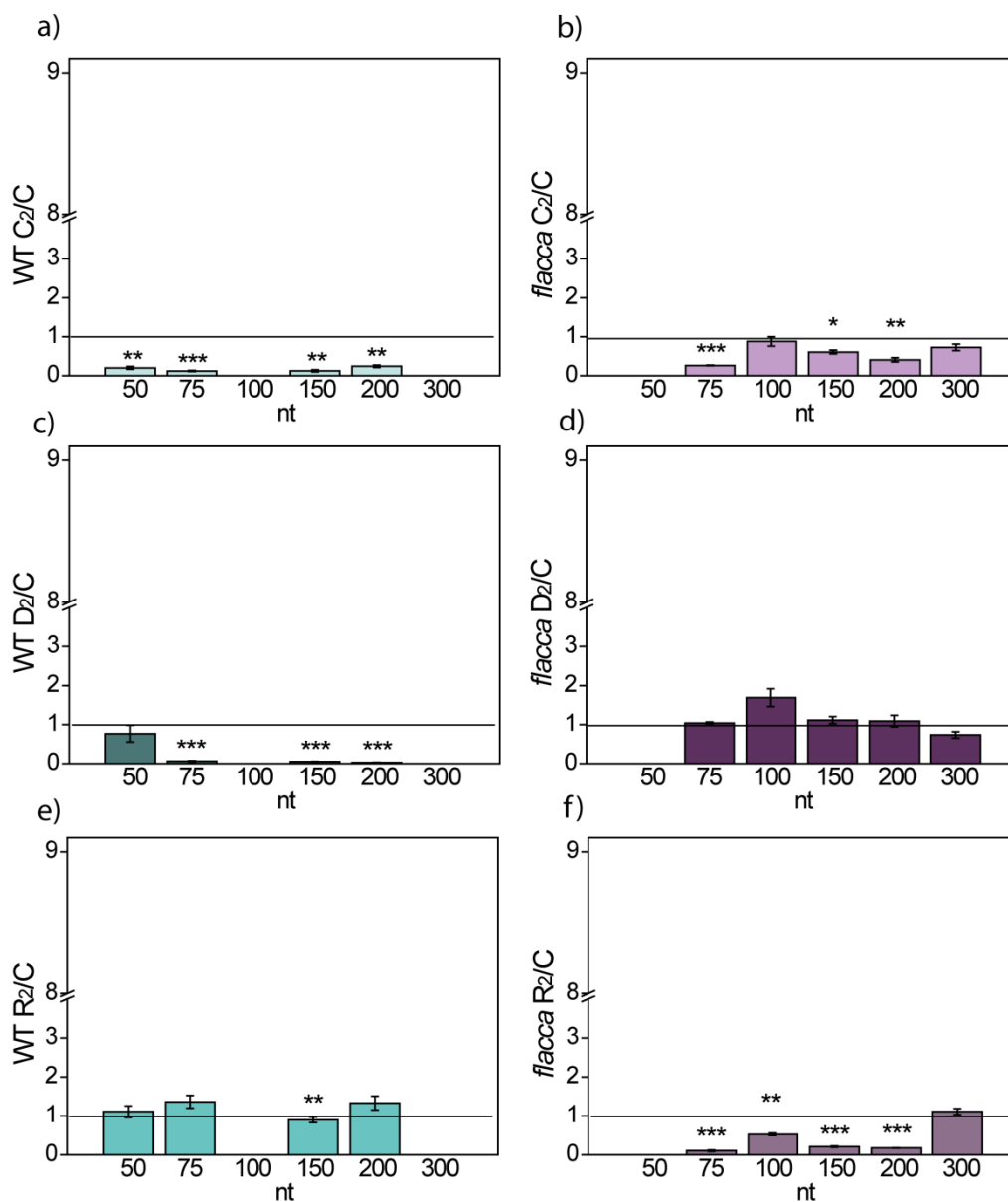
U WT biljkama prva suša je indukovala povećanju produkciju nkRNK veličine 150 nt za preko sedam puta u odnosu na optimalno zalivane biljke, dok je sinteza nkRNK veličine 50 nt i 75 nt bila redukovana. Takođe, količina nkRNK veličine 200 nt bila je nepromenjena u odnosu na kontrolne biljke (slika 56c). Izlaganje *flacca* biljaka prvoj suši indukovalo je smanjenu sintezu nkRNK veličine 75 nt, 150 nt i 200 nt, dok je sinteza nkRNK veličine 100 nt i 300 nt bila nepromenjena u odnosu na kontrolne WT biljke s početka eksperimenta (slike 56d i 56a). U rehidraciji u prvom ciklusu su se vrednosti za nkRNK u WT izjednačile sa kontrolnim, dok je kod *flacca* uočena smanjena sinteza nkRNK veličine 75 nt, 200 nt i 300 nt (slike 56e i 56f).

U drugom ciklusu kontrolne (slika 57a) i suši (slika 57c) izložene WT biljke pokazale su smanjenu sintezu svih detektovanih nkRNK u odnosu na WT kontrolne biljke s početka eksperimenta. Sa druge strane, rehidracija je indukovala njihovu sintezu u odnosu na sušu, te su se vrednosti za količinu nkRNK izjednačile sa vrednostima za kontrolne WT s početka eksperimenta (slika 57e). Kod *flacca* biljaka u drugom ciklusu došlo je do smanjene produkcije nkRNK u kontrolnim (slika 57b), odnosno rehidratiranim (slika 57f) biljkama (osim nkRNK veličine 300 nt), dok su u suši vrednosti za ove nkRNK bile izjednačene sa kontrolnim WT biljkama s početka eksperimenta (slika 57d).

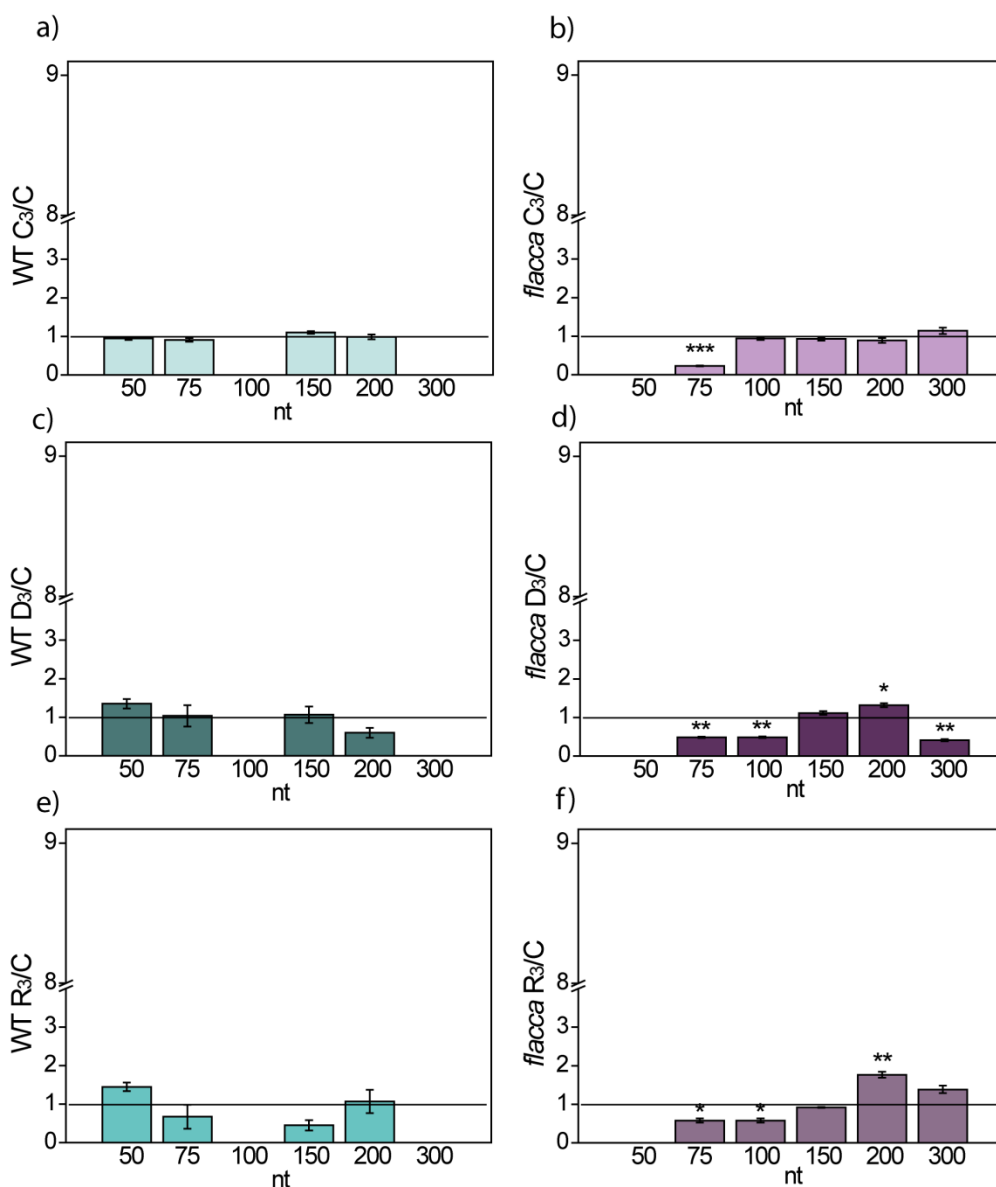
Što se tiče optimalno zalivanih biljaka, u trećem ciklusu suše nisu uočene konstitutivne razlike između WT i *flacca* biljaka, te su imale vrednosti približne vrednostima kontrolnih WT biljaka na početku eksperimenta (slike 58a, 58b, 56a). U WT biljkama, nisu uočene promene u sintezi svih nkRNK u suši (slika 58c), odnosno rehidraciji (slika 58e), te su njihove vrednosti ostale nepromenjene u odnosu na WT kontrolu. Treći ciklus suše je u listovima *flacca* biljaka indukovao smanjenu sintezu nkRNK veličine 75 nt, 150 nt i 200 nt, dok je uočena povećana sinteza nkRNK veličine 200 nt (slika 58d). Nakon rehidracije u trećem ciklusu vrednosti nkRNK veličine 75 nt i 100 nt bile su smanjene, dok je pokazana povećana sinteza nkRNK veličine 200 nt (slika 58f).



Slika 56. Sadržaj nkRNK u listovima divljeg tipa i *flacca* mutanta paradajza, na svetlosti od 800 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, izloženih prvom ciklusu suše (D₁) koji je praćen periodom rehidracije (R₁) i u optimalno zalivanim biljkama (C₁). Predstavljene su srednje vrednosti \pm SE (n \geq 7). Zvezdice predstavljaju statistički značajne razlike između kontrola, biljaka u suši i rehidratiranih biljaka unutar svakog genotipa prema Welch t-testu (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).



Slika 57. Sadržaj ncRNK u listovima divljeg tipa i *flacca* mutanta paradajza, na svetlosti od $800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, izloženih drugom ciklusu suše (D₂) koji je praćen periodom rehidracije (R₂) i u optimalno zalivanim biljakama (C₂). Predstavljene su srednje vrednosti \pm SE ($n \geq 7$). Zvezdice predstavljaju statistički značajne razlike između kontrola, biljaka u suši i rehidratiranih biljaka unutar svakog genotipa prema Welch t-testu (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).



Slika 58. Sadržaj nkRNK u listovima divljeg tipa i *flacca* mutanta paradajza, na svetlosti od $800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, izloženih trećem ciklusu suše (D₃) koji je praćen periodom rehidracije (R₃) i u optimalno zalivanim biljakama (C₃). Predstavljene su srednje vrednosti \pm SE ($n \geq 7$). Zvezdice predstavljaju statistički značajne razlike između kontrola, biljaka u suši i rehidratiranih biljaka unutar svakog genotipa prema Welch t-testu (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

Uzimajući u obzir genotip, tretman i vrstu ciklusa, može se primetiti da je na visokom intenzitetu svetlosti ($800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) došlo do promene u sintezi nkRNK veličine 50 nt jedino u prvom ciklusu suše gde se uočava njena smanjena produkcija (slika 56, 57 i 58). Sa druge strane, produkcija nkRNK veličine 75 nt bila je smanjena u prvom i drugom ciklusu u WT, odnosno u prvom i trećem u *flacca*, dok je rehidracija imala samo uticaj na nivou *flacca*. Kao što je već rečeno, na poliakrilamidnom gelu nisu detektovane trake koje odgovaraju nkRNK veličine 100 nt kod WT, dok je kod *flacca* primećena smanjena sinteza ove nkRNK u trećem ciklusu suše, odnosno u rehidraciji drugog i trećeg ciklusa. Što se tiče nkRNK veličine 150 nt, u WT je nena povećana sinteza zabeležena u prvom ciklusu suše, dok su druga suša i rehidracija indukovale njeno smanjenje. Izlaganje biljaka suši odrazilo se na povećanu sintezu nkRNK veličine 200 nt u WT jedino u drugom ciklusu, dok je u rehidraciji u sva tri

ciklusa taj nivo ostao nepromenjen. Sa druge strane, u *flacca* je u prvom ciklusu suše i rehidracije došlo do smanjene produkcije ove nkRNK, dok je u trećem primećena povećana sinteza. Ekspresija nkRNK veličine 300 nt indukovala se jedino kod *flacca*, ali do promene u njenoj sintezi došlo je u rehidraciji u prvom ciklusu, odnosno u suši u trećem ciklusu.

5. Diskusija

5.1. Konstitutivne razlike između biljaka divljeg tipa (Ailsa Craig) i *flacca* mutanta

Sadržaj apscisinske kiseline (ABA) u listovima mutanta paradajza *flacca* može da bude redukovan i do 60% ABA u odnosu na listove iz svoje roditeljske linije (Sharp i sar., 2000; López-Ráez i sar., 2010; Fang i sar., 2019). U slučaju *flacca*, mutanta Ailsa Craig, koji je bio objekat ovog istraživanja, koncentracija ABA u listovima pri optimalnim uslovima zalivanja bila je redukovana za 20–30% u odnosu na listove divljeg tipa bez obzira na intezitet svetlosti korišćen pri gajenju biljaka (250 ili $800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

Poznato je da se hormon ABA najčešće smatra inhibitorom rastenja (Chen i sar., 2002). Nasuprot toj ulozi ovog hormona kod mnogih vrsta, njegov smanjeni nivo u mutantima sa deficijencijom u biosintezi upravo ima suprotni efekat. Tako i u ovom istraživanju je pokazano da je niži nivo ABA indukovao vidno drugačiji fenotip u *flacca* biljkama, karakteristično smanjenog rasta u odnosu na WT, redukovane lisne površine, sa kraćim nadzemnim delom i manjom biomasom što je u skladu sa literaturnim podacima (Imber i Tal, 1970; Sharp i sar., 2002). Mada intezitet svetlosti kod biljaka nije znatno uticala na nivo ABA u listovima, njen efekat na opadanje sveže mase i lisne površine je bio izrazitiji na nižem intezitetu svetlosti. U eksperimentu na $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ nedostatak ABA u *flacca* uticao je na smanjenje sveže mase za više od 60%, nivo suve mase bio je umanjen preko 40% u odnosu na biljke divljeg tipa, dok je lisna površina bila redukovana pet puta. Sa druge strane, na intenzitetu svetlosti od $800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ na kraju vegetacionog perioda takođe je kod *flacca* zabeležena redukcija sveže i suve mase biljaka, za 20%, odnosno 50%, dok je lisna površina bila redukovana za 40% u odnosu na biljke divljeg tipa. Ovo je u korelaciji sa rezultatima dobijenim od strane Chen i sar. (2002) gde je nedostatak ABA u *flacca* biljkama redukovao svežu masu nadzemnog dela i listova za polovinu. Smanjenje lisne površine, kao i suve mase kod *flacca* mutanta pokazano je i istraživanjima publikovanim od strane Dodd i sar. (2009) i Fang i sar. (2019). Takođe, u drugim ABA-deficijentim mutantima paradajza, kao što su *sitiens* i *notabilis* uočavaju se konstitutivne morfološke razlike u odnosu na divlji tip. Tako je pokazano da je relativni nivo rasta u *sitiens* za oko 22% niži nego kod WT biljaka (Nagel i sar., 1994), odnosno da *notabilis* mutant ima redukovanu lisnu površinu i ukupnu suhu masu, odnosno manji porast nadzemnog dela (Ntatsi i sar., 2014).

Kao što je poznato, ABA u biljkama igra značajnu ulogu u regulaciji otvorenosti stoma, nivoa transpiracije i u razvijanju tolerancije na sušu (Lim i sar., 2015., Davies i sar., 2005). Stoga, nimalo nije iznenađujuće da je u optimalnim sredinskim uslovima provodljivost stoma (g_s) bila mnogo viša u *flacca*, nego u divljem tipu, što je bilo izrazitije kod biljaka gajenim na nižem intezitetu svetlosti. Pri svetlosti nižeg intenziteta g_s je kod *flacca* bila za oko dva puta veća nego kod WT, dok je na $800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ taj porast kod *flacca* iznosio oko 40%. Takođe, veći stepen provodljivosti stoma u *flacca* mutantu pokazan je u rezultatima opisanim od strane Dodd i sar. (2009) i Fang i sar. (2019). Ovakav obrazac ponašanja stominog aparata zabeležen je i u drugim ABA-deficijentim mutantima paradajza, tj. kod *sitiens* i kod *notabilis* biljaka gde je zbog veće otvorenosti stoma bio povišen i nivo transpiracije, odnosno stepen asimilacije CO_2 (Poór i sar., 2019; Ntatsi i sar., 2014).

Na osnovu dobijenih vrednosti za ABA i provodljivosti stoma očekivalo bi se da je povećana biomasa kod *flacca* u odnosu na WT. Međutim, pokazano je da inhibicija rastenja kod *flacca* posledica povećane sinteze hormona etilena, čime se može objasniti manja biomasa

ovih biljaka, kao i redukovana lisna površina (Sharp i sar., 2002). Samim tim, može se pretpostaviti da je minimalni nivo ABA, koji je neophodan za optimalno rastenje i razviće, mnogo veće vrednosti nego one koja je prisutana kod ABA-deficijentnih mutanata. Dobijeni rezultati ukazuju na to da je potrebno znatno manji pad nivoa ABA kod *flacca* nego kod WT, a koji može da predstavlja okidač za pokretanje mehanizama koji su povezani sa odgovorom na stres suše kod deficijentnih mutanata za ABA. S tim u vezi, neophodno je u budućim istraživanjima usmeriti pažnju na preciznu regulaciju ćelijske homeostaze za ABA, koja je neophodna za pravilno odvijanje procesa rastenja i razvića, pri čemu se kao model sistemi mogu koristiti različiti ABA-deficijentni mutanti.

Kod *flacca* usled povećane provodljivosti stoma kao posledice smanjene sinteze ABA, čak i pri optimalnoj dostupnosti vode, očekivao bi se gubitak vode u listovima, odnosno opadanje ukupnog vodnog potencijala. Međutim, izmerene vrednosti vodnog potencijala u listovima divljeg tipa i mutanta su slične, odnosno sniženi nivo ABA u *flacca* nije uticao na turgidnost i sadržaj vode u listovima. Sa druge strane, kod biljaka koje su gajene na $800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ samo je u jednoj tački uočen nešto niži ukupni vodni potencijal u listovima *flacca* u odnosu na biljke divljeg tipa. Ovo se može pripisati uticaju povećanog intenziteta svetlosti koji je doprineo većem odavanju vode putem procesa evapo-transpiracije. Sličan uticaj ABA na provodljivost stoma i relativni sadržaj vode uočen je kod *sitiens* mutanta (Poor i sar., 2019). Dobijeni rezultati ukazuju na to da postoje alternativne kompenzujuće strategije u *flacca* koje sprečavaju dehidrataciju listova pri sniženim vrednostima ABA. Jedna od najčešćih alternativnih strategija jeste akumulacija redukujućih šećera u milimolarnim koncentracijama, ili šećernih alkohola koji imaju osmoprotektivnu ulogu u ćeliji (Singh i sar., 2015). Tako je u ovom istraživanju pokazano da *flacca* konstitutivno sadrži 2–4 puta više rastvornih šećera, pre svega sorbitola, galaktoze i arabinoze u poređenju sa biljkama divljeg tipa (prilog, tabela P4). Sa druge strane, nisu uočene konstitutivne razlike u sadržaju glukoze, fruktoze i saharoze. Slične rezultate su dobili i drugi autori, koji su izmerili nepromenjeni konstitutivni nivo fruktoze u listovima *notabilis* mutanta u poređenju sa roditeljskom linijom (Ntatsi i sar., 2014). Sa druge strane, u listovima *sitiens* mutanta sadržaj ukupnih ugljenih hidrata bio je niži za gotovo 20% u odnosu na divlji tip (Poor i sar., 2019).

Poznato je da pored ugljenih hidrata, slobodne aminokiseline, u prvom redu prolin imaju osmoprotektivnu ulogu prilikom izlaganja biljaka suši, mrazu ili stresu soli (Liang i sar., 2013). Rezultati ovog istraživanja ukazuju na značajnu fiziološku ulogu aminokiselina kod mutanta sa smanjenim sadržajem ABA u listovima, s obzirom na to da je konstitutivni nivo ukupnih aminokiselina bio skoro dva puta veći u *flacca*, nego kod divljeg tipa (prilog, tabela P6). Rezultati potvrđuju sličan trend dobijen i u radu sa *notabilis* mutantom, gde je takođe nivo ukupnih aminokiselina bio značajno uvećan u odnosu na divlji tip (Ntatsi i sar., 2014). Na osnovu dobijenih rezultata može se pretpostaviti da akumulacija prolina i rastvornih ugljenih hidrata u *flacca* pri optimalnih uslovima gajenja kompenzuje veću stopu otvorenosti stoma usled sniženog nivoa endogene ABA i doprinosi održavanju optimalnog vodnog potencijala. Takođe, u ovom istraživanju je pokazano da je konstitutivni sadržaj hidroksibenzoevih kiselina, hidroksicimetnih kiselina, flavon-3-ola i antocijana niži u *flacca* u odnosu na WT biljke, odnosno da je na račun povećane biosinteze aminokiselina i ugljenih hidrata smanjen udeo fenilpropanoidnog puta i biosinteze fenolnih jedinjenja u *flacca*.

Poznato je da je pored *de novo* sinteze ABA za njen sadržaj i funkciju, naročito u uslovima suše, bitan fenomen redistribucije ABA koja je određena ksilemskim pH (Hartung i sar., 1998; Jovanović, 1997). Stoga bi ovde trebalo naglasiti da bez obzira na razlike u sadržaju ABA i otvorenosti stoma, pH vrednost ksilemskog soka je ostala nepromenjena kod biljaka različitog genotipa, koji su gajeni na različitom intenzitetu svetlosti. Pri gajenju biljaka na niskom intenzitetu svetlosti u kontrolnim uslovima nisu uočene konstitutivne razlike u sadržaju ukupnog askorbata između genotipova, osim što je na kraju eksperimenta sadržaj

ukupnog askorbata bio uvećan u oba genotipa u odnosu na početak eksperimenta. Takođe, uticaj svetla ogledao se u tome što su biljke na višem intenzitetu svetlosti na početku eksperimenta imale za oko 30% viši nivo ukupnog askorbata kod oba genotipa, u odnosu na kontrolne biljke na nižem intenzitetu svetlosti. Ovo je u skladu sa rezultatima publikovanim od strane Massot i sar. (2012), koji su pokazali da je nivo askorbata manji u listovima biljaka koje su gajene u senci u odnosu na one gajene na otvorenom.

Na osnovu uporedne analize konstitutivnih fizioloških i biohemijskih parametara između *flacca* i njene roditeljske linije može se zaključiti da je održavanje homeostaze ABA od izuzetnog značaja za rastenje i razviće paradajza i u uslovima optimalnog vodnog režima, čiji se mehanizmi regulacije mogu dalje ispitivati. Osim toga, *flacca* mutant može se smatrati veoma pogodnim model sistemom za proučavanje uticaja sniženog nivoa ABA na razvoj strategija neophodnih za toleranciju na sušu.

5.2. Uticaj dehidracije i rehidracije na metaboličke promene kod listova divljeg tipa paradajza i *flacca* mutanta (*Lycopersicon esculentum* Mill.)

Izlaganje biljaka dehidraciji pri nižem intenzitetu svetlosti uzrokovalo je povećanu akumulaciju ABA od 53% u WT biljkama, što je bilo praćeno zatvaranjem stoma, ali uz održavanje optimalnog vodnog potencijala (slika 14b). Međutim, iako je odsustvo zalivanja izazvalo zatvaranje stoma u *flacca* biljkama i to za 40%, nivo ABA je ostao nepromenjen. Zatvaranje stoma u *flacca* biljkama može se objasniti učešćem alternativnih hidrauličkih regulatornih mehanizama koji učestvuju u otvaranju, odnosno zatvaranju stoma, kao i zavisnošću od promene pH vrednosti ksilemskog soka (Christmann i sar., 2007; Pantin i sar., 2013). Sa druge strane, u WT biljkama koje su izložene suši dominantan je ABA-zavisan odgovor na vodni stres (Xiong i sar., 2002). Povećana akumulacija ABA kod WT biljaka u suši praćena je povećanom ekspresijom *NCED1* gena (slika 27), što je bilo i očekivano, s obzirom na to da enzim koji nastaje kao proizvod ovog gena učestvuje u biosintetskom putu ABA, što potvrđuju i rezultati drugih istraživanja (Auler i sar., 2021b; Milosavljević i sar., 2012). Međutim, bez obzira na nepromenjeni sadržaj ABA u listovima *flacca* mutanta takođe je došlo do povećane ekspresije *NCED1* gena (slika 27). Može se pretpostaviti da je nepromenjeni sadržaj ABA u *flacca* posledica njene brze razgradnje, odnosno brzog prevođenja u ABA-konjugate, kao i da je samo povećanje ekspresije *NCED1* u *flacca* (koje je opada za više od 40% u odnosu na WT) bilo nedovoljno za prelazak praga koji bi indukovao povećanu sintezu ABA. Takođe, sličan nivo ekspresije *PP2C* gena (slika 28) u suši kod oba genotipa (bez obzira što je u *flacca* povećan u odnosu na kontrolu) ukazuje da nije došlo do narušenog signalnog puta ABA, tj. da on pokazuje isti trend kod WT i *flacca*, što se potvrđuje zatvaranjem stoma u suši kod oba genotipa. Svakako bi se moglo pretpostaviti da *flacca* genotip sadrži dodatne mehanizme koji joj omogućavaju kompenzaciju niske vrednosti vodnog potencijala. Na takav zaključak ukazuje i odsustvo značajnih promena u svežoj i suvoj masi nadzemnog dela biljke (slike 15a i 15b). Samim tim, može se pretpostaviti da postoje dodatni biohemijski mehanizmi koji doprinose da *flacca* zadrži optimalni rast pod tim uslovima.

5.3. Uloga rastvornih ugljenih hidrata u suši i rehidraciji

Jedan od ciljeva ovog istraživanja jeste da se rasvetli koji rastvorni ugljeni hidrati i proteinogene aminokiseline su naročito pod uticajem vodnog deficita i nivoa endogene ABA, kao i da se ovo zapažanje inkorporira u kontekst njihove potencijalne uloge u osmotskom prilagođavanju u razvoju tolerancije na sušu. Takođe, uloga ovih jedinjenja nije posmatrana isključivo kao osmoprotektivna, već su sagledavani i kao prekursori različitih metabolita, učesnika u eliminaciji ROS, kao i signalni i regulatorni molekuli.

Nakon izlaganja suši na svetlosti nižeg intenziteta, sadržaj sorbitola, trehaloze, galaktoze i arabinoze u potpuno razvijenom listu biljaka divljeg tipa udvostručio se u odnosu na optimalno zalivane biljke. Svi ovi ugljeni hidrati smatraju se osmolitima i njihova akumulacija u uslovima stresa soli je već ranije pokazana u pirinču (Theerakulpisut i sar., 2012). Takođe, poznato je da trehaloza preko trehaloze-6-fosfata reguliše hidrolizu skroba (Vidović i sar., 2015b), odnosno da učestvuje u stabilizaciji membranskih struktura i u sprečavanju denaturacije proteina (Koyro i sar., 2012). Povećani odnos glukoze i fruktoze u WT biljkama nakon izlaganja suši mogao bi se smatrati relevantnim pokazateljem razgradnje skroba (Smeekens i sar., 2010; Vidović i sar., 2015b). Pored toga, izmereni sadržaj saharoze u četvrtom potpuno formiranom listu (koji se inače koristio za sve biohemijske analize) značajno je opao u odnosu na kontrolne biljke, te se može pretpostaviti da je došlo do njegovog transporta ka mlađim (ne sasvim diferenciranim) listovima prilikom dehidracije. Ranija istraživanja su takođe pokazala da prilikom izlaganja biljaka suši, odnosno pri tretmanu egzogenom ABA dolazi do transporta saharoze iz tkiva proizvođača do tkiva potrošača asimilata (Durand i sar., 2016; Gong i sar., 2015). Samim tim, zaključuje se da akumulacija saharoze u tkivu potrošaču uzrokuje smanjenje odnosa heksoza i saharoze. U skladu sa ovim zaključkom pokazano je u literaturi da vodni stres utiče na povećanje aktivnosti kisele invertaze u listovima, pri čemu dolazi do ireverzibilne hidrolize saharoze do glukoze i fruktoze (Du i sar., 2020b; Wang i sar., 2020).

Prilikom izlaganja WT biljaka suši dolazi i do akumulacije galaktoze. Njena povećana sinteza pri vodnom stresu povezana je sa biosintezom osmoprotektanata, što je pokazano i u listovima jabuke (Yang i sar., 2019a), odnosno krompira (Evers i sar., 2010), što je u skladu sa pretpostavkom da učestvuje u ublažavanju osmotskog stresa. Pored ovih funkcija ne sme se zanemariti i njihova gradivna uloga s obzirom na to da galaktoza, arabinoza, manozna i ksiloza predstavljaju značajne komponente koje učestvuju u formiranju ćelijskog zida, tj. različitih glikoproteina koji učestvuju u održavanju njegove strukture (Aspinall, 1980; Nguema-Ona i sar., 2014). Dakle, može se zaključiti da galaktoza i arabinoza učestvuju u očvršćavanju ćelijskog zida pri vodnom stresu u WT i u ovom eksperimentu, što je potvrđeno nepromenjenom suvom masom u odnosu na kontrolne biljke.

Sa druge strane, vodni stres je u *flacca* indukovao povećanje uglavnog ukupnih rastvornih ugljenih hidrata. Ovo je u skladu sa rezultatima publikovanim od strane Xu i sar. (2015) gde je suša prouzrokovala akumulaciju ukupnih ugljenih hidrata jedino u osetljivom kultivaru pirinča, dok u tolerantnom nije došlo do promena. Povećana sinteza glukoze u suši u *flacca* može biti povezana sa odnosom glukoze i fruktoze, kao i nivoom maltotrioze, što dodatno ukazuje na povećanu degradaciju skroba a što je praćeno transportom ugljenih hidrata (prilog, tabela P4). Akumulirana glukoza u suši može se koristiti kao gradivno jedinjenje za dobijanje drugih osmoprotektanata, kao što je sorbitol čija je akumulacija u suši tri puta uvećana nego u biljkama divljeg tipa. Slično je dobijeno kod UV-B stresa, kao deo strategije na UV-B toleranciju, što su autori objasnili podsticanjem razgradnje skroba i saharoze u svrhu biosinteze UV-B zaštitnih jedinjenja (Vidović i sar., 2015b). Slično je pokazano pri izlaganju *sitiens* mutanta stresu soli gde takođe dolazi do razgradnje skroba

(Poor i sar., 2019). Stoga, akumulacija glukoze i fruktoze u listovima *flacca* koji sintetišu asimilate može se objasniti smanjenim transportom fotosintata ka potrošačkim tkivima usled inhibicije rasta koja je vezana za smanjen nivo ABA (slika 13) (Wang i sar., 2020).

Nakon rehidracije, sadržaj ukupnih rastvornih šećera u oba genotipa vraćen je na početne uslove, što je u korelaciji sa ranijim istraživanjem na listovima karfiola, objavljenom od strane Wu i sar. (2012). Takođe, sličan trend u sadržaju glukoze i fruktoze nakon rehidracije zabeležen je i kod nekih leguminoza (Foster i sar., 2015).

Za razliku od biljaka gajenih na nižem intenzitetu svetlosti, pri svetlosti intenziteta $800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ zbir ukupnih najzastupljenijih ugljenih hidrata (Glc, Fru i Suc) je na početku konstitutivno viši u WT, nego u *flacca*, dok se sa razvićem biljaka ove razlike između genotipova gube. Suša u ovim uslovima nije izazvala akumulaciju ukupnih ugljenih hidrata, kao što je dobijeno na nižem intenzitetu svetlosti, mada je u drugom i trećem ciklusu primećen njihov blagi porast kod WT biljaka. Nivo sorbitola, drugog najzastupljenijeg ugljenog hidrata koji, pokazano, ima značaja u održavanju osmotskog potencijala kod *flacca* na niskom svetlu, pri visokom intenzitetu svetlosti bio je četiri puta manji u *flacca* nego u WT, dok nijedan ciklus suše nije značajno uticao na promenu njegove koncentracije.

Usled toga što nema značajnog porasta najzastupljenijih ugljenih hidrata kod WT i *flacca* biljaka na visokom svetlu u suši ne može se govoriti o njihovoj akumulaciji kao zaštitnom mehanizmu pri izlaganju vodnom stresu.

5.4. Uloga slobodnih aminokiselina u suši i rehidraciji

Prilikom izlaganja biljaka jednom ciklusu suše pri intenzitetu $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ nivo ukupnih slobodnih aminokiselina povećao se u oba genotipa; u WT biljkama suša je indukovala dupliranje sadržaja aminokiselina, dok je u *flacca* taj porast iznosio oko 40%. Dobijeni rezultati su u korelaciji sa ranijim istraživanjima, gde je suša indukovala akumulaciju aminokiselina u susamu (You i sar., 2019), kukuruzu (Obata i sar., 2015) ili ječmu (Chmielewska i sar., 2016). Takođe, povećanje sadržaja slobodnih aminokiselina može biti povezano sa povećanom proteolizom, čime se doprinosi osmotskom prilagođavanju biljaka u suši (Ramanjulu i Sudhakar, 1997). Najizraženija promena u aminokiselinskom profilu kod biljaka u suši podrazumevala je povećanje nivoa prolina, i to 9 puta u *flacca*, odnosno 13 puta u divljem tipu. Takođe, dehidracija je indukovala i akumulaciju glutaminske kiseline, glavnog prekursora za biosintezu prolina (Szabados i Savoure, 2010), te je u divljem tipu to povećanje iznosilo 70%, odnosno 35% u *flacca*. Sušom indukovana akumulacija prolina zabeležena je i u ranijim istraživanjima (Liang i sar., 2013; Montesinos-Pereira i sar., 2014; Anjum i sar., 2017b). Osim što ima ulogu u osmotskom prilagođavanju na stresne uslove, prolin ima brojne druge funkcije: učestvuje u stabilizaciji peptidnih struktura, sprečava agregaciju proteina, preko hidroksil-prolina učestvuje u očvršćavanju ćelijskog zida, a učestvuje kao antioksidant u eliminaciji ROS (Kavi Kishor i sar., 2015; Sharma i sar., 2011; Wu i Bolen, 2006). Izrazita akumulacija prolina pokazana je i u *sitiens* mutantu paradajza prilikom izlaganja stresu soli, dok je njegov sadržaj ostao nepromenjen u divljem tipu (Poor i sar., 2019).

Biosinteza prolina indukovana sušom može se odvijati na ABA-zavisano, odnosno ABA-nezavisano način (Sharma i sar., 2011; Savouré i sar., 1997; Shinozaki i Yamaguchi-Shinozaki, 1997). U ovom eksperimentu akumulacija prolina u suši praćena je povećanjem sadržaja ABA u oba genotipa, pri čemu, kao što je već rečeno, taj porast je bio veći u WT, nego u *flacca*. Naglo smanjenje sadržaja slobodnog prolina nakon rehidracije može se pripisati tome da je uložena u očvršćavanje ćelijskog zida, što je sa druge strane, veoma važan pokazatelj njegovog značaja

u aklimaciji paradajza na vodni stres. Lukić i sar. (2020) pokazali su da prilikom izlaganja biljaka vodnom stresu dolazi do značajnog povećanja aktivnosti antioksidativnih enzima, čiji nivo ostaje povišen u određenom vremenskom periodu nakon suše, što se može povezati sa boljim prilagođavanjem biljaka na sledeći stres. S tim u vezi, može se pretpostaviti da povećana akumulacija prolina kod rehidratiranih *flacca* biljaka učestvuje u memoriji stresa koja doprinosi da se lakše izbore sa ponovljenom sušom. U ovom istraživanju je pokazano da mehanizmi kojima se odvija biosinteza prolina nisu regulisani na ABA-zavisani način, odnosno da je sadržaj ABA u *flacca* ispod nivoa koji je potreban da može da bude okidač za aktivaciju njegove biosinteze. Značaj prolina ogleda se i u tome što je važan konstituent komponenti matriksa ćelijskog zida (Cassab i Varner, 1988; Showalter, 1993). Samim tim, može se pretpostaviti da tanji i nežniji listovi kod *flacca* se javljaju usled narušene preraspodele prolina u vanćelijskom prostoru, odnosno njegovog umanjenog doprinosa u sintezi proteina ćelijskog zida, što je nagovešteno odloženim smanjenjem sadržaja prolina u rehidratiranim biljkama (slika 23). Različiti metabolički putevi u koje su uključene aminokiseline, kao što su asparaginska kiselina, asparagin, treonin, alanin, ornirin, kao i neke aminokiseline razgranatog bočnog lanca (valin i leucin) povezani su sa tolerancijom na sušu kod biljaka (You i sar., 2019; Pires i sar., 2016). Takođe, aminokiseline razgranatog bočnog lanca značajne su za razvijanje tolerancije na sušu zato što predstavljaju alternativne izvore supstrata za respiraciju (Pires i sar., 2016). Pomenute aminokiseline doniraju elektrone koji se koriste u respiratornom lancu u uslovima stresa (Araújo i sar., 2010). U brojnim istraživanjima je pokazano da se nivo nekih aminokiselina razgranatog bočnog lanca povećava pri izlaganju biljaka suši, kao na primer u pšenici (Bowne i sar., 2012), mahunarkama (Sanchez i sar., 2012) ili ječmu (Swarcewicz i sar., 2017), ali i da se nakon rehidratacije njihov nivo vraća na kontrolne vrednosti, što ukazuje na to da je akumulacija ovih aminokiselina pod uticajem sredinskih faktora (Joshi i sar., 2010). Sa druge strane, Urano i sar. (2009) su pokazali da prilikom izlaganja *Arabidopsis* suši dolazi do indukcije u ekspresiji gena *BCAT*, čiji proteinski produkt je uključen u biosintezu ovih aminokiselina, dok u *NCED3 nc3-2 knockout* mutantu je suprimiran, što ukazuje na ulogu ABA u ekspresiji *BCAT* i posledično na regulaciju metabolizma aminokiselina bočnog lanca. Međutim, usled različitih promena nivoa leucina, izoleucina i valina u okviru oba genotipa tokom suše, može se pretpostaviti da ABA nije jedina koja utiče na homeostazu ovih aminokiselina.

S obzirom na smanjenje intracelularnog ugljen-dioksida može se pretpostaviti da pri dehidrataciji kod WT biljaka dolazi do povećane fotorespiracije koja je uslovljena smanjenom provodljivošću stoma izazvanom povećanim sadržajem ABA. Slični rezultati u kojima je povećana fotorespiracija indukovana sušom i zatvaranjem stoma pokazani su od strane Pornsiriwong i sar. (2017). Međutim, odnos glicina i serina za koji je pokazano (Novitskaya i sar., 2002) da direktno korelira sa fotorespiratornim fluksom, bio je niži kod oba genotipa pri vodnom stresu, da bi se nakon rehidratacije povećao 2–3 puta. Usled toga što se amonijak oslobođen iz glicina prilikom fotorespiracije ponovo vraća u glicin preko serina, alanina ili asparaginske kiseline, takođe se može pretpostaviti da postoji negativna korelacija između alanina i asparaginske kiseline sa fotorespiratornim fluksom (Novitskaya i sar., 2002). Međutim, u ovom istraživanju je pokazano da se alanin i asparaginska kiselina povećavaju pri vodnom stresu, odnosno može se pretpostaviti da je primarni donor amonijaka u suši u ovom slučaju bila aminokiselina serin. Takođe, značajna akumulacija glutamina pri suši je zabeležena u *flacca*, što se može pripisati reasimilaciji sušom indukovane akumulacije amonijaka, što je pokazano u literaturi u listovima kod osetljivog i tolerantnog kultivara duda (Ramanjulu i Sudhakar, 1997). Slobodan asparagin u biljkama predstavlja rezervu azota, a takođe je zadužen za njegov transport usled visokog N/C odnosa. Pretpostavka je da se odnos asparagina i asparaginske kiseline takođe, pored nivoa hlorofila, može smatrati markerom statusa azota u biljkama (Lea i sar., 2007). Kod WT biljaka odnos asparagina i asparaginske kiseline ostao je nepromenjen nakon vodnog deficita, dok se sa druge strane, tri puta povećao

u *flacca* biljkama (slika 25 i slika 22a), što može da ukaže na to da je kod mutanta izvršena bolja suplementacija azotom, verovatno nekim alternativnim mehanizmima.

5.5. Uloga ABA u nastanku memorije stresa izazvane ponavljenim ciklusima suše

Bez obzira na postojanje konstitutivnih razlika u sadržaju ABA između genotipova, prilikom izlaganja biljaka trima ciklusima suše na svetlosti većeg intenziteta u oba genotipa došlo je do akumulacije ABA, premda u većoj meri u WT biljkama (slika 29). U WT biljkama nakon svakog ciklusa suše, rehidratacija je uticala da se sadržaj ABA vrati na kontrolne vrednosti, dok je u *flacca* mutantu sličan trend zabeležen jedino nakon drugog ciklusa suše. Ove razlike u rehidrataciji između genotipova mogu biti posledica toga da je ABA u formi ABA-konjugata dominantna forma u *flacca* u tačkama rehidratacije gde ostaje u vidu rezerve za nadolazeći stres suše (Auler i sar., 2021b). Ovakve vrednosti za ABA kod *flacca* mogu se pripisati tzv. ABA-indukovanom „kasnom efektu“ u kome se preko ABA kontroliše nivo transpiracije i stepen otvorenosti stoma u ranoj fazi oporavka nakon suše (Đurić i sar., 2020). Ovaj ABA-indukovan „kasni efekat“ može se smatrati jednom vrstom sigurnosnog mehanizma koji obezbeđuje biljkama brzi oporavak nakon suše (Dörffling i sar., 1977; Stålfelt, 1955). Usled izlaganja biljaka suši došlo je do povećane ekspresije *NCED1* gena što je uskladu sa zabeleženom ABA akumulacijom u listovima paradajza (slika 35). Dobijeni rezultati za povećanu ekspresiju *NCED1* gena u suši pokazani su u literaturi (Auler i sar., 2021b; Đurić i sar., 2020; Milosavljević i sar., 2012; Muñoz-Espinoza i sar., 2015). Ovi rezultati ukazuju na pretpostavku da je veća ekspresija *NCED1* gena u WT u trećem ciklusu suše posledica *de novo* ABA biosinteze, dok je u prvom i drugom ciklusu akumulacija ABA najverovatnije posledica sinteze od već postojećih prekursora, kao i oslobađanja ABA iz ABA-konjugata. U literaturi se mogu naći podaci koji ukazuju da su ROS forme u uslovima stresa takođe uključene u neezimsku konverziju prekursora u ABA, što bi moglo doprineti povećanoj ABA akumulaciji kod ABA-deficijentnih mutanata (McAdam i sar., 2017; Postiglione i Muday, 2020). Štaviše, prema literaturnim podacima, akumulacija ABA često nije u korelaciji sa ekspresijom gena uključenih u njenu biosintezu, zato što nivo ABA zavisi i od njene redistribucije unutar listova, kao i između korena i izdanka (Auler i sar., 2021b; Davies i sar., 2005; Hartung i sar., 2002).

5.6. Uticaj ponovljenih ciklusa suše na osetljivost stoma

Zatvaranje stoma predstavlja brži fiziološki odgovor koji sprečava odavanje vode u uslovima suše. Na svetlosti višeg intenziteta, kada su biljke divljeg tipa bile izložene prvom ciklusu suše, došlo je do povećanja u sadržaju ABA, a taj procenat indukovane ABA je progresivno opadao tokom drugog i trećeg ciklusa suše (9–14%), što je bilo praćeno skoro potpuno zatvorenim stomama u trećem ciklusu ($34,9 \text{ mmolm}^{-2} \text{ s}^{-1}$). Međutim, u suši su se stome delimično zatvorile i kod *flacca*, a pri tome nivo transpiracije je pokazao relativno visoke vrednosti u sva tri ciklusa u poređenju sa WT, tj. vrednost za provodljivost stoma (g_s) je bila 2–5 puta povećana kod *flacca*. Kod *flacca* je tek u trećem ciklusu zatvaranje stoma predstavljalo primarnu reakciju koja je nastala u odgovoru na vodni deficit, a bez obzira na to što su postojale razlike u provodljivosti stoma između genotipova tokom trajanja čitavog eksperimenta (slika 30). Zatvaranje stoma je prvenstveno bilo određeno hemijskim signalom, tj. nivoom ABA (Buckley, 2005; Munemasa i sar., 2015), ali i hidrauličkim signalom, odnosno promenom vodnog potencijala (Henry i sar., 2019).

Kao što je već rečeno, zatvaranje stoma kod oba genotipa bilo je najizraženije u trećem ciklusu suše, dok su promene kako u hemijskom, tako i hidrauličkom signalu bile najmanje izražene. Ovo je bilo praćeno istim trendom u promeni pH vrednosti ksilemskog soka kod oba genotipa (sa 5,30 na 5,95 u WT, i 5,10 na 5,65 u *flacca*). Slično obrazac u ponašanju ali ne i stepen efiksnosti tokom procesa zatvaranja stoma kod WT i *flacca* može ukazati na postojanje alternativnih mehanizama koji regulišu otvorenost stoma pri ponovljenoj suši. Samim tim, može se pretpostaviti da izlaganje biljaka ponovljenoj suši predstavlja svojevrsan okidač koji omogućava promenu osetljivosti stoma na ABA u zavisnosti od promene vodnog potencijala listova i pH. Takođe se može pretpostaviti da opadanje u sadržaju ABA je kompezovano pokretanjem alternativnih signalnih mehanizma, koji utiču na provodljivosti stoma i učestvuju u razvijanju memorije stresa. Dobijeni rezultati ukazali su na to da sadržaj ABA koji je potreban da podstakne brzo zatvaranje stoma mora da pređe određeni minimalni prag kod *flacca*. Prikazani rezultati u ovom istraživanju ukazuju na to da postoji drugačiji odnos između ABA, vodnog potencijala i provodljivosti stoma kod WT i *flacca*, odnosno da su hidraulički signalni koji učestvuju u zatvaranju stoma dominantni kod *flacca*, a da je ABA-zavisan put dominantan kod WT (slike 29 i 30). Nakon prvog ciklusa suše indukovano je pad vodnog potencijala kod WT i *flacca*, koji se nakon rehidratacije povećava i dostiže one vrednosti koje su veoma bliske kontrolnim, dok je u sledećim ciklusima potencijal zadržavao niže vrednosti u odnosu na kontrolne. Ovo je u skladu sa podacima u istraživanju koje je rađeno na *Arabidopsis thaliana*, za koji je pokazano da sredinski i faktori tokom razvića utiču na ABA-stečenu osetljivost stoma, gde je uočeno da stadijum ontogeneze kod listova, kao i relativna vlažnost vazduha u njihovoj okolini utiču na stepen osetljivosti stoma za promenjen sadržaj ABA (Pantin i sar., 2013).

5.7. Uticaj tri ciklusa suše na akumulaciju prolina

Kao što je opšte prihvaćeno, akumulacija osmotski aktivnih jedinjenja smatra se ključnim zaštitnim mehanizmom biljaka u suši. U prvom delu ovog istraživanja, kada su biljke gajene na intenzitetu svetlosti $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ i bile podvrgnute jednom ciklusu suše, akumulacija prolina u oba genotipa bila je slična (10–13 puta), bez obzira na njihove konstitutivne razlike (slika 23). Međutim, u drugom delu istraživanja, kada su biljke bile podvrgute trima ciklusima suše i gajene na $800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ dobijen je drugačiji trend akumulacije prolina. Pokazano je da je prvo izlaganje biljaka suši dovelo do tri puta veće akumulacije prolina u WT, nego u *flacca* biljkama (slika 33). Ovo je u suprotnosti sa rezultatima opisanim od strane Aroca i sar. (2008) gde je suša imala negativan uticaj na akumulaciju prolina u *sitiens* mutantu paradajza u poređenju sa divljim tipom. Suprotno tim rezultatima, stres solima indukovao je veću akumulaciju prolina u *sitiens* u odnosu na WT (Poor i sar., 2018). Povišeni nivo akumulacije prolina zabeležen je i u tolerantnim genotipovima pšenice i trave *Axonopus compressus* u poređenju sa osetljivim kultivarima (Saeedipour, 2013; Nawaz i sar., 2020). Poređenje dinamike razgradnje prolina u rehidrataciji nakon perioda suše u *flacca* na $800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ sa rezultatima na nižem intenzitetu svetlosti, pokazuje efekat svetlosti na fotosintetsku aktivnost u uslovima suše, odnosno na promene u metabolizmu prolina (Ábrahám i sar., 2003). Najizraženija akumulacija prolina u oba genotipa bila je u prvom ciklusu suše, dok su biljke nakon drugog i trećeg ciklusa suše slabije reagovala akumulacijom prolina. Nakon trodnevnog perioda rehidratacije nivo prolina je vraćen na kontrolne vrednosti. Leufen i sar. (2016) pokazali su sličan trend akumulacije prolina u listovima šećerne repe u ponovljenoj suši, dok je u listovima kafe i listovima biljke *Dipteryx alata* najveći stepen akumulacije prolina zabeležen u trećoj suši (Alves i sar., 2020). Kod biljaka divljeg tipa vodni potencijal opadao istim intenzitetom u sva tri ciklusa suše, u *flacca* mutantu taj pad je bio najizraženiji u drugom i trećem ciklusu suše. Nakon rehidratacije u

drugom i trećem ciklusu kod oba genotipa, vrednosti vodnog potencijala i dalje su bile nešto niže nego u kontrolnim biljkama, što upućuje na zaključak da kapacitet akumulacije osmolita nije bio dovoljan kako bi kompenzovao opadanje vodnog potencijala tokom ponovljene suše. Takođe, nije uočena ni korelacija između biosinteze ABA i prolina u suši, što dalje implicira da akumulacija prolina nije bila posredovana promenom ABA (Sharma i sar., 2011; Verslues i Bray, 2006; Yoshida i sar., 1997). Kao što je već pomenuto u prvom delu diskusije i ovde se može pretpostaviti da je alternativna uloga prolina u suši da učestvuje u izgradnji, tj. očvršćavanju ćelijskog zida (Aroca i sar., 2008) preko proteina bogatih (hidroksil)prolinom. Pretpostavka je da je taj proces regulisan preko snabdevanja ugljenim hidratima iz fotosinteze, kao i da produkcija različitih jedinjenja u fotosintezi i fenolnih jedinjenja na slabijem intenzitetu svetlosti limitira očvršćavanje ćelijskih zidova.

Uzimajući u obzir vrednosti za vodni potencijal (ψ), prvi ciklus suše imao je mnogo veći uticaj u WT, nego u mutantu, što je praćeno i većom akumulacijom prolina u WT, nego u *flacca* (slike 31 i 33). Sa druge strane, u drugom i trećem ciklusu suše suprotan trend za vrednosti vodnog potencijala su zabeležene u *flacca*. Takođe, u oba genotipa, u svakom sledećem ciklusu razlike između vrednosti vodnog potencijala između dehidratiranih i rehidratiranih biljaka bile su sve manje (Yan i sar., 2017).

5.8. Modifikacija ćelijskog zida i njena uloga u povećanju tolerancije biljaka na stres suše

U ovom poglavlju diskutovani su rezultati koji se odnose na morfološke parametre biljaka paradajza koje su gajene na intenzitetu svetlosti $800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ nakon produženog oporavka posle prvog ciklusa suše i nakon tri ciklusa suše. Smanjenje lisne površine, kao i redukcija suve mase u WT biljkama zabeležene su nakon tri ciklusa suše, ali ne i nakon jedne sušne epizode (tabela 4). Slično, Gomes i sar. (2010) su pokazali da izlaganje biljaka trima ciklusima suše utiče na inhibiciju njihovog rastenja. Sa druge strane, u *flacca* je pokazano da je suša (kako jedan, tako i tri ciklusa) dovela do gotovog udvostručavanja suve mase listova, dok je SLA značajno redukovana u odnosu na kontrolne biljke. Ovi rezultati su u skladu sa rezultatima opisanim u radovima gde je pokazano da je suša imala stimulativan efekat na rastenje kod oporavljenih biljaka lucerke (Erice i sar., 2010) i kukuruza (Sun i sar., 2016). Sa druge strane, može se pretpostaviti da je manji efekat na procese rastenja u *flacca* nakon tri ciklusa suše u odnosu na produženi oporavak nakon prve suše uzrokovan kraćim periodima oporavka nakon druge i treće sušne epizode. Samim tim, može se pretpostaviti da aklimacioni mehanizmi indukovani sušom uključuju redistribuciju ili povećanu sintezu jedinjenja, kao što su ugljeni hidrati, organske kiseline ili antioksidansi (Chen i sar., 2015; Rosa i sar., 2009). Slična produkcija suve biomase u oporavljenim biljkama (nakon R_1 i R_3) ukazuje na to da je stres suše indukovao razvijanje adaptacionih mehanizama koji su podrazumevali samo promene na morfološkom nivou. Dalje, ako bi se posmatrala povećana suva masa listova, kao i lisna površina kod R_1 biljaka, moglo bi se govoriti o značaju trajanja perioda oporavka na razvijanje memorije kod biljaka (Xu i sar., 2009). Ovakvo ponašanje započinje tokom suše i uspostavlja se tokom perioda oporavka.

Izlaganje biljaka suši dovodi do remodeliranja ćelijskog zida i do promene u njegovoj arhitekturi. Ove promene podrazumevaju akumulaciju i umrežavanje polimera kao što su celuliza i hemiceluloza (Tenhaken, 2015), čime se vrši modulacija ćelijskog zida kako bi se održali njegov turgor i elastičnost u uslovima suše (Moore i sar., 2008).

Kao što je poznato, najveći doprinos u suvoj masi kod biljaka daju komponente ćelijskog zida. Samim tim, može se pretpostaviti da je u *flacca* sušom indukovano povećanje biomase posledica akumulacije asimilata i njihove ugradnje u ćelijski zid. Pored toga,

akumulacijom komponenti ćelijskog zida došlo bi do zadebljanja listova, čime bi se u stvari moglo objasniti zašto je suva masa oporavljenih *flacca* biljaka (R_1 i R_3) veća od kontrolnih, ali je SLA redukovana (tabela 4). Ove morfološke promene izazvane sušom mogu se pozitivno odraziti na fotosintetsku efikasnost usled gusto zbijenih ćelija (Wellstein i sar., 2017). Takođe je pokazano u literaturi da je nakon suše i perioda oporavka došlo do stimulacije procesa fotosinteze, odnosno može se pretpostaviti da su povećana fotosinteza i porast biomase povezani sa time što se vrednosti za provodljivost stoma blago povećavaju u odnosu na vrednosti iz suše (Xu i sar., 2009).

Na osnovu poređenja FTIR spektara ćelijskih zidova oba genotipa u ovom istraživanju je dalje ispitan uticaj suše na promene u njihovoj strukturi (Kačuráková i sar., 2002; Kalisz i sar., 2021; Liang i Marchessault, 1959; Marchessault, 1962; Simonović i sar., 2011; Stewart, 1996; Szymanska-Chargot i Zdunek, 2013). Shodno tome, a u zavisnosti od toga da li su biljke bile izložene jednom ili trima ciklusima suše došlo je do različite akumulacije komponenti ćelijskog zida u oba genotipa. Što se tiče biljaka divljeg tipa, najveći stepen akumulacije celuloze, hemiceluloze i lignina primećen je kod biljaka koje su bile izložene produženom oporavku nakon jednog ciklusa suše (R_1), ali ne i u R_3 biljkama (slike 38–40). Sa druge strane, najizraženija promena u ćelijskom zidu u *flacca* zabeležen je posle oporavka nakon tri ciklusa suše. Sadržaj celuloze, ukupne hemiceluloze, kao i ksilogluktana kao najdominantnije hemicelulozne komponente bio je značajno povećan u oporavljenim biljkama nakon tri ciklusa suše, što je takođe bilo praćeno akumulacijom lignina. Sa druge strane, najizraženije promene u celulozno-hemiceluloznom kompleksu u divljem tipu uočene su u oporavljenim biljkama nakon jedne sušne epizode. Značaj akumulacije celuloze i hemiceluloze u ćelijskom zidu u suši ogleđa se u tome što njihova povećana zastupljenost doprinosi održavanju ćelijskog turgora i mehaničke potpore i rigidnosti, što predstavlja jedan od načina očuvanja ćelijskih struktura od negativnog efekta vodnog stresa, a sa druge strane omogućava kontinualni rast (Le Gall i sar., 2015; Roig-Oliver i sar., 2020a, 2020b). Takođe, u brojnim studijama je pokazano da u uslovima stresa suše dolazi do povećane akumulacije lignina, kao i povećane aktivnosti enzima koji su uključeni u njegovu biosintezu (Andrade i sar., 2019; Gu i sar., 2020; Jiang i sar., 2012; Li i sar., 2020). Lignin kao hidrofobni polimer sačinjen od fenilpropanoidnih jedinica doprinosi očvršćavanju ćelijskog zida tako što ostvaruje kovalentne interakcije sa celulozom i hemicelulozom, čime se povećava mehanička potpora zida, ali se utiče i na njegova propusna svojstva (Szechyńska-Hebda i sar., 2016). S obzirom na fizičko-hemijske osobine lignina, njegova akumulacija na površini ćelija sprečava gubitak vode, te samim tim doprinosi razvoju tolerancije na stres (Li i sar., 2020).

Analizom FTIR spektara takođe je pokazano da je suša indukovala biosintezu pektina, čiji je sadržaj prvenstveno bio povećan u zidu *flacca* listova oporavljenih biljaka i to nakon tri ciklusa suše. Sa druge strane, jedan ili tri ciklusa suše u WT nije uticao na sadržaj pektina, te je njegov sadržaj ostao nepromenjen. Sa druge strane, pokazano je da je sadržaj bočnih lanaca pektinskih polimera značajno uvećan i to prvenstveno kod kultivara koji su tolerantni na sušu (Leucci i sar., 2008). U brojnim istraživanjima je pokazano da se u ćelijskom zidu kultivara tolerantnih na sušu akumulira mnogo više pektina nego u osetljivim kultivarima. Povećani nivo pektina u ćelijskom zidu oporavljenih biljaka u odnosu na kontrolne biljke zabeležen je u listovima šumskog duvana (Clemente-Moreno i sar., 2019) i suncokreta (Roig-Oliver i sar., 2020a). Povišeni nivo pektina u ćelijskom zidu oporavljenih biljaka nakon tri ciklusa suše ukazuje na njegov značaj kao gelirajućeg agensa i antidesikanta koji učestvuje u održavanju hidratisanosti ćelijskog zida tokom vodnog stresa (Roig-Oliver i sar., 2020b).

Sušom indukovano zadebljanje tkiva provodnog sistema (Chen i sar., 2006) moglo bi da doprinese efikasnijem održavanju turgora kod biljaka sklonim brzom uvenuću, kao što je *flacca*. Očvršćavanje i zadebljavanje ćelijskog zida koje je praćeno promenama i u njegovoj strukturi su procesi koji su usko povezani sa ćelijskim rastom i stresom kojem je biljka

izložena (Xu i sar., 2009). Vodni deficit zasigurno je doprineo akumulaciji komponenti ćelijskog zida i njihovom dodatnom umrežavanju, što dalje dovodi do njegove fortifikacije (očvršćavanja) i sprečavanja odavanja vode transpiracijom.

Međutim, debljanje ćelijskog zida se verovatno povećava sa svakim sledećim ciklusom suše, te na taj način može stvoriti neku vrstu fiziološke memorije i posledično da poboljša toleranciju biljaka na sušu. Sveobuhvatno posmatrano, akumulacija gore pomenutih komponenti ćelijskog zida u listovima *flacca* bila je najizraženija nakon tri ciklusa suše, što može da ukazuje na to da je mehanizam privikavanja biljaka na sušu bio praćen morfološkim promenama, koje doprinose boljem podnošenju nastupajućih sušnih epizoda.

5.9. Sušom indukovani poremećaji redoks ćelijske homeostaze u listovima

Opšte prihvaćen uzrok oksidativnog stresa u biljkama koje su izložene suši jeste inhibicija asimilacije CO₂ usled zatvaranja stoma. U toj situaciji može doći do stimulacije Melerove reakcije i oksigenacije Rubisco enzima što favorizuje fotorespiraciju, čiji je jedan od intermedijera H₂O₂ (Noctor i sar., 2002a). Literaturni podaci ukazuju na indukciju enzimskih i neenzimskih sistema kod plodova biljaka gajenih na polju, a koje su bile izložene suši (Klunklin i Savage 2017). Pri jačem i dužem izlaganju stresu dva kultivara koji se razlikuju u toleranciji na sušu, pokazano je da je nivo indukovanih antioksidativnih enzima u korelaciji sa tolerancijom na vodni stres (Kusvuran i Dasgan, 2017). Pojačani efekat oksidativnog stresa usled dodatnog povećanja koncentracije ROS u ćelijskim kompartmentima može biti izazvan smanjenjem RWC. U tim uslovima, narocito na višim intenzitetima svetlosti, može doći i do fotooksidacije pigmenta (Hasanagić i sar., 2020) i narušavanja lipidne strukture membrana (Laxa i sar., 2019). Sveobuhvatna analiza transkriptoma i proteoma antioksidativnog metabolizma biljaka ukazala je da je tolerancija na sušu u korelaciji sa aktivacijom askorbatnog metabolizma u odnosu na tiol-redoks regulatorni sistem (Laxa i sar., 2019). Uzimajući u obzir da je askorbat najzastupljeniji neenzimski antioksidant u biljnim ćelijama, kao i da se njegov sadržaj jednostavno određuje, veoma često se koristi u biljnoj fiziologiji stresa u cilju određivanja stepena oksidativnog stresa i antioksidativnog odgovora (Majer i sar., 2016). U ovom istraživanju kao indikator poremećaja redoks-homeostaze u biljci korišćen je procenat oksidovanog askorbata. Dobijene vrednosti za redoks stanje askorbata kod WT biljaka u suši (slike 42 i 44) nisu ukazale da je smanjenje stomatalne provodljivosti značajno povećalo produkciju ROS. Kako do eventualne akumulacije ROS može doći samo ako ona prevazilazi antioksidativni kapacitet ćelija koji je uslovljen enzimskim i neenzimskim komponentama antioksidativne zaštite (Noctor i sar., 2016), može se smatrati da je u našem istraživanju taj kapacitet bio dovoljan da zaštiti ćelije od oksidativnog stresa, bez obzira na primenjeni intenzitet svetlosti.

Promene u sadržaju redukovane i oksidovane forme askorbata izazvane sušom ukazuju na narušenu ćelijsku redoks homeostazu, što može biti posledica ili aktivacije ROS signalnog puta i aktiviranje antioksidativne odbrane, odnosno povećanje rizika od oštećenja uzrokovano oksidativnim stresom usled akumulacije ROS (Noctor i sar., 2014).

U eksperimentu na svetlosti intenziteta 800 m⁻² s⁻¹ pokazano je da sušom indukovana oksidacija askorbata u *flacca*, ali ne i u WT ukazuje na veći stepen osetljivosti *flacca* na vodni stres (slike 43 i 44). Stimulacija biosinteze askorbata u drugom i trećem ciklusu suše nakon perioda oporavka doprinosi povećanom redoks-stanju askorbata u *flacca*. Iako sadržaj ukupnog askorbata, kao i redoks stanje varira tokom razvojnog procesa kod oba genotipa, konstitutivno viši sadržaj je primećen u WT u odnosu na *flacca* tokom čitavog trajanja eksperimenta. Ova pojava je zabeležena i u istraživanju opisanom od strane Petrović i sar.

(2020), dok je sa druge strane pokazano da se u listovima *notabilis* mutanta askorbat akumulira u sličnoj koncentraciji kao i u listovima divljeg tipa (Li i sar., 2015). Slična zapažanja pokazana su i u istraživanju rađenom na *abi4-insensitive* mutantu *Arabidopsis thaliana* (Zhang i sar., 2016). Sa druge strane, povećano redoks stanje askorbata u *flacca* u prvom ciklusu suše kod biljaka gajenih na svetlosti intenziteta $250 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ukazalo je na aktiviranje sistema antioksidativne odbrane i indirektno prisustvo ROS, a koje u sledeća dva ciklusa suše nestaje (slika 42).

Brojna istraživanja su pokazala da prilikom izlaganja biljaka vodnom stresu dolazi do značajne akumulacija DHA u odnosu na kontrolne uslove, naročito kod kultivara koji su osetljivi na sušu (Gruszka i sar., 2018; Zhang i sar., 2019; Iyer i sar., 2013). Sharma i Dubey (2005) su pokazali da prilikom izlaganja pirinča blagom i jakom stresu suše dolazi do smanjenja sadržaja askorbata u korenu i izdanku biljaka, što je praćeno i smanjenjem njegovog redoks-stanja. Takođe, Hasanagić i sar. (2020) su pokazali da izlaganje biljaka paradajza prolongiranoj suši dovodi do smanjenja akumulacije askorbata u listovima, dok je sadržaj DHA ostao nepromenjen tokom svih 28 dana vodnog deficita. Ova istraživanja su takođe u skladu sa istraživanjima rađenim na ječmu (Gruszka i sar., 2018) i pirinču (Chawla i sar., 2013) gde je pokazana povećana akumulacija askorbata u tolerantnim u odnosu na osetljive kultivare.

Povećana sinteza ukupnog askorbata u WT u rehidratisanim biljkama u trećem ciklusu (slike 41 i 43), kao i povećana akumulacija epidermalnih flavonoida u istoj tački (slika 48) ukazuju na potencijalni značaj antioksidanasa u razvijanju memorije prilikom izlaganja biljaka ponovljenom stresu suše. Ovi podaci su u skladu sa rezultatima publikovanim od strane Lukić i sar. (2020) gde je ustanovljeno da je memorija biljaka povezana sa aktivnošću enzima antioksidativne odbrane. Takođe, poznato je da svetlost visokog intenziteta, kao i UV-B zračenje indukuju akumulaciju epidermalnih flavonoida (Vidović i sar., 2015a). Međutim, u ekperimentu na intenzitetu svetlosti $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ nije došlo do značajne akumulacije epidermalnih flavonoida, što je direktni pokazatelj toga da sam stres suše u odsustvu svetlosti visokog intenziteta, odnosno UV-B zračenja nije mogao da bude okidač koji bi izazvao značajne promene u njihovoj koncentraciji.

U uslovima vodnog stresa često dolazi do smanjene sinteze hlorofila (Jaleel i sar., 2009). Međutim, u ovom istraživanju je pokazano da vodni stres na oba intenziteta svetlosti nije inhibirao sintezu hlorofila u oba genotipa. Pri intenzitetu svetlosti od $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ u drugom i trećem ciklusu suše pokazana je povećana biosinteza hlorofila kod WT, dok je na svetlosti intenziteta $800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ova promena uočena kod oba genotipa. Povećani sadržaj hlorofila u uslovima stresa suše može biti posledica odavanja vode, odnosno opadanja ćelijskog turgora, kao i smanjenja lisne površine, što finalno dovodi do povećane koncentracije hlorofila (Rolando i sar., 2015). Povišeni nivo hlorofila u odnosu na kontrolne biljke u trećem ciklusu suše kod oba genotipa u skladu je sa smanjenom lisnom površinom biljaka koja je izmerena na kraju eksperimenta, kao i smanjenom biomasom listova (tabela 4).

5.10. Uticaj ponovljenih ciklusa suše i svetlosti različitog intenziteta na ekspresiju nekodirajućih RNK molekula

U ovom istraživanju, pri niskom i visokom intenzitetu svetlosti nisu detektovane nekodirajuće RNK manje od 35 nukleotida (nt); tj. profil izolovanih nkRNK je u opsegu od 35 do 300 nt. Pri nižem intenzitetu svetlosti isti profil nkRNK izolovan je u oba genotipa, odnosno može se samo govoriti o različitom nivou akumulacije pojedinačnih nkRNK u WT i *flacca*. Sa druge strane, na višem intenzitetu svetlosti uočavaju se konstitutivne razlike između

genotipova, odnosno u WT nisu detektovane nkRNK veličine oko 100 nt i 300 nt, dok je u *flacca* primećeno odsustvo nkRNK veličine 50 nt.

Do sada veoma malo podataka ima o nekodirajućim RNK veličine 50–300 nt. Pokazano je da su one regulisane sličnim genetskim i epigenetskim mehanizmima kao i RNK koje kodiraju proteine, kao i da pokazuju određene obrasce ekspresije koji su regulisani razvićem. Pokazano je da usled smanjene ekspresije pojedinih nekodirajućih RNK srednje dužine dolazi do očigledne promene na molekularnom nivou, kao i do promena na nivou fenotipa, ukazujući na njihov značaj tokom rastenja i razvića biljaka (Liu i sar., 2013; Wang i sar., 2017). Ove nkRNK učestvuju u procesima targetne mimikrije mRNK, ali i u različitim fazama tokom epigenetske regulacije (Franco-Zorrilla i sar., 2007; Heo i Sung, 2011). Brojne studije su pokazale da izlaganje biljaka stresu suše dovodi do promene u ekspresiji pojedinih dugačkih nekodirajućih RNK (preko 200 nt) (Qi i sar., 2013; Chung i sar., 2016). Takođe, neki istraživači dugačkim nekodirajućim RNK molekulima smatraju i one čija dužina prelazi tek 100 nt, te da su mnogi od njih pomenuti prekursori mikroRNK manje dužine (Gomes i sar., 2013). Pošto je u ovom istraživanju urađeno samo razdvajanje nekodirajućih RNK na osnovu dužine, ali ne i njihova identifikacija, može se pretpostaviti da su neke RNK preko 100 nt ustvari prekursori mikroRNK koje ovde nisu detektovane, a koje su uključene u razvijanju tolerancije na stres suše. Takođe, dugačke nekodirajuće RNK su i prekursori različitih mikroRNK koje su uključene u metabolizam azota ili u odbrani od različitih patogena (Wang i sar., 2017). Ekspresija mikroRNK u suši je identifikovana kod brojnih biljnih vrsta, kao što su detelina (Wang i sar., 2011), kukuruz (Liu i sar., 2019), soja (Kulcheski i sar., 2011), krompir (Yang i sar., 2019b), pirinač (Nadarajah i Kumar, 2019), duvan (Chen i sar., 2017).

Prilikom gajenja biljaka na nižem intenzitetu svetlosti povećana ekspresija nkRNK veličine preko 100 nt prisutna je samo kod WT biljaka u drugom ciklusu suše, odnosno u trećem ciklusu rehidratacije, dok je u svim ostalim ciklusima suše, kao i u slučaju *flacca* mutanta akumulacija ovih RNK je približno izjednačena sa onom u kontrolnim uslovima. Sa druge strane, izlaganje biljaka ciklusima suše na višem intenzitetu svetlosti uticalo je na povećanu akumulaciju nkRNK veličine 150 nt u prvom ciklusu suše kod WT, čiji se nivo odmah nakon rehidratacije vratio na kontrolne vrednosti. Sa druge strane, u drugom ciklusu suše akumulacija nkRNK veličine 150 nt i 200 nt bila je značajno niža nego u kontrolnim uslovima, dok je rehidratacija uticala na njihovo vraćanje na kontrolne vrednosti, što je u drugom ciklusu bilo praćeno povećanom akumulacijom nkRNK veličine 50 nt. U *flacca* biljkama prvi ciklus suše indukovao je blago povećanje nkRNK veličine 150 nt, čiji je nivo u drugoj i trećoj suši bio sličan kontrolnim uslovima. Sa druge strane, povećana akumulacija nkRNK veličine 200 nt u *flacca* je zabeležena samo u trećem ciklusu suše i rehidratacije. Dobijeni podaci slični su onima koji su dobijeni za dugačke nekodirajuće RNK (lncRNK, eng. *long noncoding RNA*) na pirinču gde su biljke gajene u hidroponičnim uslovima, a zatim u kratkim vremenskim interavalima izlagane višestrukim periodima dehidratacije i rehidratacije (Li i sar., 2019). Nakon svakog ponovljenog ciklusa urađena je analiza ovih nkRNK i usklađena sa bazom podataka za prekursore miRNK (miRBase). Tako je pokazano da 12 dugačkih nkRNK mogu biti prekursori miRNK, od kojih jedna, označena kao TCONS 00028567 je imala ulogu u razvijanju memorije kod pirinča. Ova nkRNK je imala povećanu ekspresiju nakon drugog ciklusa suše, dok je u trećoj rehidrataciji i četvrtoj suši pokazan efekat memorije, mada sa nižim nivoom ekspresije od one koja je dobijena u drugoj suši. Za ovu nkRNK je pokazano da pripada grupi dugačkih nekodirajućih RNK koje su pozitivno eksprimirane delovanjem suše (*DRIR*). Isti obrazac ekspresije primećen je za osa-MIR1428e, koja i funkcioniše kao post-transkripcioni regulator i najverovatnije je dobijena splajsovanjem iz ove nkRNA (Li i sar., 2019). Kod *Arabidopsis thaliana* u uslovima suše su identifikovane duge nkRNK tipa DRIR, koje pozitivno utiču na transkripte ABA-zavisnih gena (*P5CS1*, *RD29A,B* i *ABI5*) aneksina (*ANNAT7*) i akvaporina (*TIP4*, *NIP1*) (Gelaw i Sanan-Mishra., 2021). Takođe, u istraživanju na paradajzu u suši je pokazana povećana

akumulacija nkRNK_tomato_467, čiji je potencijalni target gen povezan sa K⁺ kanalom, dok su druge nkRNK i njihovi ciljani geni imali smanjenu ekspresiju (Eom i sar., 2019). Postojanje ovakve zavisnosti sa K⁺ kanalima može biti od značaja u signalnim mehanizmima koji su prisutni tokom procesa zatvaranja stoma.

U ovaj tezi je zapažena povećana ekspresija nkRNK od 250 nt na svetlosti nižeg inteziteta samo tokom drugog ciklusa suše. Sa druge strane, na svetlosti većeg inteziteta kod *flacca*, za razliku od WT, je tokom svih tremana prisutna nkRNK od 300 nt. Ove nkRNK i njihovo karakteristično eksprimiranje može biti dovedeno u vezu sa hormonskom signalnom transdukcijom, signalnim putevima za kalcijum ili sintetskim fenilpropanoidnim putem, odnosno može biti povezano sa sintezom lignina (Mauch-Mani i sar., 2017; Herlihy i sar. 2020). Prilikom gajenja biljaka na nižem intenzitetu svetlosti u prvom ciklusu suše pokazana je povećana ekspresija nkRNK veličine 35–75 nt, koja se u drugom i trećem ciklusu gubi. Takođe jedino odsupanje uočava se kod WT biljaka u trećem ciklusu suše kada je primećena najveća akumulacija nkRNK veličine 65 nt. Može se pretpostaviti da karakteristično odsustvo nkRNK veličine 35 nt i 50 nt u rehidraciji nakon druge suše na nižem intenzitetu svetlosti, kao i odsustvo kod svih tretmana u trećem ciklusu ukazuje na njihov značaj u procesima razvića biljaka.

miRNK i dugačke nkRNK predstavljaju dva tipa veoma važnih nekodirajućih RNK čije interakcije igraju važnu ulogu u različitim biološkim procesima, uključujući rastenje, razviće, reprodukciju i odgovor biljaka na stresne uslove (Liu i sar. 2015). Kod paradajza u uslovima suše identifikovano je više od 500 obrazaca interakcije miRNK i dugačkih nkRNK, pri čemu je većina interakcija ostvarena zahvaljući miRNK iz porodica sli-miR156, sli-miR390, sli-miR482, sli-miR5302 i sli-miR9476 (Eom i sar., 2019).

Jedna od najkonzervativnijih i visoko eksprimiranih miRNA u biljkama jeste miR156 čija je prekomerna ekspresija rezultirala drastičnim morfološkim promenama, odloženom cvetanju, povećanim razvićem korena i povećanom produkcijom biomase (Xie i sar., 2012; Fu i sar., 2012; Cui i sar., 2014). Ove promene direktno sugerišu na to da miR156 ima značajne regulatorne funkcije u rastenju i razviću biljaka. Takođe, miR156 reguliše toleranciju na stres soli i suše, preko regulacije *SPL* genske familije za transkripcione faktore (eng. *squamosa promoter-binding protein-like*). Ovi geni su glavni regulatori različitih bioloških procesa, uključujući promenu faze razvića biljaka (od vegetativne do reproduktivne), kao i sekundarni metabolizam i reakcije biljaka na stres (Cui i sar., 2014, Stief i sar., 2014; Wang i sar., 2015; Arshad i sar., 2017).

6. Zaključci

- Na osnovu uporedne analize konstitutivnih parametara u *flacca* i divljem tipu može se izvesti zaključak da je održavanje homeostaze ABA od izuzetnog značaja za rastenje i razviće paradajza i u uslovima optimalnog vodnog režima. Takođe, može se smatrati da je *flacca* mutant izuzetno pogodan model sistem za proučavanje uticaja sniženog nivoa ABA na razvoj strategija za razvijanje tolerancije na sušu.
- U ovom radu je pokazano da stres suše pri niskom intenzitetu svetlosti nije značajno uticao na promene u svežoj i suvoj masi kod WT i *flacca* mutanta u odnosu na kontrolne biljke. Kod WT stres suše nije izazvao promene u odnosu sveže mase i lisne površine, dok je kod *flacca* odnos suve mase i lisne površine značajno opao u odnosu na kontrolne biljke.
- Rehidracija nakon izlaganja biljaka jednom ciklusu suše pri niskom intenzitetu svetlosti nije izazvala značajne promene u svežoj i suvoj masi listova, kao ni u površini listova.
- U ovom radu prikazan je opsežan konstitutivni profil proteinogenih aminokiselina u listovima divljeg tipa Ailsa Craig i njegovom mutantu sa 20% redukovanim sadržajem ABA koji su gajeni pri nižem intenzitetu svetlosti. Pokazano je da mutant *flacca* konsitutivno sadrži više slobodnih aminokiselina u odnosu na WT biljke (sadržaj 13 aminokiselina je veći u *flacca*, nego u WT).
- Mutant *flacca* konsitutivno sadrži više rastvornih ugljenih hidrata i šećernih alkohola u odnosu na WT biljke, kao što su galaktoza, arabinoza, ksiloza i sorbitol.
- Konstitutivni sadržaj fenolnih jedinjenja (hidroksibenzojeve kiseline, hidroksicimetne kiseline, flavon-3-oli i antocijani) niži je u *flacca* u odnosu na WT, što ukazuje da je na račun povećane biosinteze aminokiselina i ugljenih hidrata smanjen fenilpropanoidni put i biosinteza ovih jedinjenja u *flacca*.
- Povećani sadržaj aminokiselina i ugljenih hidrata u mutantu *flacca* mogao bi biti kompenzacioni mehanizam u sprečavanju ćelijske dehidracije, koja je uzrokovana većom otvorenošću stoma usled nižih vrednosti konstitutivne i inducibilne ABA.
- Izlaganje biljaka divljeg tipa (WT) i *flacca* mutanta jednom ciklusu suše pri nižem intenzitetu svetlosti dovelo je do zatvaranja stoma, sniženih vrednosti vodnog potencijala u *flacca* i izrazite akumulacije ABA u WT, što je praćeno povećanom ekspresijom *NCED1* gena kod oba genotipa.
- Usled nepromenjenih vrednosti vodnog potencijala nakon jednog ciklusa suše na nižem intenzitetu svetlosti u WT biljkama, može se zaključiti da zatvaranje stoma nastaje najvećim delom zbog akumulacije ABA, dok kod *flacca* to pretežno nastaje kao posledica alternativnih hidrauličkih regulatornih mehanizama koji utiču na provodljivost stoma.
- Povećan nivo ABA u rehidraciji pri niskom intenzitetu svetlosti u WT je u skladu sa povećanom ekspresijom *NCED1* gena, dok su promene i ABA i *NCED1* u *flacca* u međusobnoj suprotnosti.
- Stres suše izazvao je akumulaciju aminokiseline prolina kod oba genotipa biljaka gajenih pri niskom intenzitetu svetlosti. Do povećane sinteze prolina u *flacca* došlo je bez obzira na nepromenjeni sadržaj ABA, što ukazuje na uključivanje drugih regulatornih mehanizama, odnosno na niži prag ABA potreban za pokretanje akumulacije prolina u suši.
- Akumulacija prolina, njegovih prekursora i pojedinih aminokiselina razgranatog bočnog lanca u oba genotipa pri niskom intenzitetu svetlosti, kao i glukoze i fruktoze u

flacca, odnosno sorbitola u WT ukazuju na njihovu značajnu ulogu u aklimaciji i rastenju biljaka tokom suše i rehidracije.

- Izlaganje biljaka divljeg tipa (WT) i *flacca* mutanta trima ciklusima suše pri višem intenzitetu svetlosti uticalo je na akumulaciju ABA kod oba genotipa, koja je bila praćena povećanom ekspresijom *NCED1*. U rehidraciji kod WT nivo ABA vratio se na kontrolne vrednosti, dok je kod *flacca* to postignuto tek nakon drugog i trećeg ciklusa.
- Tri ciklusa suše pri višem intenzitetu svetlosti su mnogo izraženije uticali na zatvaranje stoma kod WT, nego kod *flacca* mutanta. Najintenzivnije zatvaranje stoma kod WT zabeleženo je u trećem ciklusu suše i nije u korelaciji sa akumulacijom ABA. Ovo ukazuje na to da ponavljajući ciklusi suše modifikuju osetljivost stoma na hemijske i/ili hidrauličke signale, što ukazuju na mogućnost da čine deo memorijskog mehanizma stresa.
- Sa ponavljanjem ciklusa suše pri višem intenzitetu svetlosti akumulacija prolina je značajno opadala kod oba genotipa, te se može reći da njegova osmoprotektivna uloga nije od značaja za razvoj memorije uzrokovane stresom suše, već je pretpostavka da ima ulogu u modifikaciji ćelijskog zida.
- Tri ciklusa suše pri višem intenzitetu svetlosti nisu značajno uticala na sadržaj najzastupljenijih ugljenih hidrata kod oba genotipa, stoga se ne može govoriti o njihovoj akumulaciji kao zaštitnom mehanizmu pri izlaganju vodnom stresu.
- Povećana akumulacija ukupnog askorbata u *flacca* u tri ciklusa suše na višem intenzitetu svetlosti ukazuje na veći stepen osetljivosti mutanta na stres suše u odnosu na WT biljke.
- Povišeni nivo ukupnog askorbata u rehidraciji u trećem ciklusu (na oba intenziteta svetlosti), kao i povećana akumulacija epidermalnih flavonoida ukazuju na potencijalni značaj antioksidanasa u razvijanju memorije prilikom izlaganja biljaka ponovljenom stresu suše.
- Pri gajenju biljaka na višem intenzitetu svetlosti produženi oporavak nakon prvog ciklusa suše imao je stimulativno dejstvo na porast sveže i suve mase listova, kao i lisne površine kod oba genotipa. Rehidracija nakon tri ciklusa suše uzrokovala je da ovi morfološki parametri budu niži (WT) ili jednaki (*flacca*) vrednostima kod optimalno zalivanih biljaka.
- Može se pretpostaviti da pri određenim uslovima nametnutim nižim sadržajem ABA (u *flacca*) dolazi do modifikacije strukture ćelijskog zida. Ojačavanje ćelijskog zida, a samim tim i povećanje njegove sposobnosti da zadrži vodu je nastalo kao posledica intenzivnijeg umrežavanja između celuloze, hemiceluloze, pektina i proteina bogatih hidrosiprolinom.
- Kod biljaka koje su gajene na višem intenzitetu svetlosti, produženi oporavak nakon prvog, odnosno rehidracija nakon tri ciklusa suše imale su drugačiji efekat na akumulaciju komponenti ćelijskog zida u WT i *flacca* mutantu. Najveća akumulacija celuloze, hemiceluloze i lignina u WT zabeležena je nakon produženog perioda oporavka nakon jednog ciklusa suše. U *flacca* najveće promene u akumulaciji komponenti ćelijskog zida detektovane su u rehidraciji nakon tri primenjena ciklusa suše.
- Za razliku od svetlosti nižeg, pri svetlosti višeg intenziteta pokazano je da postoje konstitutivne razlike u ekspresiji nkRNK molekula između divljeg tipa i *flacca* mutanta. Na svetlosti oba intenziteta profil izolovanih nkRNK bio je u opsegu od 35 do 300 nt.
- Pri nižem intenzitetu svetlosti odsustvo nkRNK veličine 35 nt i 50 nt u rehidraciji u drugom ciklusu, kao i odsustvo kod svih tretmana u trećem ciklusu ukazuje na značaj ovih nkRNK u procesima razvića biljaka.

- Pri svetlosti većeg intenziteta jedino je kod *flacca* karakteristično prisustvo nkRNK veličine 300 nt, što bi moglo da ukaže na njihovu učešće u regulaciji fenilpropanoidnog puta, odnosno na sintezu lignina. Takođe, može se pretpostaviti da je povećanje ili smanjenje nivoa ekspresije nkRNK u opsegu od 150–250 nt kod oba genotipa povezano sa regulacijom ABA-zavisnih gena.
- Uopšteno posmatrano, akumulacija osmotski aktivnih jedinjenja (ugljeni hidrati i aminokiseline) kod WT i *flacca* mutanta, kao i morfološke promene utiču na modifikaciju mehanizama tolerancije na sušu kod paradajza.
- Uzimajući u obzir rezultate dobijene u ovoj disertaciji, može se zaključiti da izlaganje biljaka ciklusima suše značajno utiče na promene u provodljivosti stoma, akumulaciji askorbata i epidermalnih flavonoida, u arhitekturi ćelijskog zida, kao i u ekspresiji nkRNK molekula, što potencijalno može doprineti razvijanju memorije na ponovljeni stres suše.

7. Literatura

- AbdElgawad, H., Zinta, G., Hegab, M. M., Pandey, R., Asard, H., & Abuelsoud, W. (2016). High salinity induces different oxidative stress and antioxidant responses in maize seedlings organs. *Frontiers in plant science*, 7, 276.
- Abrahám, E., Rigó, G., Székely, G., Nagy, R., Koncz, C., & Szabados, L. (2003). Light-dependent induction of proline biosynthesis by abscisic acid and salt stress is inhibited by brassinosteroid in *Arabidopsis*. *Plant molecular biology*, 51(3), 363-372.
- Agarwal, P. K., & Jha, B. (2010). Transcription factors in plants and ABA dependent and independent abiotic stress signalling. *Biologia plantarum*, 54(2), 201-212.
- Akram, N. A., Shafiq, F., & Ashraf, M. (2017). Ascorbic acid-a potential oxidant scavenger and its role in plant development and abiotic stress tolerance. *Frontiers in plant science*, 8, 613.
- Akšić, M. F., Tosti, T., Sredojević, M., Milivojević, J., Meland, M., & Natić, M. (2019). Comparison of sugar profile between leaves and fruits of blueberry and strawberry cultivars grown in organic and integrated production system. *Plants*, 8(7), 205.
- Ahmad, Z., Waraich, E. A., Akhtar, S., Anjum, S., Ahmad, T., Mahboob, W., ... & Rizwan, M. (2018). Physiological responses of wheat to drought stress and its mitigation approaches. *Acta physiologiae plantarum*, 40(4), 1-13.
- Alcázar, R., Bueno, M., & Tiburcio, A. F. (2020). Polyamines: Small amines with large effects on plant abiotic stress tolerance. *Cells*, 9(11), 2373.
- Alexieva, V., Sergiev, I., Mapelli, S., & Karanov, E. (2001). The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. *Plant, cell and environment*, 24(12), 1337-1344.
- Ali, S., Hayat, K., Iqbal, A., & Xie, L. (2020). Implications of abscisic acid in the drought stress tolerance of plants. *Agronomy*, 10(9), 1323.
- Almaghamsi, A., Nosarzewski, M., Kanayama, Y., & Archbold, D. D. (2020). Effects of abiotic stresses on sorbitol biosynthesis and metabolism in tomato (*Solanum lycopersicum*). *Functional plant biology*, 48(3), 286-297.
- Alves, R. D., Menezes-Silva, P. E., Sousa, L. F., Loram-Lourenço, L., Silva, M. L., Almeida, S. E., ... & Farnese, F. S. (2020). Evidence of drought memory in *Dipteryx alata* indicates differential acclimation of plants to savanna conditions. *Scientific reports*, 10(1), 1-16.
- Andrade, L. M., Peixoto-Junior, R. F., Ribeiro, R. V., Nóbile, P. M., Brito, M. S., Marchiori, P. E. R., ... & Creste, S. (2019). Biomass accumulation and cell wall structure of rice plants overexpressing a dirigent-jacalin of sugarcane (ShDJ) under varying conditions of water availability. *Frontiers in plant science*, 10, 65.
- Antolovich, M., Prenzler, P., Robards, K., & Ryan, D. (2000). Sample preparation in the determination of phenolic compounds in fruits. *Analyst*, 125(5), 989-1009.
- Anjum, S. A., Xie, X. Y., Wang, L. C., Saleem, M. F., Man, C., & Lei, W. (2011). Morphological, physiological and biochemical responses of plants to drought stress. *African journal of agricultural research*, 6(9), 2026-2032.
- Anjum, S. A., Ashraf, U., Zohaib, A., Tanveer, M., Naeem, M., Ali, I., ... & Nazir, U. (2017a). Growth and developmental responses of crop plants under water deficit: a review. *Zemdirbyste-Agriculture*, 104, 267-276.
- Anjum, S. A., Ashraf, U., Tanveer, M., Khan, I., Hussain, S., Shahzad, B., ... & Wang, L. C. (2017b). Drought induced changes in growth, osmolyte accumulation and antioxidant metabolism of three maize hybrids. *Frontiers in plant science*, 8.
- Apel, K., & Hirt, H. (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual review of plant biology*, 55, 373-399.

- Araújo, W. L., Ishizaki, K., Nunes-Nesi, A., Larson, T. R., Tohge, T., Krahnert, I., ... & Fernie, A. R. (2010). Identification of the 2-hydroxyglutarate and isovaleryl-CoA dehydrogenases as alternative electron donors linking lysine catabolism to the electron transport chain of *Arabidopsis* mitochondria. *The plant cell*, 22(5), 1549-1563.
- Ariel, F., Romero-Barrios, N., Jégu, T., Benhamed, M., & Crespi, M. (2015). Battles and hijacks: noncoding transcription in plants. *Trends in plant science*, 20(6), 362-371.
- Aroca, R., del Mar Alguacil, M., Vernieri, P., & Ruiz-Lozano, J. M. (2008). Plant responses to drought stress and exogenous ABA application are modulated differently by mycorrhization in tomato and an ABA-deficient mutant (*sitiens*). *Microbial ecology*, 56(4), 704-719.
- Arshad, M., Feyissa, B. A., Amyot, L., Aung, B., & Hannoufa, A. (2017). MicroRNA156 improves drought stress tolerance in alfalfa (*Medicago sativa*) by silencing SPL13. *Plant science*, 258, 122-136.
- Asch, F. (2000). Laboratory manual on determination of abscisic acid by indirect enzyme linked immuno sorbent assay (ELISA). Royal Veterinary and Agricultural University, Department of Agricultural Sciences, Laboratory for Agrohydrology and Bioclimatology.
- Ashapkin, V. V., Kutueva, L. I., Aleksandrushkina, N. I., & Vanyushin, B. F. (2020). Epigenetic mechanisms of plant adaptation to biotic and abiotic stresses. *International journal of molecular sciences*, 21(20), 7457.
- Ashraf, M. F. M. R., & Foolad, M. R. (2007). Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environmental and experimental botany*, 59(2), 206-216.
- Aslam, M., Maqbool, M. A., & Cengiz, R. (2015). Mechanisms of drought resistance. In *Drought stress in maize (Zea mays L.)* (pp. 19-36). Springer, Cham.
- Aspinall, G. O. (1980). Chemistry of cell wall polysaccharides. In *Carbohydrates: Structure and function* (pp. 473-500). Academic Press.
- Atkin, O. K., & Macherel, D. (2009). The crucial role of plant mitochondria in orchestrating drought tolerance. *Annals of botany*, 103(4), 581-597.
- Auler, P. A., Do Amaral, M. N., Rodrigues, G. D. S., Benitez, L. C., da Maia, L. C., Souza, G. M., & Braga, E. J. B. (2017). Molecular responses to recurrent drought in two contrasting rice genotypes. *Planta*, 246(5), 899-914.
- Auler, P. A., Souza, G. M., da Silva Engela, M. R. G., do Amaral, M. N., Rossatto, T., da Silva, M. G. Z., ... & Braga, E. J. B. (2021a). Stress memory of physiological, biochemical and metabolomic responses in two different rice genotypes under drought stress: The scale matters. *Plant science*, 311, 110994.
- Auler, P. A., Nogueira do Amaral, M., Rossatto, T., Lopez Crizel, R., Milech, C., Clasen Chaves, F., ... & Bolacel Braga, E. J. (2021b). Metabolism of abscisic acid in two contrasting rice genotypes submitted to recurrent water deficit. *Physiologia plantarum*, 172(2), 304-316.
- Avramova, Z. (2019). Defence-related priming and responses to recurring drought: Two manifestations of plant transcriptional memory mediated by the ABA and JA signalling pathways. *Plant, cell and environment*, 42(3), 983-997.
- Balyan, S. C., Mutum, R. D., Kansal, S., Kumar, S., Mathur, S., & Raghuvanshi, S. (2015). Insights into the small RNA-mediated networks in response to abiotic stress in plants. In *elucidation of abiotic stress signaling in plants* (pp. 45-91). Springer, New York, NY.
- Bandurska, H. (2001). Does proline accumulated in leaves of water deficit stressed barley plants confine cell membrane injuries? II. Proline accumulation during hardening and its involvement in reducing membrane injuries in leaves subjected to severe osmotic stress. *Acta physiologiae plantarum*, 23(4), 483-490.

- Bartels, D., & Sunkar, R. (2005). Drought and salt tolerance in plants. *Critical reviews in plant sciences*, 24(1), 23-58.
- Basu, S., Ramegowda, V., Kumar, A., & Pereira, A. (2016). Plant adaptation to drought stress. *F1000Research*, 5.
- Bates, L. S., Waldren, R. P., & Teare, I. D. (1973). Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and soil*, 39(1), 205-207.
- Boivin, V., Faucher-Giguère, L., Scott, M., & Abou-Elela, S. (2019). The cellular landscape of mid-size noncoding RNA. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, 10(4), e1530.
- Bonnet, E., Van de Peer, Y., & Rouzé, P. (2006). The small RNA world of plants. *New phytologist*, 171(3), 451-468.
- Boulard, T., Raeppe, C., Brun, R., Lecompte, F., Hayer, F., Carmassi, G., & Gaillard, G. (2011). Environmental impact of greenhouse tomato production in France. *Agronomy for sustainable development*, 31(4), 757-777.
- Bowne, J. B., Erwin, T. A., Juttner, J., Schnurbusch, T., Langridge, P., Bacic, A., & Roessner, U. (2012). Drought responses of leaf tissues from wheat cultivars of differing drought tolerance at the metabolite level. *Molecular plant*, 5(2), 418-429.
- Bradford, K. J. (1983). Water relations and growth of the *flacca* tomato mutant in relation to abscisic acid. *Plant physiology*, 72(1), 251-255.
- Bro, R., & Smilde, A. K. (2014). Principal component analysis. *Analytical methods*, 6(9), 2812-2831.
- Broad, R. C., Bonneau, J. P., Hellens, R. P., & Johnson, A. A. (2020). Manipulation of ascorbate biosynthetic, recycling, and regulatory pathways for improved abiotic stress tolerance in plants. *International journal of molecular sciences*, 21(5), 1790.
- Buckley, T. N. (2005). The control of stomata by water balance. *New phytologist*, 168(2), 275-292.
- Burbidge, A., Grieve, T. M., Jackson, A., Thompson, A., McCarty, D. R., & Taylor, I. B. (1999). Characterization of the ABA-deficient tomato mutant *notabilis* and its relationship with maize Vp14. *The plant journal*, 17(4), 427-431.
- Cao, J. (2014). The functional role of long non-coding RNAs and epigenetics. *Biological procedures online*, 16(1), 1-13.
- Cassab, G. I., & Varner, J. E. (1988). Cell wall proteins. *Annual review of plant physiology and plant molecular biology*, 39(1), 321-353.
- Cerović, Z. G., Masdoumier, G., Ghozlen, N. B., & Latouche, G. (2012). A new optical leaf-clip meter for simultaneous non-destructive assessment of leaf chlorophyll and epidermal flavonoids. *Physiologia plantarum*, 146(3), 251-260.
- Changan, S. S., Ali, K., Kumar, V., Garg, N. K., & Tyagi, A. (2018). Abscisic acid biosynthesis under water stress: anomalous behavior of the 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase1 (*NCED1*) gene in rice. *Biologia plantarum*, 62(4), 663-670.
- Chaves, M. M., Maroco, J. P., & Pereira, J. S. (2003). Understanding plant responses to drought—from genes to the whole plant. *Functional plant biology*, 30(3), 239-264.
- Chawla, S., Jain, S., & Jain, V. (2013). Salinity induced oxidative stress and antioxidant system in salt-tolerant and salt-sensitive cultivars of rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of plant biochemistry and biotechnology*, 22(1), 27-34.
- Chen, G., Lips, S. H., & Sagi, M. (2002). Biomass production, transpiration rate and endogenous abscisic acid levels in grafts of *flacca* and wild-type tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Functional plant biology*, 29(11), 1329-1335.
- Chen, G., Shi, Q., Lips, S. H., & Sagi, M. (2003). Comparison of growth of *flacca* and wild-type tomato grown under conditions diminishing their differences in stomatal control. *Plant science*, 164(5), 753-757.

- Chen, K. M., Wang, F., Wang, Y. H., Chen, T., Hu, Y. X., & Lin, J. X. (2006). Anatomical and chemical characteristics of foliar vascular bundles in four reed ecotypes adapted to different habitats. *Flora-morphology, distribution, functional ecology of plants*, 201(7), 555-569.
- Chen, D., Wang, S., Xiong, B., Cao, B., & Deng, X. (2015). Carbon/nitrogen imbalance associated with drought-induced leaf senescence in *Sorghum bicolor*. *PloS one*, 10(8), e0137026.
- Chen, Q., Li, M., Zhang, Z., Tie, W., Chen, X., Jin, L., ... & Zhou, H. (2017). Integrated mRNA and microRNA analysis identifies genes and small miRNA molecules associated with transcriptional and post-transcriptional-level responses to both drought stress and re-watering treatment in tobacco. *BMC genomics*, 18(1), 1-16.
- Chen, K., Li, G. J., Bressan, R. A., Song, C. P., Zhu, J. K., & Zhao, Y. (2020a). Abscisic acid dynamics, signaling, and functions in plants. *Journal of integrative plant biology*, 62(1), 25-54.
- Chen, L., Zhu, Q. H., & Kaufmann, K. (2020b). Long non-coding RNAs in plants: Emerging modulators of gene activity in development and stress responses. *Planta*, 252(5), 1-14.
- Chinnusamy, V., Zhu, J., Zhou, T., & Zhu, J. K. (2007). Small RNAs: big role in abiotic stress tolerance of plants. In *Advances in molecular breeding toward drought and salt tolerant crops* (pp. 223-260). Springer, Dordrecht.
- Chmielewska, K., Rodziewicz, P., Swarcewicz, B., Sawikowska, A., Krajewski, P., Marczak, Ł., ... & Stobiecki, M. (2016). Analysis of drought-induced proteomic and metabolomic changes in barley (*Hordeum vulgare* L.) leaves and roots unravels some aspects of biochemical mechanisms involved in drought tolerance. *Frontiers in plant science*, 7, 1108.
- Choi, J. Y., Seo, Y. S., Kim, S. J., Kim, W. T., & Shin, J. S. (2011). Constitutive expression of CaXTH3, a hot pepper xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase, enhanced tolerance to salt and drought stresses without phenotypic defects in tomato plants (*Solanum lycopersicum* cv. Dotaerang). *Plant cell reports*, 30(5), 867-877.
- Christmann, A., Weiler, E. W., Steudle, E., & Grill, E. (2007). A hydraulic signal in root-to-shoot signalling of water shortage. *The plant journal*, 52(1), 167-174.
- Chung, P. J., Jung, H., Jeong, D. H., Ha, S. H., Choi, Y. D., & Kim, J. K. (2016). Transcriptome profiling of drought responsive noncoding RNAs and their target genes in rice. *BMC genomics*, 17(1), 1-12.
- Clemente-Moreno, M. J., Gago, J., Díaz-Vivancos, P., Bernal, A., Miedes, E., Bresta, P., ... & Flexas, J. (2019). The apoplastic antioxidant system and altered cell wall dynamics influence mesophyll conductance and the rate of photosynthesis. *The plant journal*, 99(6), 1031-1046.
- Colom, M. R., & Vazzana, C. (2003). Photosynthesis and PSII functionality of drought-resistant and drought-sensitive weeping lovegrass plants. *Environmental and experimental botany*, 49(2), 135-144.
- Cook, B. I., Mankin, J. S., & Anchukaitis, K. J. (2018). Climate change and drought: From past to future. *Current climate change reports*, 4(2), 164-179.
- Cornish, K., & Zeevaart, J. A. (1988). Phenotypic expression of wild-type tomato and three wilted mutants in relation to abscisic acid accumulation in roots and leaflets of reciprocal grafts. *Plant physiology*, 87(1), 190-194.
- Cosgrove, D. J. (2005). Growth of the plant cell wall. *Nature reviews molecular cell biology*, 6(11), 850-861.
- Cui, L. G., Shan, J. X., Shi, M., Gao, J. P., & Lin, H. X. (2014). The miR156-SPL 9-DFR pathway coordinates the relationship between development and abiotic stress tolerance in plants. *The plant journal*, 80(6), 1108-1117.

- Danquah, A., de Zelicourt, A., Colcombet, J., & Hirt, H. (2014). The role of ABA and MAPK signaling pathways in plant abiotic stress responses. *Biotechnology advances*, 32(1), 40-52.
- Das, K., & Roychoudhury, A. (2014). Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. *Frontiers in environmental science*, 2, 53.
- Daszkowska-Golec, A. (2016). The role of abscisic acid in drought stress: how ABA helps plants to cope with drought stress. In *Drought stress tolerance in plants*, Vol 2 (pp. 123-151). Springer, Cham.
- Davies, W. J., Kudoyarova, G., & Hartung, W. (2005). Long-distance ABA signaling and its relation to other signaling pathways in the detection of soil drying and the mediation of the plant's response to drought. *Journal of plant growth regulation*, 24(4), 285-295.
- De Oliveira, C. S., Maciel, G. M., Fraga, E. F., Peixoto, J. V. M., Assunção, V. B., & Marques, D. J. (2021). Selection of tomato genotypes for drought tolerance and agronomic potential through different selection indexes. *Horticultura brasileira*, 39, 102-111.
- Dellero, Y., Jossier, M., Schmitz, J., Maurino, V. G., & Hodges, M. (2016). Photorespiratory glycolate-glyoxylate metabolism. *Journal of Experimental Botany*, 67(10), 3041-3052.
- Delzon, S. (2015). New insight into leaf drought tolerance. *Functional ecology*, 29(10), 1247-1249.
- Dhami, N., & Cazzonelli, C. I. (2020). Environmental impacts on carotenoid metabolism in leaves. *Plant Growth Regulation*, 92(3), 455-477.
- Dinakar, C., & Bartels, D. (2013). Desiccation tolerance in resurrection plants: new insights from transcriptome, proteome and metabolome analysis. *Frontiers in plant science*, 4, 482.
- Ding, Y., Fromm, M., & Avramova, Z. (2012). Multiple exposures to drought 'train' transcriptional responses in *Arabidopsis*. *Nature communications*, 3(1), 1-9.
- Ding, Y., Liu, N., Virlovet, L., Riethoven, J. J., Fromm, M., & Avramova, Z. (2013). Four distinct types of dehydration stress memory genes in *Arabidopsis thaliana*. *BMC plant biology*, 13(1), 1-11.
- Ding, Z., Wu, C., Tie, W., Yan, Y., He, G., & Hu, W. (2019). Strand-specific RNA-seq based identification and functional prediction of lncRNAs in response to melatonin and simulated drought stresses in cassava. *Plant physiology and biochemistry*, 140, 96-104.
- Ding, H., Wang, B., Han, Y., & Li, S. (2020). The pivotal function of dehydroascorbate reductase in glutathione homeostasis in plants. *Journal of experimental botany*, 71(12), 3405-3416.
- Dodd, I. C., Theobald, J. C., Richer, S. K., & Davies, W. J. (2009). Partial phenotypic reversion of ABA-deficient *flacca* tomato (*Solanum lycopersicum*) scions by a wild-type rootstock: normalizing shoot ethylene relations promotes leaf area but does not diminish whole plant transpiration rate. *Journal of experimental botany*, 60(14), 4029-4039.
- Dörffling, K., Streich, J., Kruse, W., & Muxfeldt, B. (1977). Abscisic acid and the after-effect of water stress on stomatal opening potential. *Zeitschrift für pflanzenphysiologie*, 81(1), 43-56.
- Du, Y., Zhao, Q., Chen, L., Yao, X., Zhang, W., Zhang, B., & Xie, F. (2020a). Effect of drought stress on sugar metabolism in leaves and roots of soybean seedlings. *Plant physiology and biochemistry*, 146, 1-12.
- Du, Y., Zhao, Q., Chen, L., Yao, X., Zhang, H., Wu, J., & Xie, F. (2020b). Effect of drought stress during soybean R2-R6 growth stages on sucrose metabolism in leaf and seed. *International journal of molecular sciences*, 21(2), 618.

- Durand, M., Porcheron, B., Hennion, N., Maurousset, L., Lemoine, R., & Pourtau, N. (2016). Water deficit enhances C export to the roots in *Arabidopsis thaliana* plants with contribution of sucrose transporters in both shoot and roots. *Plant physiology*, 170(3), 1460-1479.
- Đurić, M., Subotić, A., Prokić, L., Trifunović-Momčilov, M., Cingel, A., Vujičić, M., & Milošević, S. (2020). Morpho-physiological and molecular evaluation of drought and recovery in *Impatiens walleriana* grown ex vitro. *Plants*, 9(11), 1559.
- ElSayed, A. I., Rafudeen, M. S., & Gollmack, D. (2014). Physiological aspects of raffinose family oligosaccharides in plants: protection against abiotic stress. *Plant biology*, 16(1), 1-8.
- Eom, S. H., Lee, H. J., Lee, J. H., Wi, S. H., Kim, S. K., & Hyun, T. K. (2019). Identification and functional prediction of drought-responsive long non-coding RNA in tomato. *Agronomy*, 9(10), 629.
- Erice, G., Louahlia, S., Irigoyen, J. J., Sanchez-Diaz, M., & Avice, J. C. (2010). Biomass partitioning, morphology and water status of four alfalfa genotypes submitted to progressive drought and subsequent recovery. *Journal of plant physiology*, 167(2), 114-120.
- Evers, D., Lefevre, I., Legay, S., Lamoureux, D., Hausman, J. F., Rosales, R. O. G., ... & Schafleitner, R. (2010). Identification of drought-responsive compounds in potato through a combined transcriptomic and targeted metabolite approach. *Journal of experimental botany*, 61(9), 2327-2343.
- Fàbregas, N., & Fernie, A. R. (2019). The metabolic response to drought. *Journal of experimental botany*, 70(4), 1077-1085.
- Fang, L., Abdelhakim, L. O. A., Hegelund, J. N., Li, S., Liu, J., Peng, X., ... & Liu, F. (2019). ABA-mediated regulation of leaf and root hydraulic conductance in tomato grown at elevated CO₂ is associated with altered gene expression of aquaporins. *Horticulture research*, 6.
- Fang, Y., & Xiong, L. (2015). General mechanisms of drought response and their application in drought resistance improvement in plants. *Cellular and molecular life sciences*, 72(4), 673-689.
- FAO. Food and Agriculture Organization. 2011. Available online: <http://faostat.fao.org/site/291/default.aspx> (pristupljeno 18. maja 2020).
- Farooq, M., Wahid, A., Kobayashi, N. S. M. A., Fujita, D. B. S. M. A., & Basra, S. M. A. (2009). Plant drought stress: effects, mechanisms and management. In *Sustainable agriculture* (pp. 153-188). Springer, Dordrecht.
- Fernandez, O., Béthencourt, L., Quero, A., Sangwan, R. S., & Clément, C. (2010). Trehalose and plant stress responses: friend or foe?. *Trends in plant science*, 15(7), 409-417.
- Foolad, M. R. (2007). Genome mapping and molecular breeding of tomato. *International journal of plant genomics*, 2007.
- Foster, K., Lambers, H., Real, D., Ramankutty, P., Cawthray, G. R., & Ryan, M. H. (2015). Drought resistance and recovery in mature *Bituminaria bituminosa* var. *albomarginata*. *Annals of applied biology*, 166(1), 154-169.
- Foyer, C. H., & Noctor, G. (2005). Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. *The plant cell*, 17(7), 1866-1875.
- Foyer, C. H., & Noctor, G. (2011). Ascorbate and glutathione: the heart of the redox hub. *Plant physiology*, 155(1), 2-18.
- Foyer, C. H., & Shigeoka, S. (2011). Understanding oxidative stress and antioxidant functions to enhance photosynthesis. *Plant physiology*, 155(1), 93-100.

- Franco-Zorrilla, J. M., Valli, A., Todesco, M., Mateos, I., Puga, M. I., Rubio-Somoza, I., ... & Paz-Ares, J. (2007). Target mimicry provides a new mechanism for regulation of microRNA activity. *Nature genetics*, 39(8), 1033-1037.
- Fu, C., Sunkar, R., Zhou, C., Shen, H., Zhang, J. Y., Matts, J., ... & Wang, Z. Y. (2012). Overexpression of miR156 in switchgrass (*Panicum virgatum* L.) results in various morphological alterations and leads to improved biomass production. *Plant biotechnology journal*, 10(4), 443-452.
- Galviz, Y. C., Ribeiro, R. V., & Souza, G. M. (2020). Yes, plants do have memory. *Theoretical and experimental plant physiology*, 32(3), 195-202.
- Ganie, S. A., & Ahammed, G. J. (2021). Dynamics of cell wall structure and related genomic resources for drought tolerance in rice. *Plant cell reports*, 40(3), 437-459.
- Gaur, P. M., Krishnamurthy, L., & Kashiwagi, J. (2008). Improving drought-avoidance root traits in chickpea (*Cicer arietinum* L.)-current status of research at ICRISAT. *Plant production science*, 11(1), 3-11.
- Gelaw, T. A., & Sanan-Mishra, N. (2021). Non-Coding RNAs in Response to Drought Stress. *International journal of molecular sciences*, 22(22), 12519.
- Gerszberg, A., & Hnatuszko-Konka, K. (2017). Tomato tolerance to abiotic stress: a review of most often engineered target sequences. *Plant growth regulation*, 83(2), 175-198.
- Gill, S. S., & Tuteja, N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant physiology and biochemistry*, 48(12), 909-930.
- Godwin, J., & Farrona, S. (2020). Plant epigenetic stress memory induced by drought: a physiological and molecular perspective. *Plant epigenetics and epigenomics*, 243-259.
- Gomes, F. P., Oliva, M. A., Mielke, M. S., Almeida, A. A. F., & Aquino, L. A. (2010). Osmotic adjustment, proline accumulation and cell membrane stability in leaves of *Cocos nucifera* submitted to drought stress. *Scientia horticultrae*, 126(3), 379-384.
- Gomes, A. Q., Nolasco, S., & Soares, H. (2013). Non-coding RNAs: multi-tasking molecules in the cell. *International journal of molecular sciences*, 14(8), 16010-16039.
- Gong, X., Liu, M., Zhang, L., Ruan, Y., Ding, R., Ji, Y., ... & Wang, C. (2015). Arabidopsis *AtSUC2* and *AtSUC4*, encoding sucrose transporters, are required for abiotic stress tolerance in an ABA-dependent pathway. *Physiologia plantarum*, 153(1), 119-136.
- Green, M. A., & Fry, S. C. (2005). Vitamin C degradation in plant cells via enzymatic hydrolysis of 4-O-oxalyl-L-threonate. *Nature*, 433(7021), 83-87.
- Gruszka, D., Janeczko, A., Dziurka, M., Pocięcha, E., & Fodor, J. (2018). Non-enzymatic antioxidant accumulations in BR-deficient and BR-insensitive barley mutants under control and drought conditions. *Physiologia plantarum*, 163(2), 155-169.
- Gu, H., Wang, Y., Xie, H., Qiu, C., Zhang, S., Xiao, J., ... & Ding, Z. (2020). Drought stress triggers proteomic changes involving lignin, flavonoids and fatty acids in tea plants. *Scientific reports*, 10(1), 1-11.
- Gupta, D. K., Palma, J. M., & Corpas, F. J. (Eds.). (2015). *Reactive oxygen species and oxidative damage in plants under stress* (pp. 1-22). Heidelberg: Springer.
- Gupta, A., Rico-Medina, A., & Caño-Delgado, A. I. (2020). The physiology of plant responses to drought. *Science*, 368(6488), 266-269.
- Hamann, T. (2012). Plant cell wall integrity maintenance as an essential component of biotic stress response mechanisms. *Frontiers in plant science*, 3, 77.
- Han, M., Zhang, C., Suglo, P., Sun, S., Wang, M., & Su, T. (2021). L-Aspartate: An essential metabolite for plant growth and stress acclimation. *Molecules*, 26(7), 1887.
- Harrison, E., Burbidge, A., Okyere, J. P., Thompson, A. J., & Taylor, I. B. (2011). Identification of the tomato ABA-deficient mutant *sitiens* as a member of the ABA-aldehyde oxidase gene family using genetic and genomic analysis. *Plant growth regulation*, 64(3), 301-309.

- Hartung, W., Wilkinson, S., & Davies, W. J. (1998). Factors that regulate abscisic acid concentrations at the primary site of action at the guard cell. *Journal of experimental botany*, 361-367.
- Hartung, W., Sauter, A., & Hese, E. (2002). Abscisic acid in the xylem: where does it come from, where does it go to?. *Journal of experimental botany*, 53(366), 27-32.
- Hartung, W., Schraut, D., & Jiang, F. (2005). Physiology of abscisic acid (ABA) in roots under stress—a review of the relationship between root ABA and radial water and ABA flows. *Australian journal of agricultural research*, 56(11), 1253-1259.
- Hasanagić, D., Koleška, I., Kojić, D., Vlaisavljević, S., Janjić, N., & Kukavica, B. (2020). Long term drought effects on tomato leaves: Anatomical, gas exchange and antioxidant modifications. *Acta physiologiae plantarum*, 42(7), 1-14.
- Hasanuzzaman, M., Nahar, K., Anee, T. I., & Fujita, M. (2017). Glutathione in plants: biosynthesis and physiological role in environmental stress tolerance. *Physiology and molecular biology of plants*, 23(2), 249-268.
- Hasanuzzaman, M., Bhuyan, M. H. M., Anee, T. I., Parvin, K., Nahar, K., Mahmud, J. A., & Fujita, M. (2019). Regulation of ascorbate-glutathione pathway in mitigating oxidative damage in plants under abiotic stress. *Antioxidants*, 8(9), 384.
- Havaux, M. (2014). Carotenoid oxidation products as stress signals in plants. *The plant journal*, 79(4), 597-606.
- Henry, C., John, G. P., Pan, R., Bartlett, M. K., Fletcher, L. R., Scoffoni, C., & Sack, L. (2019). A stomatal safety-efficiency trade-off constrains responses to leaf dehydration. *Nature communications*, 10(1), 1-9.
- Heo, J. B., & Sung, S. (2011). Encoding memory of winter by noncoding RNAs. *Epigenetics*, 6(5), 544-547.
- Herlihy, J. H., Long, T. A., & McDowell, J. M. (2020). Iron homeostasis and plant immune responses: Recent insights and translational implications. *Journal of biological chemistry*, 295(39), 13444-13457.
- Hervás-Gámez, C., & Delgado-Ramos, F. (2019). Drought management planning policy: from Europe to Spain. *Sustainability*, 11(7), 1862.
- Hey, S. J., Byrne, E., & Halford, N. G. (2009). The interface between metabolic and stress signalling. *Annals of botany*, 105(2), 197-203.
- Hilal, M., Parrado, M. F., Rosa, M., Gallardo, M., Orce, L., Massa, E. M., ... & Prado, F. E. (2004). Epidermal Lignin Deposition in Quinoa Cotyledons in Response to UV-B Radiation. *Photochemistry and photobiology*, 79(2), 205-210.
- Hilker, M., & Schmölling, T. (2019). Stress priming, memory, and signalling in plants. *Plant, cell and environment*, 42(3), 753-761.
- Hou, J., Huang, X., Sun, W., Du, C., Wang, C., Xie, Y., ... & Ma, D. (2018). Accumulation of water-soluble carbohydrates and gene expression in wheat stems correlates with drought resistance. *Journal of plant physiology*, 231, 182-191.
- Houben, M., & Van de Poel, B. (2019). 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase (ACO): the enzyme that makes the plant hormone ethylene. *Frontiers in plant science*, 695.
- Hunt, R. (1982). Plant growth curves. *The functional approach to plant growth analysis*. Edward Arnold Ltd.
- Imber, D., & Tal, M. (1970). Phenotypic reversion of *flacca*, a wilted mutant of tomato, by abscisic acid. *Science*, 169(3945), 592-593.
- Iovieno, P., Punzo, P., Guida, G., Mistretta, C., Van Oosten, M. J., Nurcato, R., ... & Grillo, S. (2016). Transcriptomic changes drive physiological responses to progressive drought stress and rehydration in tomato. *Frontiers in plant science*, 7, 371.

- Iuchi, S., Kobayashi, M., Taji, T., Naramoto, M., Seki, M., Kato, T., ... & Shinozaki, K. (2001). Regulation of drought tolerance by gene manipulation of 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase, a key enzyme in abscisic acid biosynthesis in *Arabidopsis*. *The plant journal*, 27(4), 325-333.
- Iyer, N. J., Tang, Y., & Mahalingam, R. (2013). Physiological, biochemical and molecular responses to a combination of drought and ozone in *Medicago truncatula*. *Plant, cell and environment*, 36(3), 706-720.
- Jacobsen, S. E., Jensen, C. R., & Liu, F. (2012). Improving crop production in the arid Mediterranean climate. *Field crops research*, 128, 34-47.
- Jacques, C., Salon, C., Barnard, R. L., Vernoud, V., & Prudent, M. (2021). Drought Stress Memory at the Plant Cycle Level: A Review. *Plants*, 10(9), 1873.
- Jaleel, C. A., Manivannan, Paramasivam. A., Wahid, A., Farooq, M., Al-Juburi, H. J., Somasundaram, Ramamurthy., & Panneerselvam, R. (2009). Drought stress in plants: a review on morphological characteristics and pigments composition. *International journal of agriculture and biology*, 11(1), 100-105.
- Jiang, Y., Yao, Y., & Wang, Y. (2012). Physiological response, cell wall components, and gene expression of switchgrass under short-term drought stress and recovery. *Crop science*, 52(6), 2718-2727.
- Jinhua, S. H. A. O., Weixiong, W. U., Rasul, F., Munir, H., Huang, K., ALBISHI, T. S., ... & AAMER, M. (2022). Trehalose induced drought tolerance in plants: Physiological and molecular responses. *Notulae botanicae horti agrobotanici Cluj-Napoca*, 50(1), 12584-12584.
- Joshi, V., Joung, J. G., Fei, Z., & Jander, G. (2010). Interdependence of threonine, methionine and isoleucine metabolism in plants: accumulation and transcriptional regulation under abiotic stress. *Amino acids*, 39(4), 933-947.
- Jovanović Lj. (1997). Transport i distribucija abcisinske kiseline (ABA) u korenu linija kukuruza (*Zea mays* L.). Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet, Beograd.
- Jovanović, Z., Stikic, R., Vucelic-Radovic, B., Paukovic, M., Brocic, Z., Matovic, G., ... & Mojevic, M. (2010). Partial root-zone drying increases WUE, N and antioxidant content in field potatoes. *European journal of agronomy*, 33(2), 124-131.
- Jung, C., Nguyen, N. H., & Cheong, J. J. (2020). Transcriptional Regulation of Protein Phosphatase 2C Genes to Modulate Abscisic Acid Signaling. *International journal of molecular sciences*, 21(24), 9517.
- Kačuráková, M., Smith, A. C., Gidley, M. J., & Wilson, R. H. (2002). Molecular interactions in bacterial cellulose composites studied by 1D FT-IR and dynamic 2D FT-IR spectroscopy. *Carbohydrate research*, 337(12), 1145-1153.
- Kalisz, G., Gieroba, B., Chrobak, O., Suchora, M., Starosta, A. L., & Sroka-Bartnicka, A. (2021). Vibrational spectroscopic analyses and imaging of the early middle ages hemp bast fibres recovered from lake sediments. *Molecules*, 26(5), 1314.
- Kanno, Y., Hanada, A., Chiba, Y., Ichikawa, T., Nakazawa, M., Matsui, M., ... & Seo, M. (2012). Identification of an abscisic acid transporter by functional screening using the receptor complex as a sensor. *Proceedings of the national academy of sciences*, 109(24), 9653-9658.
- Kapoor, D., Bhardwaj, S., Landi, M., Sharma, A., Ramakrishnan, M., & Sharma, A. (2020). The impact of drought in plant metabolism: How to exploit tolerance mechanisms to increase crop production. *Applied sciences*, 10(16), 5692.
- Kaur, G., & Asthir, B. (2017). Molecular responses to drought stress in plants. *Biologia plantarum*, 61(2), 201-209.
- Kaur, H., Manna, M., Thakur, T., Gautam, V., & Salvi, P. (2021). Imperative role of sugar signaling and transport during drought stress responses in plants. *Physiologia plantarum*, 171(4), 833-848.

- Kavi Kishor, P. B., Hima Kumari, P., Sunita, M. S. L., & Sreenivasulu, N. (2015). Role of proline in cell wall synthesis and plant development and its implications in plant ontogeny. *Frontiers in plant science*, 6, 544.
- Khan, N., Ali, S., Zandi, P., Mehmood, A., Ullah, S., Ikram, M., ... & Babar, M. A. (2020). Role of sugars, amino acids and organic acids in improving plant abiotic stress tolerance. *Pakistan journal of botany*, 52(2), 355-363.
- Kinoshita, T., & Seki, M. (2014). Epigenetic memory for stress response and adaptation in plants. *Plant and cell physiology*, 55(11), 1859-1863.
- Klunklin, W., & Savage, G. (2017). Effect on quality characteristics of tomatoes grown under well-watered and drought stress conditions. *Foods*, 6(8), 56.
- Koc, A., Markovic, D., Ninkovic, V., & Martinez, G. (2020). Molecular mechanisms regulating priming and stress memory. In *Priming-mediated stress and cross-stress tolerance in crop plants* (pp. 247-265). Academic Press.
- Koyro, H. W., Ahmad, P., & Geissler, N. (2012). Abiotic stress responses in plants: an overview. *Environmental adaptations and stress tolerance of plants in the era of climate change*, 1-28.
- Krasensky, J., & Jonak, C. (2012). Drought, salt, and temperature stress-induced metabolic rearrangements and regulatory networks. *Journal of experimental botany*, 63(4), 1593-1608.
- Kukavica, B. M., Veljović Jovanović, S. D., Menckhoff, L., & Lüthje, S. (2012). Cell wall-bound cationic and anionic class III isoperoxidases of pea root: biochemical characterization and function in root growth. *Journal of experimental botany*, 63(12), 4631-4645.
- Kulcheski, F. R., de Oliveira, L. F., Molina, L. G., Almerão, M. P., Rodrigues, F. A., Marcolino, J., ... & Margis, R. (2011). Identification of novel soybean microRNAs involved in abiotic and biotic stresses. *BMC genomics*, 12(1), 1-17.
- Kulik, A., Wawer, I., Krzywińska, E., Bucholc, M., & Dobrowolska, G. (2011). SnRK2 protein kinases—key regulators of plant response to abiotic stresses. *Omic: a journal of integrative biology*, 15(12), 859-872.
- Kumar, A., Basu, S., Ramegowda, V., & Pereira, A. (2017). Mechanisms of drought tolerance in rice. *Burleigh Dodds Science Publishing. Ltd*, 131-163.
- Kumar, S., Das, M., Sadhukhan, A., & Sahoo, L. (2022). Identification of differentially expressed mungbean miRNAs and their targets in response to drought stress by small RNA deep sequencing. *Current plant biology*, 100246.
- Kuromori, T., Seo, M., & Shinozaki, K. (2018). ABA transport and plant water stress responses. *Trends in plant science*, 23(6), 513-522.
- Kusvuran, S., & Dasgan, H. Y. (2017). Drought induced physiological and biochemical responses in *Solanum lycopersicum* genotypes differing to tolerance. *Acta scientiarum polonorum hortorum cultus*, 16(6), 2017.
- Lämke, J., & Bäurle, I. (2017). Epigenetic and chromatin-based mechanisms in environmental stress adaptation and stress memory in plants. *Genome biology*, 18(1), 1-11.
- Landi, S., De Lillo, A., Nurcato, R., Grillo, S., & Esposito, S. (2017). In-field study on traditional Italian tomato landraces: The constitutive activation of the ROS scavenging machinery reduces effects of drought stress. *Plant physiology and biochemistry*, 118, 150-160.
- Laxa, M., Liebthal, M., Telman, W., Chibani, K., & Dietz, K. J. (2019). The role of the plant antioxidant system in drought tolerance. *Antioxidants*, 8(4), 94.
- Le Gall, H., Philippe, F., Domon, J. M., Gillet, F., Pelloux, J., & Rayon, C. (2015). Cell wall metabolism in response to abiotic stress. *Plants*, 4(1), 112-166.
- Lea, P. J., Sodek, L., Parry, M. A., Shewry, P. R., & Halford, N. G. (2007). Asparagine in plants. *Annals of applied biology*, 150(1), 1-26.

- Leucci, M. R., Lenucci, M. S., Piro, G., & Dalessandro, G. (2008). Water stress and cell wall polysaccharides in the apical root zone of wheat cultivars varying in drought tolerance. *Journal of plant physiology*, 165(11), 1168-1180.
- Leufen, G., Noga, G., & Hunsche, M. (2016). Drought stress memory in sugar beet: mismatch between biochemical and physiological parameters. *Journal of plant growth regulation*, 35(3), 680-689.
- Li, L., Eichten, S. R., Shimizu, R., Petsch, K., Yeh, C. T., Wu, W., ... & Muehlbauer, G. J. (2014). Genome-wide discovery and characterization of maize long non-coding RNAs. *Genome biology*, 15(2), 1-15.
- Li, X., Ahammed, G. J., Zhang, Y. Q., Zhang, G. Q., Sun, Z. H., Zhou, J., ... & Shi, K. (2015). Carbon dioxide enrichment alleviates heat stress by improving cellular redox homeostasis through an ABA-independent process in tomato plants. *Plant biology*, 17(1), 81-89.
- Li, X., & Liu, F. (2016). Drought stress memory and drought stress tolerance in plants: biochemical and molecular basis. In *Drought Stress Tolerance in Plants*, Vol 1 (pp. 17-44). Springer, Cham.
- Li, S., Castillo-González, C., Yu, B., & Zhang, X. (2017). The functions of plant small RNAs in development and in stress responses. *The plant journal*, 90(4), 654-670.
- Li, P., Yang, H., Wang, L., Liu, H., Huo, H., Zhang, C., ... & Liu, L. (2019). Physiological and transcriptome analyses reveal short-term responses and formation of memory under drought stress in rice. *Frontiers in genetics*, 10, 55.
- Li, T., Huang, Y., Khadr, A., Wang, Y. H., Xu, Z. S., & Xiong, A. S. (2020). DcDREB1A, a DREB-binding transcription factor from *Daucus carota*, enhances drought tolerance in transgenic *Arabidopsis thaliana* and modulates lignin levels by regulating lignin-biosynthesis-related genes. *Environmental and experimental botany*, 169, 103896.
- Liang, C. Y., & Marchessault, R. H. (1959). Infrared spectra of crystalline polysaccharides. II. Native celluloses in the region from 640 to 1700 cm^{-1} . *Journal of polymer science*, 39(135), 269-278.
- Liang, X., Zhang, L., Natarajan, S. K., & Becker, D. F. (2013). Proline mechanisms of stress survival. *Antioxidants & redox signaling*, 19(9), 998-1011.
- Lim, C. W., Baek, W., Jung, J., Kim, J. H., & Lee, S. C. (2015). Function of ABA in stomatal defense against biotic and drought stresses. *International journal of molecular sciences*, 16(7), 15251-15270.
- Lin, J. T., Liu, S. C., Shen, Y. C., & Yang, D. J. (2011). Comparison of various preparation methods for determination of organic acids in fruit vinegars with a simple ion-exclusion liquid chromatography. *Food analytical methods*, 4(4), 531-539.
- Lindsay, M. A., Griffiths-Jones, S., Wight, M., & Werner, A. (2013). The functions of natural antisense transcripts. *Essays in biochemistry*, 54, 91-101.
- Liu, H. H., Tian, X., Li, Y. J., Wu, C. A., & Zheng, C. C. (2008). Microarray-based analysis of stress-regulated microRNAs in *Arabidopsis thaliana*. *RNA*, 14(5), 836-843.
- Liu, T. T., Zhu, D., Chen, W., Deng, W., He, H., He, G., ... & Deng, X. W. (2013). A global identification and analysis of small nucleolar RNAs and possible intermediate-sized non-coding RNAs in *Oryza sativa*. *Molecular plant*, 6(3), 830-846.
- Liu, X., Hao, L., Li, D., Zhu, L., & Hu, S. (2015). Long non-coding RNAs and their biological roles in plants. *Genomics, proteomics & bioinformatics*, 13(3), 137-147.
- Liu, Y., Song, Q., Li, D., Yang, X., & Li, D. (2017). Multifunctional roles of plant dehydrins in response to environmental stresses. *Frontiers in plant science*, 8, 1018.
- Liu, C., Xin, Y., Xu, L., Cai, Z., Xue, Y., Liu, Y., ... & Qi, Y. (2018). *Arabidopsis* ARGONAUTE 1 binds chromatin to promote gene transcription in response to hormones and stresses. *Developmental cell*, 44(3), 348-361.

- Liu, X., Zhang, X., Sun, B., Hao, L., Liu, C., Zhang, D., ... & Li, Y. (2019). Genome-wide identification and comparative analysis of drought-related microRNAs in two maize inbred lines with contrasting drought tolerance by deep sequencing. *PLoS One*, 14(7), e0219176.
- Liu, H., Able, A. J., & Able, J. A. (2022). Priming crops for the future: rewiring stress memory. *Trends in plant science*, 699-716.
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*, 25(4), 402-408.
- López-Ráez, J. A., Kohlen, W., Charnikhova, T., Mulder, P., Undas, A. K., Sergeant, M. J., ... & Bouwmeester, H. (2010). Does abscisic acid affect strigolactone biosynthesis?. *New phytologist*, 187(2), 343-354.
- Lukić, N., Kukavica, B., Davidović-Plavšić, B., Hasanagić, D., & Walter, J. (2020). Plant stress memory is linked to high levels of anti-oxidative enzymes over several weeks. *Environmental and experimental botany*, 178, 104166.
- Ma, Y., Szostkiewicz, I., Korte, A., Moes, D., Yang, Y., Christmann, A., & Grill, E. (2009). Regulators of PP2C phosphatase activity function as abscisic acid sensors. *Science*, 324(5930), 1064-1068.
- Ma, Y., Cao, J., He, J., Chen, Q., Li, X., & Yang, Y. (2018). Molecular mechanism for the regulation of ABA homeostasis during plant development and stress responses. *International journal of molecular sciences*, 19(11), 3643.
- Majer, P., Vidović, M., Czegeny, G., Veljović Jovanović, S., Strid, Å., & Hideg, É. (2016). Evaluation of procedures for assessing anti-and pro-oxidants in plant samples. *Analytical methods*, 8(28), 5569-5580.
- Malamy, J. E. (2005). Intrinsic and environmental response pathways that regulate root system architecture. *Plant, cell and environment*, 28(1), 67-77.
- Mane, S. P., Robinet, C. V., Ulanov, A., Schafleitner, R., Tincopa, L., Gaudin, A., ... & Grene, R. (2008). Molecular and physiological adaptation to prolonged drought stress in the leaves of two Andean potato genotypes. *Functional plant biology*, 35(8), 669-688.
- Marchessault, R. H. (1962). Application of infra-red spectroscopy to cellulose and wood polysaccharides. *Pure and applied chemistry*, 5(1-2), 107-130.
- Marček, T., Hamow, K. Á., Végh, B., Janda, T., & Darko, E. (2019). Metabolic response to drought in six winter wheat genotypes. *PLoS one*, 14(2), e0212411.
- Martínez, J. P., Silva, H. F. L. J., Ledent, J. F., & Pinto, M. (2007). Effect of drought stress on the osmotic adjustment, cell wall elasticity and cell volume of six cultivars of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *European journal of agronomy*, 26(1), 30-38.
- Massacci, A., Battistelli, A., & Loreto, F. (1996). Effect of drought stress on photosynthetic characteristics, growth and sugar accumulation of field-grown sweet sorghum. *Functional plant biology*, 23(3), 331-340.
- Massot, C., Stevens, R., Génard, M., Longuenesse, J. J., & Gautier, H. (2012). Light affects ascorbate content and ascorbate-related gene expression in tomato leaves more than in fruits. *Planta*, 235(1), 153-163.
- Mata, A. T., Jorge, T. F., Pires, M. V., & Antonio, C. (2016). Drought stress tolerance in plants: Insights from metabolomics. In *Drought Stress Tolerance in Plants*, Vol 2 (pp. 187-216). Springer, Cham.
- Mathan, J., Singh, A., & Ranjan, A. (2021). Sucrose transport in response to drought and salt stress involves ABA-mediated induction of *OsSWEET13* and *OsSWEET15* in rice. *Physiologia plantarum*, 171(4), 620-637.
- Mauch-Mani, B., Baccelli, I., Luna, E., & Flors, V. (2017). Defense priming: an adaptive part of induced resistance. *Annual review of plant biology*, 68, 485-512.

- McAdam, E. L., Brodribb, T. J., & McAdam, S. A. (2017). Does ozone increase ABA levels by non-enzymatic synthesis causing stomata to close?. *Plant, cell and environment*, 40(5), 741-747.
- Milosavljević, A., Prokić, L., Marjanović, M., Stikić, R., & Sabovljević, A. (2012). The effects of drought on the expression of *TAO1*, *NCED* and *EIL1* genes and ABA content in tomato wild-type and *flacca* mutant. *Archives of biological sciences*, 64(1), 297-306.
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M., & Van Breusegem, F. (2004). Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in plant science*, 9(10), 490-498.
- Montesinos-Pereira, D., Barrameda-Medina, Y., Romero, L., Ruiz, J. M., & Sánchez-Rodríguez, E. (2014). Genotype differences in the metabolism of proline and polyamines under moderate drought in tomato plants. *Plant biology*, 16(6), 1050-1057.
- Moore, J. P., Vicré-Gibouin, M., Farrant, J. M., & Driouich, A. (2008). Adaptations of higher plant cell walls to water loss: drought vs desiccation. *Physiologia plantarum*, 134(2), 237-245.
- Morina, F., Jovanović, L., Mojovic, M., Vidovic, M., Pankovic, D., & Veljovic Jovanović, S. (2010). Zinc-induced oxidative stress in *Verbascum thapsus* is caused by an accumulation of reactive oxygen species and quinhydrone in the cell wall. *Physiologia plantarum*, 140(3), 209-224.
- Moura, J. C. M. S., Bonine, C. A. V., de Oliveira Fernandes Viana, J., Dornelas, M. C., & Mazzafera, P. (2010). Abiotic and biotic stresses and changes in the lignin content and composition in plants. *Journal of integrative plant biology*, 52(4), 360-376.
- Mukarram, M., Choudhary, S., Kurjak, D., Petek, A., & Khan, M. M. A. (2021). Drought: Sensing, signalling, effects and tolerance in higher plants. *Physiologia plantarum*, 172(2), 1291-1300.
- Mukherjee, S., Mishra, A., & Trenberth, K. E. (2018). Climate change and drought: a perspective on drought indices. *Current climate change reports*, 4(2), 145-163.
- Munemasa, S., Hauser, F., Park, J., Waadt, R., Brandt, B., & Schroeder, J. I. (2015). Mechanisms of abscisic acid-mediated control of stomatal aperture. *Current opinion in plant biology*, 28, 154-162.
- Munné-Bosch, S., & Alegre, L. (2000). Changes in carotenoids, tocopherols and diterpenes during drought and recovery, and the biological significance of chlorophyll loss in *Rosmarinus officinalis* plants. *Planta*, 210(6), 925-931.
- Muñoz-Espinoza, V. A., López-Climent, M. F., Casaretto, J. A., & Gómez-Cadenas, A. (2015). Water stress responses of tomato mutants impaired in hormone biosynthesis reveal abscisic acid, jasmonic acid and salicylic acid interactions. *Frontiers in plant science*, 6, 997.
- Murtaza, G., Rasool, F., Habib, R., Javed, T., Sardar, K., Ayub, M. M., ... & Rasool, A. (2016). A review of morphological, physiological and biochemical responses of plants under drought stress conditions. *Imperial journal of interdisciplinary research*, 2, 1600-1606.
- Nadarajah, K., & Kumar, I. S. (2019). Drought response in rice: The miRNA story. *International journal of molecular sciences*, 20(15), 3766.
- Nagel, O. W., Konings, H., & Lambers, H. (1994). Growth rate, plant development and water relations of the ABA-deficient tomato mutant *sitiens*. *Physiologia plantarum*, 92(1), 102-108.
- Naikoo, M. I., Dar, M. I., Raghieb, F., Jaleel, H., Ahmad, B., Raina, A., ... & Naushin, F. (2019). Role and regulation of plants phenolics in abiotic stress tolerance: An overview. *Plant signaling molecules*, 157-168.
- Nakashima, K., Yamaguchi-Shinozaki, K., & Shinozaki, K. (2014). The transcriptional regulatory network in the drought response and its crosstalk in abiotic stress responses including drought, cold, and heat. *Frontiers in plant science*, 5, 170.

- Nambara, E., & Marion-Poll, A. (2005). Abscisic acid biosynthesis and catabolism. *Annu. rev. plant biol.*, 56, 165-185.
- Nawaz, M., & Wang, Z. (2020). Abscisic acid and glycine betaine mediated tolerance mechanisms under drought stress and recovery in *Axonopus compressus*: a new insight. *Scientific reports*, 10(1), 1-10.
- Nešković, M., Konjević, R., Čulafić, L. & Ivašković, S. (2003). Fiziologija biljaka. NNK International.
- Nguema-Ona, E., Vitré-Gibouin, M., Gotté, M., Plancot, B., Lerouge, P., Bardor, M., & Driouich, A. (2014). Cell wall O-glycoproteins and N-glycoproteins: aspects of biosynthesis and function. *Frontiers in plant science*, 5, 499.
- Nguyen, H. M., Kim, M., Ralph, P. J., Marín-Guirao, L., Pernice, M., & Procaccini, G. (2020). Stress memory in seagrasses: first insight into the effects of thermal priming and the role of epigenetic modifications. *Frontiers in plant science*, 11, 494.
- Nishizawa-Yokoi, A., Yabuta, Y., & Shigeoka, S. (2008). The contribution of carbohydrates including raffinose family oligosaccharides and sugar alcohols to protection of plant cells from oxidative damage. *Plant signaling and behavior*, 3(11), 1016-1018.
- Nitsch, L., Kohlen, W., Oplaat, C., Charnikhova, T., Cristescu, S., Michieli, P., ... & Rieu, I. (2012). ABA-deficiency results in reduced plant and fruit size in tomato. *Journal of plant physiology*, 169(9), 878-883.
- Noctor, G., & Foyer, C. H. (1998a). Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annual review of plant biology*, 49(1), 249-279.
- Noctor, G., & Foyer, C. H. (1998b). Simultaneous measurement of foliar glutathione and amino acids by high-performance liquid chromatography: a comparison with two other methods for assay of glutathione. *Analytical biochemistry*, 264, 98-110.
- Noctor, G., Veljović Jovanović, S., Driscoll, S., Novitskaya, L., & Foyer, C. H. (2002a). Drought and oxidative load in the leaves of C3 plants: a predominant role for photorespiration?. *Annals of botany*, 89(7), 841-850.
- Noctor, G., Gomez, L., Vanacker, H., & Foyer, C. H. (2002b). Interactions between biosynthesis, compartmentation and transport in the control of glutathione homeostasis and signalling. *Journal of experimental botany*, 53(372), 1283-1304.
- Noctor, G., Mhamdi, A., Chaouch, S., Han, Y. I., Neukermans, J., Marquez-Garcia, B. E. L. E. N., ... & Foyer, C. H. (2012). Glutathione in plants: an integrated overview. *Plant, cell and environment*, 35(2), 454-484.
- Noctor, G., Mhamdi, A., & Foyer, C. H. (2014). The roles of reactive oxygen metabolism in drought: not so cut and dried. *Plant physiology*, 164(4), 1636-1648.
- Noctor, G., Mhamdi, A., & Foyer, C. H. (2016). Oxidative stress and antioxidative systems: recipes for successful data collection and interpretation. *Plant, cell and environment*, 39(5), 1140-1160.
- Norton, M. R., Malinowski, D. P., & Volaire, F. (2016). Plant drought survival under climate change and strategies to improve perennial grasses. A review. *Agronomy for sustainable development*, 36(2), 1-15.
- Novitskaya, L., Trevanion, S. J., Driscoll, S., Foyer, C. H., & Noctor, G. (2002). How does photorespiration modulate leaf amino acid contents? A dual approach through modelling and metabolite analysis. *Plant, cell and environment*, 25(7), 821-835.
- Ntatsi, G., Savvas, D., Huntentburg, K., Druege, U., Hinch, D. K., Zuther, E., & Schwarz, D. (2014). A study on ABA involvement in the response of tomato to suboptimal root temperature using reciprocal grafts with *notabilis*, a null mutant in the ABA-biosynthesis gene *LeNCED1*. *Environmental and experimental botany*, 97, 11-21.

- Obata, T., Witt, S., Lisec, J., Palacios-Rojas, N., Florez-Sarasa, I., Yousfi, S., ... & Fernie, A. R. (2015). Metabolite profiles of maize leaves in drought, heat, and combined stress field trials reveal the relationship between metabolism and grain yield. *Plant physiology*, 169(4), 2665-2683.
- Osmolovskaya, N., Shumilina, J., Kim, A., Didio, A., Grishina, T., Bilova, T., ... & Wessjohann, L. A. (2018). Methodology of drought stress research: Experimental setup and physiological characterization. *International journal of molecular sciences*, 19(12), 4089.
- Ozturk, M., Turkyilmaz Unal, B., García-Caparrós, P., Khursheed, A., Gul, A., & Hasanuzzaman, M. (2021). Osmoregulation and its actions during the drought stress in plants. *Physiologia plantarum*, 172(2), 1321-1335.
- Panda, D., Mishra, S. S., & Behera, P. K. (2021). Drought tolerance in rice: focus on recent mechanisms and approaches. *Rice science*, 28(2), 119-132.
- Pantin, F., Monnet, F., Jannaud, D., Costa, J. M., Renaud, J., Muller, B., ... & Genty, B. (2013). The dual effect of abscisic acid on stomata. *New phytologist*, 197(1), 65-72.
- Park, S. Y., Fung, P., Nishimura, N., Jensen, D. R., Fujii, H., Zhao, Y., ... & Cutler, S. R. (2009). Abscisic acid inhibits type 2C protein phosphatases via the PYR/PYL family of START proteins. *Science*, 324(5930), 1068-1071.
- Pastori, G. M., Kiddle, G., Antoniw, J., Bernard, S., Veljović Jovanović, S., Verrier, P. J., ... & Foyer, C. H. (2003). Leaf vitamin C contents modulate plant defense transcripts and regulate genes that control development through hormone signaling. *The plant cell*, 15(4), 939-951.
- Petrović, I., Jovanović, Z., Stikić, R., Marjanović, M., & Savić, S. (2020). Influence of severe drought on leaf response in ABA contrasting tomato genotypes (wild type and *flacca* mutant). In *Biology and life sciences forum* (Vol. 4, No. 1, p. 96). Multidisciplinary Digital Publishing Institute.
- Pignocchi, C., & Foyer, C. H. (2003). Apoplastic ascorbate metabolism and its role in the regulation of cell signalling. *Current opinion in plant biology*, 6(4), 379-389.
- Pires, M. V., Pereira Júnior, A. A., Medeiros, D. B., Daloso, D. M., Pham, P. A., Barros, K. A., ... & Fernie, A. R. (2016). The influence of alternative pathways of respiration that utilize branched-chain amino acids following water shortage in *Arabidopsis*. *Plant, cell and environment*, 39(6), 1304-1319.
- Planchet, E., Verdu, I., Delahaie, J., Cukier, C., Girard, C., Morère-Le Paven, M. C., & Limami, A. M. (2014). Abscisic acid-induced nitric oxide and proline accumulation in independent pathways under water-deficit stress during seedling establishment in *Medicago truncatula*. *Journal of experimental botany*, 65(8), 2161-2170.
- Poór, P., Borbély, P., Czékus, Z., Takács, Z., Ördög, A., Popović, B., & Tari, I. (2019). Comparison of changes in water status and photosynthetic parameters in wild type and abscisic acid-deficient *sitiens* mutant of tomato (*Solanum lycopersicum* cv. Rheinlands Ruhm) exposed to sublethal and lethal salt stress. *Journal of plant physiology*, 232, 130-140.
- Pornsiriwong, W., Estavillo, G. M., Chan, K. X., Tee, E. E., Ganguly, D., Crisp, P. A., ... & Pogson, B. J. (2017). A chloroplast retrograde signal, 3'-phosphoadenosine 5'-phosphate, acts as a secondary messenger in abscisic acid signaling in stomatal closure and germination. *Elife*, 6, e23361.
- Postiglione, A. E., & Muday, G. K. (2020). The role of ROS homeostasis in ABA-induced guard cell signaling. *Frontiers in plant science*, 968.
- Qi, X., Xie, S., Liu, Y., Yi, F., & Yu, J. (2013). Genome-wide annotation of genes and noncoding RNAs of foxtail millet in response to simulated drought stress by deep sequencing. *Plant molecular biology*, 83(4), 459-473.
- Qin, T., Zhao, H., Cui, P., Albeshar, N., & Xiong, L. (2017). A nucleus-localized long non-coding RNA enhances drought and salt stress tolerance. *Plant physiology*, 175(3), 1321-1336.

- Quarrie, S. A., Whitford, P. N., Appleford, N. E. J., Wang, T. L., Cook, S. K., Henson, I. E., & Loveys, B. R. (1988). A monoclonal antibody to (S)-abscisic acid: its characterisation and use in a radioimmunoassay for measuring abscisic acid in crude extracts of cereal and lupin leaves. *Planta*, 173(3), 330-339.
- Raghavendra, A. S., Gonugunta, V. K., Christmann, A., & Grill, E. (2010). ABA perception and signalling. *Trends in plant science*, 15(7), 395-401.
- Ramanjulu, S., & Sudhakar, C. (1997). Drought tolerance is partly related to amino acid accumulation and ammonia assimilation: a comparative study in two mulberry genotypes differing in drought sensitivity. *Journal of plant physiology*, 150(3), 345-350.
- Reddy, A. R., Chaitanya, K. V., & Vivekanandan, M. (2004). Drought-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants. *Journal of plant physiology*, 161(11), 1189-1202.
- Redillas, M. C., Park, S. H., Lee, J. W., Kim, Y. S., Jeong, J. S., Jung, H., ... & Kim, J. K. (2012). Accumulation of trehalose increases soluble sugar contents in rice plants conferring tolerance to drought and salt stress. *Plant biotechnology reports*, 6(1), 89-96.
- Rhoads, D. M., Umbach, A. L., Subbaiah, C. C., & Siedow, J. N. (2006). Mitochondrial reactive oxygen species. Contribution to oxidative stress and interorganellar signaling. *Plant physiology*, 141(2), 357-366.
- Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., & Paganga, G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free radical biology and medicine*, 20(7), 933-956.
- Rizhsky, L., Liang, H., Shuman, J., Shulaev, V., Davletova, S., & Mittler, R. (2004). When defense pathways collide. The response of Arabidopsis to a combination of drought and heat stress. *Plant physiology*, 134(4), 1683-1696.
- Roig-Oliver, M., Bresta, P., Nadal, M., Liakopoulos, G., Nikolopoulos, D., Karabourniotis, G., ... & Flexas, J. (2020a). Cell wall composition and thickness affect mesophyll conductance to CO₂ diffusion in *Helianthus annuus* under water deprivation. *Journal of experimental botany*, 71(22), 7198-7209.
- Roig-Oliver, M., Nadal, M., Clemente-Moreno, M. J., Bota, J., & Flexas, J. (2020b). Cell wall components regulate photosynthesis and leaf water relations of *Vitis vinifera* cv. Grenache acclimated to contrasting environmental conditions. *Journal of plant physiology*, 244, 153084.
- Rolando, J. L., Ramírez, D. A., Yactayo, W., Monneveux, P., & Quiroz, R. (2015). Leaf greenness as a drought tolerance related trait in potato (*Solanum tuberosum* L.). *Environmental and experimental botany*, 110, 27-35.
- Rosa, M., Prado, C., Podazza, G., Interdonato, R., González, J. A., Hilal, M., & Prado, F. E. (2009). Soluble sugars: Metabolism, sensing and abiotic stress: A complex network in the life of plants. *Plant signaling and behavior*, 4(5), 388-393.
- Rosas-Cárdenas, F., Durán-Figueroa, N., Vielle-Calzada, J. P., Cruz-Hernández, A., Marsch-Martínez, N., & de Folter, S. (2011). A simple and efficient method for isolating small RNAs from different plant species. *Plant Methods*, 7(1), 1-7.
- Rustioni, L., & Bianchi, D. (2021). Drought increases chlorophyll content in stems of *Vitis* interspecific hybrids. *Theoretical and experimental plant physiology*, 33(1), 69-78.
- Saad-Allah, K. M., Nessem, A. A., Ebrahim, M. K., & Gad, D. (2021). Evaluation of drought tolerance of five maize genotypes by virtue of physiological and molecular responses. *Agronomy*, 12(1), 59.
- Sabir, N., & Singh, B. (2013). Protected cultivation of vegetables in global arena: A review. *Indian journal of agricultural sciences*, 83(2), 123-135.

- Saeedipour, S. (2013). Relationship of grain yield, ABA and proline accumulation in tolerant and sensitive wheat cultivars as affected by water stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological sciences*, 83(3), 311-315.
- Sagi, M., Fluhr, R., & Lips, S. H. (1999). Aldehyde oxidase and xanthine dehydrogenase in a *flacca* tomato mutant with deficient abscisic acid and wilted phenotype. *Plant physiology*, 120(2), 571-578.
- Sakakibara, H., Honda, Y., Nakagawa, S., Ashida, H., & Kanazawa, K. (2003). Simultaneous determination of all polyphenols in vegetables, fruits, and teas. *Journal of agricultural and food chemistry*, 51(3), 571-581.
- Salehi-Lisar, S. Y., & Bakhshayeshan-Agdam, H. (2016). Drought stress in plants: causes, consequences, and tolerance. In *Drought stress tolerance in plants*, Vol 1 (pp. 1-16). Springer, Cham.
- Salehi-Lisar, S. Y., & Bakhshayeshan-Agdam, H. (2020). Agronomic crop responses and tolerance to drought stress. In *Agronomic crops* (pp. 63-91). Springer, Singapore.
- Sampedro, J., & Cosgrove, D. J. (2005). The expansin superfamily. *Genome biology*, 6(12), 1-11.
- Sanchez, D. H., Schwabe, F., Erban, A., Udvardi, M. K., & Kopka, J. (2012). Comparative metabolomics of drought acclimation in model and forage legumes. *Plant, cell and environment*, 35(1), 136-149.
- Sasidharan, R., Voesenek, L. A., & Pierik, R. (2011). Cell wall modifying proteins mediate plant acclimatization to biotic and abiotic stresses. *Critical reviews in plant sciences*, 30(6), 548-562.
- Savouré, A., Hua, X. J., Bertauche, N., Montagu, M. V., & Verbruggen, N. (1997). Abscisic acid-independent and abscisic acid-dependent regulation of proline biosynthesis following cold and osmotic stresses in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular and general genetics MGG*, 254(1), 104-109.
- Schachtman, D. P., & Goodger, J. Q. (2008). Chemical root to shoot signaling under drought. *Trends in plant science*, 13(6), 281-287.
- Scholander, P. F., Bradstreet, E. D., Hemmingsen, E. A., & Hammel, H. T. (1965). Sap Pressure in Vascular Plants: Negative hydrostatic pressure can be measured in plants. *Science*, 148(3668), 339-346.
- Schroeder, J. I., Kwak, J. M., & Allen, G. J. (2001). Guard cell abscisic acid signalling and engineering drought hardiness in plants. *Nature*, 410(6826), 327-330.
- Scott, P. (2000). Resurrection plants and the secrets of eternal leaf. *Annals of botany*, 85(2), 159-166.
- Seleiman, M. F., Al-Suhaibani, N., Ali, N., Akmal, M., Alotaibi, M., Refay, Y., ... & Battaglia, M. L. (2021). Drought stress impacts on plants and different approaches to alleviate its adverse effects. *Plants*, 10(2), 259.
- Seo, M., & Koshiba, T. (2011). Transport of ABA from the site of biosynthesis to the site of action. *Journal of plant research*, 124(4), 501-507.
- Sharma, P., & Dubey, R. S. (2005). Drought induces oxidative stress and enhances the activities of antioxidant enzymes in growing rice seedlings. *Plant growth regulation*, 46(3), 209-221.
- Sharma, S., Villamor, J. G., & Verslues, P. E. (2011). Essential role of tissue-specific proline synthesis and catabolism in growth and redox balance at low water potential. *Plant physiology*, 157(1), 292-304.
- Sharma, P., Jha, A. B., Dubey, R. S., & Pessarakli, M. (2012). Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *Journal of botany*, 2012.

- Sharma, A., Shahzad, B., Kumar, V., Kohli, S. K., Sidhu, G. P. S., Bali, A. S., ... & Zheng, B. (2019). Phytohormones regulate accumulation of osmolytes under abiotic stress. *Biomolecules*, 9(7), 285.
- Sharma, A., Kumar, V., Shahzad, B., Ramakrishnan, M., Singh Sidhu, G. P., Bali, A. S., ... & Zheng, B. (2020). Photosynthetic response of plants under different abiotic stresses: a review. *Journal of plant growth regulation*, 39(2), 509-531.
- Sharp, R. E., LeNoble, M. E., Else, M. A., Thorne, E. T., & Gherardi, F. (2000). Endogenous ABA maintains shoot growth in tomato independently of effects on plant water balance: evidence for an interaction with ethylene. *Journal of experimental botany*, 51(350), 1575-1584.
- Sharp, R. E. (2002). Interaction with ethylene: changing views on the role of abscisic acid in root and shoot growth responses to water stress. *Plant, cell and environment*, 25(2), 211-222.
- Shavrukov, Y., Kurishbayev, A., Jatayev, S., Shvidchenko, V., Zotova, L., Koekemoer, F., ... & Langridge, P. (2017). Early flowering as a drought escape mechanism in plants: How can it aid wheat production?. *Frontiers in plant science*, 1950.
- Shigeoka, S., Ishikawa, T., Tamoi, M., Miyagawa, Y., Takeda, T., Yabuta, Y., & Yoshimura, K. (2002). Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. *Journal of experimental botany*, 53(372), 1305-1319.
- Shinozaki, K., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (1997). Gene expression and signal transduction in water-stress response. *Plant physiology*, 115(2), 327.
- Shinozaki, K., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2007). Gene networks involved in drought stress response and tolerance. *Journal of experimental botany*, 58(2), 221-227.
- Showalter, A. M. (1993). Structure and function of plant cell wall proteins. *The plant cell*, 5(1), 9.
- Simonović, J., Stevanić, J., Djikanović, D., Salmén, L., & Radotić, K. (2011). Anisotropy of cell wall polymers in branches of hardwood and softwood: a polarized FTIR study. *Cellulose*, 18(6), 1433-1440.
- Simonović Radosavljević, J., Bogdanović Pristov, J., Steinbach, G., Mouille, G., Tufegdžić, S., Maksimović, V., ... & Radotić, K. (2017). Parenchyma cell wall structure in twining stem of *Dioscorea balcanica*. *Cellulose*, 24(11), 4653-4669.
- Singh, D., & Laxmi, A. (2015). Transcriptional regulation of drought response: a tortuous network of transcriptional factors. *Frontiers in plant science*, 6, 895.
- Singh, M., Kumar, J., Singh, S., Singh, V. P., & Prasad, S. M. (2015). Roles of osmoprotectants in improving salinity and drought tolerance in plants: a review. *Reviews in environmental science and bio/technology*, 14(3), 407-426.
- Smeekens, S., Ma, J., Hanson, J., & Rolland, F. (2010). Sugar signals and molecular networks controlling plant growth. *Current opinion in plant biology*, 13(3), 273-278.
- Smirnoff, N., & Wheeler, G. L. (2000). Ascorbic acid in plants: biosynthesis and function. *Critical reviews in plant sciences*, 19(4), 267-290.
- Smirnoff, N. (2005). Ascorbate, tocopherol and carotenoids: metabolism, pathway engineering and functions. *Antioxidants and reactive oxygen species in plants*, 2005, 53-86.
- Smirnoff, N., & Arnaud, D. (2019). Hydrogen peroxide metabolism and functions in plants. *New phytologist*, 221(3), 1197-1214.
- Soma, F., Takahashi, F., Yamaguchi-Shinozaki, K., & Shinozaki, K. (2021). Cellular Phosphorylation Signaling and Gene Expression in Drought Stress Responses: ABA-Dependent and ABA-Independent Regulatory Systems. *Plants*, 10(4), 756.

- Sousaraei, N., Mashayekhi, K., Mousavizadeh, S. J., Akbarpour, V., Medina, J., & Aliniaiefard, S. (2021). Screening of tomato landraces for drought tolerance based on growth and chlorophyll fluorescence analyses. *Horticulture, environment, and biotechnology*, 62(4), 521-535.
- Sreenivasulu, N., Harshavardhan, V. T., Govind, G., Seiler, C., & Kohli, A. (2012). Contrapuntal role of ABA: does it mediate stress tolerance or plant growth retardation under long-term drought stress?. *Gene*, 506(2), 265-273.
- Stålfelt, M. G. (1955). The stomata as a hydrophotic regulator of the water deficit of the plant. *Physiologia plantarum*, 8(3), 572-593.
- Stewart, D. (1996). Fourier transform infrared microspectroscopy of plant tissues. *Applied spectroscopy*, 50(3), 357-365.
- Stief, A., Altmann, S., Hoffmann, K., Pant, B. D., Scheible, W. R., & Bäurle, I. (2014). *Arabidopsis miR156* regulates tolerance to recurring environmental stress through *SPL* transcription factors. *The plant cell*, 26(4), 1792-1807.
- Stikić, R., Popović, S., Srdić, M., Savić, D., Jovanović, Z., Prokić, L., & Zdravković, J. (2003). Partial root drying (PRD): a new technique for growing plants that saves water and improves the quality of fruit. *Bulgarian journal of plant physiology*, 29(3-4, Special issue).
- Streit, D., Shanmugam, T., Garbelyanski, A., Simm, S., & Schleiff, E. (2020). The existence and localization of nuclear snoRNAs in *Arabidopsis thaliana* revisited. *Plants*, 9(8), 1016.
- Sun, C., Gao, X., Chen, X., Fu, J., & Zhang, Y. (2016). Metabolic and growth responses of maize to successive drought and re-watering cycles. *Agricultural water management*, 172, 62-73.
- Swarcewicz, B., Sawikowska, A., Marczak, Ł., Łuczak, M., Ciesiołka, D., Krystkowiak, K., ... & Stobiecki, M. (2017). Effect of drought stress on metabolite contents in barley recombinant inbred line population revealed by untargeted GC-MS profiling. *Acta physiologiae plantarum*, 39(8), 1-16.
- Sweet, W. J., Morrison, J. C., Labavitch, J. M., & Matthews, M. A. (1990). Altered synthesis and composition of cell wall of grape (*Vitis vinifera* L.) leaves during expansion and growth-inhibiting water deficits. *Plant and cell physiology*, 31(4), 407-414.
- Szabados, L., & Saviouré, A. (2010). Proline: a multifunctional amino acid. *Trends in plant science*, 15(2), 89-97.
- Szechyńska-Hebda, M., Czarnocka, W., Hebda, M., & Karpiński, S. (2016). *PAD4*, *LSD1* and *EDS1* regulate drought tolerance, plant biomass production, and cell wall properties. *Plant cell reports*, 35(3), 527-539.
- Szymanska-Chargot, M., & Zdunek, A. (2013). Use of FT-IR spectra and PCA to the bulk characterization of cell wall residues of fruits and vegetables along a fraction process. *Food biophysics*, 8(1), 29-42.
- Tal, M. (1966). Abnormal stomatal behavior in wilted mutants of tomato. *Plant physiology*, 41(8), 1387-1391.
- Tal, M., & Imber, D. (1970). Abnormal stomatal behavior and hormonal imbalance in *flacca*, a wilted mutant of tomato: II. Auxin-and abscisic acid-like activity. *Plant physiology*, 46(3), 373-376.
- Talaat, N. B. (2019). Role of reactive oxygen species signaling in plant growth and development. *Reactive oxygen, nitrogen and sulfur species in plants: production, metabolism, signaling and defense mechanisms*, 225-266.
- Taylor, I. B., & Tarr, A. R. (1984). Phenotypic interactions between abscisic acid deficient tomato mutants. *Theoretical and applied genetics*, 68(1), 115-119.
- Taylor, I. B., Burbidge, A., & Thompson, A. J. (2000). Control of abscisic acid synthesis. *Journal of experimental Botany*, 51(350), 1563-1574.

- Tenhaken, R. (2015). Cell wall remodeling under abiotic stress. *Frontiers in plant science*, 5, 771.
- Theerakulpisut, P., & Gunnula, W. (2012). Exogenous Sorbitol and Trehalose mitigated salt stress damage in salt-sensitive but not salt-tolerant rice seedlings. *Asian journal of crop science*, 4(4), 165-170.
- Todaka, D., Zhao, Y., Yoshida, T., Kudo, M., Kidokoro, S., Mizoi, J., ... & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2017). Temporal and spatial changes in gene expression, metabolite accumulation and phytohormone content in rice seedlings grown under drought stress conditions. *The plant journal*, 90(1), 61-78.
- Treutter, D. (2006). Significance of flavonoids in plant resistance: a review. *Environmental chemistry letters*, 4(3), 147-157.
- Tripathy, B. C., & Oelmüller, R. (2012). Reactive oxygen species generation and signaling in plants. *Plant signaling and behavior*, 7(12), 1621-1633.
- Turgut-Kara, N., Arikan, B., & Celik, H. (2020). Epigenetic memory and priming in plants. *Genetica*, 148(2), 47-54.
- Urano, K., Maruyama, K., Ogata, Y., Morishita, Y., Takeda, M., Sakurai, N., ... & Shinozaki, K. (2009). Characterization of the ABA-regulated global responses to dehydration in *Arabidopsis* by metabolomics. *The plant journal*, 57(6), 1065-1078.
- Vaucheret, H. (2006). Post-transcriptional small RNA pathways in plants: mechanisms and regulations. *Genes and development*, 20(7), 759-771.
- Veljović Jovanović, S. D., Pignocchi, C., Noctor, G., & Foyer, C. H. (2001). Low ascorbic acid in the *vtc-1* mutant of *Arabidopsis* is associated with decreased growth and intracellular redistribution of the antioxidant system. *Plant physiology*, 127(2), 426-435.
- Veljović Jovanović, S., Kukavica, B., Vidović, M., Morina, F., & Menckhoff, L. (2018). Class III peroxidases: functions, localization and redox regulation of isoenzymes. In *Antioxidants and antioxidant enzymes in higher plants* (pp. 269-300). Springer, Cham.
- Veljović Jovanović, S., Vidović, M., & Morina, F. (2017). Ascorbate as a key player in plant abiotic stress response and tolerance. In *Ascorbic acid in plant growth, development and stress tolerance* (pp. 47-109). Springer, Cham.
- Verbruggen, N., & Hermans, C. (2008). Proline accumulation in plants: a review. *Amino acids*, 35(4), 753-759.
- Verslues, P. E., & Bray, E. A. (2006). Role of abscisic acid (ABA) and *Arabidopsis thaliana* ABA-insensitive loci in low water potential-induced ABA and proline accumulation. *Journal of experimental botany*, 57(1), 201-212.
- Vidović, M., Morina, F., Milić, S., Zechmann, B., Albert, A., Winkler, J. B., & Veljović Jovanović, S. (2015a). Ultraviolet-B component of sunlight stimulates photosynthesis and flavonoid accumulation in variegated *Plectranthus coleoides* leaves depending on background light. *Plant, cell and environment*, 38(5), 968-979.
- Vidović, M., Morina, F., Milić, S., Albert, A., Zechmann, B., Tosti, T., ... & Veljović Jovanović, S. (2015b). Carbon allocation from source to sink leaf tissue in relation to flavonoid biosynthesis in variegated *Pelargonium zonale* under UV-B radiation and high PAR intensity. *Plant physiology and biochemistry*, 93, 44-55.
- Vishwakarma, K., Upadhyay, N., Kumar, N., Yadav, G., Singh, J., Mishra, R. K., ... & Sharma, S. (2017). Abscisic acid signaling and abiotic stress tolerance in plants: a review on current knowledge and future prospects. *Frontiers in plant science*, 8, 161.
- Wang, T., Chen, L., Zhao, M., Tian, Q., & Zhang, W. H. (2011). Identification of drought-responsive microRNAs in *Medicago truncatula* by genome-wide high-throughput sequencing. *BMC genomics*, 12(1), 1-11.

- Wang, Y., Wang, Z., Amyot, L., Tian, L., Xu, Z., Gruber, M. Y., & Hannoufa, A. (2015). Ectopic expression of miR156 represses nodulation and causes morphological and developmental changes in *Lotus japonicus*. *Molecular genetics and genomics*, 290(2), 471-484.
- Wang, X., Cai, X., Xu, C., Wang, Q., & Dai, S. (2016). Drought-responsive mechanisms in plant leaves revealed by proteomics. *International journal of molecular sciences*, 17(10), 1706.
- Wang, J., Meng, X., Dobrovolskaya, O. B., Orlov, Y. L., & Chen, M. (2017). Non-coding RNAs and their roles in stress response in plants. *Genomics, proteomics & bioinformatics*, 15(5), 301-312.
- Wang, D., Liu, H., Wang, H., Zhang, P., & Shi, C. (2020). A novel sucrose transporter gene *IbSUT4* involves in plant growth and response to abiotic stress through the ABF-dependent ABA signaling pathway in Sweetpotato. *BMC plant biology*, 20(1), 1-15.
- Weidong, Q. I., Hongping, C., Zuozhen, Y., Biaolin, H. U., Xiangdong, L., Bing, A., ... & Fantao, Z. (2020). Systematic characterization of long non-coding RNAs and their responses to drought stress in *Dongxiang* wild rice. *Rice science*, 27(1), 21-31.
- Wellstein, C., Poschlod, P., Gohlke, A., Chelli, S., Campetella, G., Rosbakh, S., ... & Beierkuhnlein, C. (2017). Effects of extreme drought on specific leaf area of grassland species: A meta-analysis of experimental studies in temperate and sub-Mediterranean systems. *Global Change Biology*, 23(6), 2473-2481.
- Wilkinson, S. (1999). pH as a stress signal. *Plant growth regulation*, 29(1), 87-99.
- Wilkinson, S., & Davies, W. J. (2002). ABA-based chemical signalling: the co-ordination of responses to stress in plants. *Plant, cell and environment*, 25(2), 195-210.
- Winter, G., Todd, C. D., Trovato, M., Forlani, G., & Funck, D. (2015). Physiological implications of arginine metabolism in plants. *Frontiers in plant science*, 6, 534.
- Wojtyła, Ł., Lechowska, K., Kubala, S., & Garnczarska, M. (2016). Molecular processes induced in primed seeds—increasing the potential to stabilize crop yields under drought conditions. *Journal of plant physiology*, 203, 116-126.
- Wolf, S., Hématy, K., & Höfte, H. (2012). Growth control and cell wall signaling in plants. *Annual review of plant biology*, 63, 381-407.
- Wu, P., & Bolen, D. W. (2006). Osmolyte-induced protein folding free energy changes. *Proteins: Structure, Function, and bioinformatics*, 63(2), 290-296.
- Wu, H., Wu, X., Li, Z., Duan, L., & Zhang, M. (2012). Physiological evaluation of drought stress tolerance and recovery in cauliflower (*Brassica oleracea* L.) seedlings treated with methyl jasmonate and coronatine. *Journal of plant growth regulation*, 31(1), 113-123.
- Wu, X., Yuan, J., Luo, A., Chen, Y., & Fan, Y. (2016). Drought stress and re-watering increase secondary metabolites and enzyme activity in dendrobium moniliforme. *Industrial Crops and Products*, 94, 385-393.
- Xiao, M., Li, Z., Zhu, L., Wang, J., Zhang, B., Zheng, F., ... & Zhang, Z. (2021). The multiple roles of ascorbate in the abiotic stress response of plants: Antioxidant, cofactor, and regulator. *Frontiers in plant science*, 12, 592.
- Xie, K., Shen, J., Hou, X., Yao, J., Li, X., Xiao, J., & Xiong, L. (2012). Gradual increase of miR156 regulates temporal expression changes of numerous genes during leaf development in rice. *Plant physiology*, 158(3), 1382-1394.
- Xiong, L., Schumaker, K. S., & Zhu, J. K. (2002). Cell signaling during cold, drought, and salt stress. *The plant cell*, 14(suppl_1), S165-S183.
- Xiong, Y., McCormack, M., Li, L., Hall, Q., Xiang, C., & Sheen, J. (2013). Glucose-TOR signalling reprograms the transcriptome and activates meristems. *Nature*, 496(7444), 181-186.

- Xu, Z., Zhou, G., & Shimizu, H. (2009). Are plant growth and photosynthesis limited by pre-drought following rewatering in grass?. *Journal of experimental botany*, 60(13), 3737-3749.
- Xu, W., Cui, K., Xu, A., Nie, L., Huang, J., & Peng, S. (2015). Drought stress condition increases root to shoot ratio via alteration of carbohydrate partitioning and enzymatic activity in rice seedlings. *Acta physiologiae plantarum*, 37(2), 1-11.
- Yamaguchi-Shinozaki, K., & Shinozaki, K. (2005). Organization of cis-acting regulatory elements in osmotic-and cold-stress-responsive promoters. *Trends in plant science*, 10(2), 88-94.
- Yan, W., Zheng, S., Zhong, Y., & Shangguan, Z. (2017). Contrasting dynamics of leaf potential and gas exchange during progressive drought cycles and recovery in *Amorpha fruticosa* and *Robinia pseudoacacia*. *Scientific reports*, 7(1), 1-12.
- Yang, J., Zhang, J., Li, C., Zhang, Z., Ma, F., & Li, M. (2019a). Response of sugar metabolism in apple leaves subjected to short-term drought stress. *Plant physiology and biochemistry*, 141, 164-171.
- Yang, J. W., Zhu, X., Li, S. G., Tang, X., Zhang, N., & Si, H. J. (2019b). A novel potato microRNA stu-miR856 regulates mitogen-activated protein kinase genes contributing to drought tolerance. *Biologia plantarum*, 63(1), 618-626.
- Yang, X., Lu, M., Wang, Y., Wang, Y., Liu, Z., & Chen, S. (2021). Response mechanism of plants to drought stress. *Horticulturae*, 7(3), 50.
- Yoshida, Y., Kiyosue, T., Nakashima, K., Yamaguchi-Shinozaki, K., & Shinozaki, K. (1997). Regulation of levels of proline as an osmolyte in plants under water stress. *Plant and cell physiology*, 38(10), 1095-1102.
- Yoshida, T., Mogami, J., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2014). ABA-dependent and ABA-independent signaling in response to osmotic stress in plants. *Current opinion in plant biology*, 21, 133-139.
- You, J., Zhang, Y., Liu, A., Li, D., Wang, X., Dossa, K., ... & Zhang, X. (2019). Transcriptomic and metabolomic profiling of drought-tolerant and susceptible sesame genotypes in response to drought stress. *BMC plant biology*, 19(1), 1-16.
- Yu, W., Zhao, R., Wang, L., Zhang, S., Li, R., Sheng, J., & Shen, L. (2019). ABA signaling rather than ABA metabolism is involved in trehalose-induced drought tolerance in tomato plants. *Planta*, 250(2), 643-655.
- Zhang, X., Zou, Z., Gong, P., Zhang, J., Ziaf, K., Li, H., ... & Ye, Z. (2011). Over-expression of microRNA169 confers enhanced drought tolerance to tomato. *Biotechnology letters*, 33(2), 403-409.
- Zhang, H., Zhu, H., Pan, Y., Yu, Y., Luan, S., & Li, L. (2014). A DTX/MATE-type transporter facilitates abscisic acid efflux and modulates ABA sensitivity and drought tolerance in *Arabidopsis*. *Molecular plant*, 7(10), 1522-1532.
- Zhang, Z. W., Wu, Z. L., Feng, L. Y., Dong, L. H., Song, A. J., Yuan, M., ... & Yuan, S. (2016). Mg-protoporphyrin IX signals enhance plant's tolerance to cold stress. *Frontiers in plant science*, 7, 1545.
- Zhang, C., Shi, S., Liu, Z., Yang, F., & Yin, G. (2019). Drought tolerance in alfalfa (*Medicago sativa* L.) varieties is associated with enhanced antioxidative protection and declined lipid peroxidation. *Journal of plant physiology*, 232, 226-240.
- Živanovic, B., Vidović, M., Komić, S. M., Jovanović, L., Kolarž, P., Morina, F., & Jovanović, S. V. (2017). Contents of phenolics and carotenoids in tomato grown under polytunnels with different UV-transmission rates. *Turkish journal of agriculture and forestry*, 41(2), 113-120.

8. Prilozi

Tabela P1. Rezultati dvo-faktorske ANOVA-e prikazuju efekte tretmana (suša – D i rehidracija – R), genotipa (divlji tip i *flacca* mutant) i njihove interakcije na sadržaj ABA, provodljivost stoma i ukupni vodni potencijal u listovima paradajza.

Parametar	Izvor varijacije	df	F	<i>p</i>	Parametar	Izvor varijacije	df	F	<i>p</i>
ABA (D)	Genotip	1	21,31	0,000110	ABA (R)	Genotip	1	41,65	0,000003
	Tretman	1	20,37	0,000143		Tretman	1	10,13	0,004671
	Genotip × tretman	1	2,53	0,125117		Genotip × tretman	1	2,54	0,126837
g_s (D)	Genotip	1	238,13	0,000000	g_s (R)	Genotip	1	5,88	0,027575
	Tretman	1	72,62	0,000000		Tretman	1	16,61	0,000882
	Genotip × tretman	1	13,99	0,000638		Genotip × tretman	1	11,18	0,004127
ψ(D)	Genotip	1	46,30	0,000004	ψ(R)	Genotip	1	7,30	0,019243
	Tretman	1	35,80	0,000019		Tretman	1	0,53	0,481897
	Genotip × tretman	1	34,24	0,000025		Genotip × tretman	1	4,55	0,054340

Tabela P2. Rezultati dvo-faktorske ANOVA-e prikazuju efekte tretmana (suša – D i rehidracija – R), genotipa (divlji tip i *flacca* mutant) i njihove interakcije na svežu i suhu masu listova i lisnu površinu kod biljaka paradajza.

Parametar	Izvor varijacije	df	F	<i>p</i>	Parametar	Izvor varijacije	df	F	<i>p</i>
Sveža masa (D)	Genotip	1	91,05	0,000001	Sveža masa (R)	Genotip	1	610,92	0,000000
	Tretman	1	0,59	0,458391		Tretman	1	9,76	0,008777
	Genotip × tretman	1	5,08	0,043763		Genotip × tretman	1	0,29	0,600238
Suva masa (D)	Genotip	1	36,72	0,000057	Suva masa (R)	Genotip	1	38,63	0,000045
	Tretman	1	7,10	0,020645		Tretman	1	0,69	0,422220
	Genotip × tretman	1	0,82	0,382027		Genotip × tretman	1	0,02	0,882670
Lisna površina (D)	Genotip	1	91,05	0,000001	Lisna površina (R)	Genotip	1	140,67	0,000000
	Tretman	1	0,59	0,458391		Tretman	1	0,91	0,358278
	Genotip × tretman	1	5,08	0,043763		Genotip × tretman	1	0,29	0,600880

Tabela P3. Rezultati Tukey post hoc teska prikazuju efekte tretmana (suša – D) i genotipa (divlji tip i *flacca* mutant) na sadržaj jabučne i limunske kiseline kod biljaka paradajza.

Parametar	Izvor varijacije	df	F	<i>p</i>
Jabučna kiselina (D)	Genotip	1	46,817	0,000132
	Tretman	1	0,146	0,712305
	Genotip × tretman	1	120,290	0,000004
Limunska kiselina (D)	Genotip	1	20,6098	0,001900
	Tretman	1	28,2384	0,000716
	Genotip × tretman	1	0,0162	0,901958

Tabela P4. Sadržaj raastvornih ugljenih hidrata u listovima WT i *flacca* mutanta izloženih suši u trajanju od šest dana (D) koja je praćena periodom rehidracije u trajanju od šest dana (R). Odgovarajuće kontrole predstavljene su oznakama C_D i C_R. Predstavljene su srednje vrednosti ± SE (n≥4). Različita slova predstavljaju statistički značajne razlike između proseka prema Tukey HSD post hoc testu (*p* ≤ 0,05). Mala slova odnose se na razlike za tretman sušom, dok se velika slova odnose na razlike u periodu rehidracije.

	WT		<i>flacca</i>		WT		<i>flacca</i>	
	C _D	D	C _D	D	C _R	R	C _R	R
<i>Heksoze (μmol g⁻¹ FW)</i>								
Glukoza	12,38 ± 0,95 ^a	12,60 ± 0,38 ^a	13,16 ± 0,73 ^a	19,94 ± 2,19 ^b	12,61 ± 0,83 ^{AB}	11,04 ± 0,30 ^B	17,76 ± 1,65 ^C	15,79 ± 0,46 ^{BC}
Fruktoza	8,65 ± 0,50 ^a	7,78 ± 0,93 ^a	7,83 ± 0,35 ^a	9,01 ± 0,91 ^a	8,35 ± 0,52 ^A	8,47 ± 0,19 ^A	11,70 ± 0,91 ^{AB}	15,27 ± 1,46 ^B
Galaktoza	0,25 ± 0,02 ^a	0,48 ± 0,09 ^b	1,38 ± 0,06 ^c	1,24 ± 0,18 ^c	0,26 ± 0,03 ^A	0,53 ± 0,11 ^{AB}	0,96 ± 0,08 ^B	1,61 ± 0,17 ^C
<i>Pentoze (μmol g⁻¹ FW)</i>								
Arabinoza	0,15 ± 0,01 ^a	0,39 ± 0,06 ^b	0,79 ± 0,17 ^c	0,73 ± 0,07 ^c	0,08 ± 0,01 ^A	0,34 ± 0,08 ^B	0,78 ± 0,03 ^C	0,95 ± 0,09 ^C
Ramnoza	0,07 ± 0,01 ^b	0,08 ± 0,01 ^a	0,06 ± 0,01 ^b	0,08 ± 0,01 ^b	0,10 ± 0,01 ^B	0,07 ± 0,01 ^A	0,13 ± 0,01 ^C	0,13 ± 0,01 ^C
Ksiloza	0,49 ± 0,01 ^a	0,53 ± 0,04 ^a	0,69 ± 0,02 ^b	0,39 ± 0,07 ^a	0,50 ± 0,02 ^A	1,29 ± 0,08 ^C	0,69 ± 0,02 ^{AB}	0,81 ± 0,08 ^B
<i>Disaharidi (μmol g⁻¹ FW)</i>								
Saharoza	0,69 ± 0,10 ^{bc}	0,41 ± 0,04 ^a	0,63 ± 0,04 ^b	0,78 ± 0,03 ^c	0,39 ± 0,06 ^{AB}	0,73 ± 0,06 ^C	0,32 ± 0,01 ^A	0,50 ± 0,04 ^B
Trehaloza	0,08 ± 0,01 ^a	0,26 ± 0,04 ^b	0,02 ± 0,01 ^a	0,03 ± 0,01 ^a	0,13 ± 0,01 ^B	0,12 ± 0,02 ^B	0,03 ± 0,01 ^A	0,03 ± 0,01 ^A
Melibioza	0,24 ± 0,01 ^b	0,24 ± 0,02 ^b	0,11 ± 0,01 ^a	0,11 ± 0,01 ^a	0,23 ± 0,18 ^B	0,49 ± 0,01 ^C	0,14 ± 0,01 ^A	0,15 ± 0,01 ^A
Maltoza	0,19 ± 0,02 ^{bc}	0,23 ± 0,02 ^c	0,13 ± 0,01 ^a	0,14 ± 0,01 ^{ab}	0,20 ± 0,02 ^{BC}	0,26 ± 0,04 ^C	0,11 ± 0,01 ^A	0,14 ± 0,01 ^{AB}
<i>Oligosaharidi (nmol g⁻¹ FW)</i>								
Maltotrioza	16,24 ± 2,22 ^a	21,46 ± 0,66 ^{ab}	21,81 ± 1,14 ^{ab}	24,48 ± 0,18 ^b	21,57 ± 1,06 ^{AB}	19,23 ± 0,76 ^A	23,23 ± 0,48 ^B	24,72 ± 1,16 ^B
Rafinoza	43,28 ± 1,83 ^b	44,34 ± 1,91 ^b	31,03 ± 0,26 ^a	31,04 ± 0,39 ^a	47,38 ± 2,97 ^{BC}	54,91 ± 0,49 ^C	38,81 ± 0,54 ^A	39,69 ± 0,61 ^{AB}
Panoza	13,44 ± 0,15 ^a	17,45 ± 3,44 ^a	12,44 ± 0,49 ^a	15,87 ± 1,44 ^a	18,32 ± 1,82 ^A	22,15 ± 0,56 ^A	40,87 ± 0,39 ^B	39,71 ± 1,27 ^B
Stahioza	12,33 ± 1,26 ^{ab}	12,98 ± 1,41 ^b	9,75 ± 0,43 ^{ab}	9,15 ± 0,27 ^a	16,29 ± 1,78 ^{AB}	19,27 ± 0,43 ^B	14,27 ± 0,59 ^A	14,93 ± 0,56 ^{AB}
<i>Šććerni alkoholi (μmol g⁻¹ FW)</i>								
Sorbitol	1,03 ± 0,08 ^a	1,65 ± 0,13 ^b	4,16 ± 0,14 ^c	5,58 ± 0,71 ^c	1,69 ± 0,17 ^A	1,64 ± 0,20 ^A	5,87 ± 0,13 ^B	5,83 ± 0,58 ^B
Ukupni ugljeni hidrati (μmol g⁻¹ FW)	24,31 ± 0,75 ^a	24,74 ± 1,04 ^a	29,04 ± 1,14 ^a	38,11 ± 3,97 ^b	24,64 ± 0,89 ^A	25,10 ± 0,64 ^A	38,61 ± 0,85 ^B	41,33 ± 1,72 ^B

Tabela P5. Rezultati dvo-faktorske ANOVA-e prikazuju efekte tretmana (suša – D i rehidracija – R), genotipa (divlji tip i *flacca* mutant) i njihove interakcije na sadržaj rastvornih ugljenih hidrata. Skraćenice: Glukoza – Glc, Fruktioza – Fru, Galaktoza – Gal, Arabinoza – Ara, Ramnoza – Rham, Ksilioza – Xyl, Saharoza – Suc, Trehaloza – Tre, Melibioza – Mel, Maltoza – Mal, Maltotrioza – Malt, Rafinoza – Raf, Panoza – Pan, Stahioza – Stach, Sorbitol – Sor.

Parametar	Izvor varijacije	df	F	p	Parametar	Izvor varijacije	df	F	p
Glc (D)	Genotip	1	17,17	0,00086	Glc (R)	Genotip	1	26,42	0,00024
	Tretman	1	11,85	0,00363		Tretman	1	3,38	0,09079
	Genotip × tretman	1	10,54	0,00542		Genotip × tretman	1	0,04	0,84456
Fru (D)	Genotip	1	0,084	0,77760	Fru (R)	Genotip	1	31,46	0,00012
	Tretman	1	0,04	0,83165		Tretman	1	4,17	0,06363
	Genotip × tretman	1	2,047	0,17796		Genotip × tretman	1	3,64	0,08072
Glc/Fru ratio (D)	Genotip	1	17,02	0,00140	Glc/Fru ratio (R)	Genotip	1	2,83	0,11804
	Tretman	1	16,47	0,00158		Tretman	1	34,96	0,00007
	Genotip × Tretman	1	2,02	0,18092		Genotip × tretman	1	5,81	0,03284
Gal (D)	Genotip	1	289,32	0,00000	Gal (R)	Genotip	1	67,08	0,000003
	Tretman	1	0,57	0,46262		Tretman	1	17,41	0,001293
	Genotip × tretman	1	11,33	0,00392		Genotip × tretman	1	3,03	0,107071
Ara (D)	Genotip	1	121,70	0,00000	Ara (R)	Genotip	1	185,79	0,000000
	Tretman	1	4,50	0,05216		Tretman	1	20,09	0,000377
	Genotip × Tretman	1	11,37	0,00455		Genotip × tretman	1	0,86	0,368015
Rham (D)	Genotip	1	3,00	0,10247	Rham (R)	Genotip	1	122,33	0,000000
	Tretman	1	11,73	0,00347		Tretman	1	21,27	0,000599
	Genotip × tretman	1	7,55	0,01431		Genotip × tretman	1	17,73	0,001210

Tabela P5. (nastavak tabele sa prethodne strane)

Parametar	Izvor varijacije	df	F	<i>p</i>	Parametar	Izvor varijacije	d f	F	<i>p</i>
Xyl (D)	Genotip	1	0,78	0,39002	Xyl (R)	Genotip	1	5,34	0,039488
	Tretman	1	12,96	0,00240		Tretman	1	51,48	0,000011
	Genotip × Tretman	1	21,04	0,00030		Genotip × Tretman	1	27,76	0,000198
Suc (D)	Genotip	1	15,51	0,001176	Suc (R)	Genotip	1	9,23	0,010306
	Tretman	1	3,08	0,098583		Tretman	1	32,40	0,000100
	Genotip × Tretman	1	35,30	0,000021		Genotip × Tretman	1	2,21	0,162891
Tre (D)	Genotip	1	82,24	0,000001	Tre (R)	Genotip	1	255,73	0,000000
	Tretman	1	48,17	0,000016		Tretman	1	91,38	0,000001
	Genotip × Tretman	1	20,88	0,000644		Genotip × Tretman	1	0,34	0,567987
Mel (D)	Genotip	1	134,06	0,000000	Mel (R)	Genotip	1	1016,02	0,000001
	Tretman	1	0,02	0,893098		Tretman	1	406,47	0,000000
	Genotip × Tretman	1	0,15	0,701016		Genotip × Tretman	1	353,17	0,000000
Mal (D)	Genotip	1	27,49	0,000207	Mal (R)	Genotip	1	30,48	0,000132
	Tretman	1	1,94	0,189404		Tretman	1	4,22	0,062439
	Genotip × Tretman	1	0,33	0,575424		Genotip × Tretman	1	0,78	0,395179
Malt (D)	Genotip	1	7,49	0,018020	Malt (R)	Genotip	1	15,68	0,001893
	Tretman	1	6,34	0,027041		Tretman	1	0,22	0,645353
	Genotip × Tretman	1	0,66	0,431128		Genotip × Tretman	1	4,52	0,055005

Tabela P5. (nastavak tabele sa prethodne strane)

Parametar	Izvor varijacije	df	F	<i>p</i>	Parametar	Izvor varijacije	d f	F	<i>p</i>
Raf (D)	Genotip	1	46,39	0,000019	Raf (R)	Genotip	1	37,93	0,000049
	Tretman	1	4,93	0,046462		Tretman	1	3,86	0,073062
	Genotip × Tretman	1	2,87	0,116214		Genotip × Tretman	1	2,16	0,167528
Pan (D)	Genotip	1	0,66	0,431195	Pan (R)	Genotip	1	297,36	0,000000
	Tretman	1	2,79	0,120665		Tretman	1	1,32	0,273232
	Genotip × Tretman	1	0,11	0,747021		Genotip × Tretman	1	4,62	0,052707
Stach (D)	Genotip	1	15,51	0,001969	Stach (R)	Genotip	1	7,59	0,017412
	Tretman	1	0,03	0,866993		Tretman	1	2,37	0,149259
	Genotip × Tretman	1	0,15	0,702514		Genotip × Tretman	1	0,89	0,364404
Sor (D)	Genotip	1	192,00	0,000000	Sor (R)	Genotip	1	166,03	0,000000
	Tretman	1	15,54	0,001954		Tretman	1	0,08	0,782405
	Genotip × Tretman	1	1,22	0,291613		Genotip × Tretman	1	0,01	0,935445
Ukupni ugljeni hidrati (D)	Genotip	1	26,43	0,000245	Ukupni ugljeni hidrati (R)	Genotip	1	186,31	0,000000
	Tretman	1	7,05	0,021006		Tretman	1	2,04	0,179204
	Genotip × Tretman	1	5,88	0,032089		Genotip × Tretman	1	1,07	0,320500

Tabela P6. Sadržaj slobodnih aminokiselina u listovima WT i *flacca* mutanta izloženih suši u trajanju od šest dana (D) koja je praćena periodom rehidracije u trajanju od šest dana (R). Odgovarajuće kontrole predstavljene su oznakama C_D i C_R. Predstavljene su srednje vrednosti ± SE (n≥4). Različita slova predstavljaju statistički značajne razlike između proseka prema Tukey HSD post hoc testu ($p \leq 0,05$). Mala slova odnose se na razlike za tretman sušom, dok se velika slova odnose na razlike u periodu rehidracije.

	WT		<i>flacca</i>		WT		<i>flacca</i>	
	C _D	D	C _D	D	C _R	R	C _R	R
Asparaginska kiselina	1,48 ± 0,01 ^a	2,23 ± 0,09 ^c	2,75 ± 0,18 ^b	1,55 ± 0,06 ^a	1,32 ± 0,10 ^A	1,41 ± 0,20 ^C	3,58 ± 0,02 ^A	2,04 ± 0,07 ^B
Glutaminska kiselina	1,44 ± 0,01 ^a	2,57 ± 0,15 ^b	2,61 ± 0,22 ^b	3,60 ± 0,34 ^c	1,37 ± 0,08 ^A	1,64 ± 0,12 ^C	4,43 ± 0,50 ^{AB}	2,20 ± 0,04 ^B
Glutamin	0,56 ± 0,01 ^a	0,86 ± 0,06 ^b	1,33 ± 0,09 ^a	2,37 ± 0,20 ^c	0,73 ± 0,01 ^A	0,83 ± 0,12 ^B	2,15 ± 0,24 ^A	1,01 ± 0,02 ^A
Serin	0,32 ± 0,01 ^a	0,56 ± 0,05 ^b	0,56 ± 0,05 ^b	0,77 ± 0,09 ^c	0,34 ± 0,03 ^A	0,27 ± 0,02 ^C	0,71 ± 0,05 ^A	0,53 ± 0,04 ^B
Alanin	0,32 ± 0,03 ^a	0,43 ± 0,01 ^{ab}	0,55 ± 0,08 ^{bc}	0,67 ± 0,11 ^c	0,62 ± 0,04 ^B	0,34 ± 0,01 ^A	0,68 ± 0,05 ^B	0,39 ± 0,01 ^A
Prolin	0,27 ± 0,03 ^a	3,70 ± 0,81 ^a	0,35 ± 0,02 ^c	3,12 ± 0,24 ^b	0,22 ± 0,03 ^A	0,26 ± 0,04 ^A	0,32 ± 0,04 ^A	1,03 ± 0,15 ^B
Treonin	0,26 ± 0,03 ^a	0,36 ± 0,03 ^{ab}	0,32 ± 0,04 ^a	0,48 ± 0,07 ^b	0,25 ± 0,01 ^A	0,26 ± 0,04 ^A	0,51 ± 0,05 ^B	0,27 ± 0,01 ^A
Arginin	0,21 ± 0,02 ^a	0,20 ± 0,01 ^a	0,32 ± 0,03 ^{ab}	0,28 ± 0,05 ^b	0,31 ± 0,02 ^B	0,15 ± 0,01 ^A	0,25 ± 0,04 ^B	0,30 ± 0,03 ^B
Glicin	0,16 ± 0,02 ^b	0,13 ± 0,02 ^b	0,18 ± 0,02 ^{ab}	0,10 ± 0,01 ^a	0,27 ± 0,01 ^C	0,18 ± 0,01 ^B	0,23 ± 0,01 ^A	0,18 ± 0,01 ^A
Lizin	0,13 ± 0,02 ^a	0,20 ± 0,02 ^a	0,31 ± 0,03 ^b	0,39 ± 0,02 ^c	0,22 ± 0,09 ^A	0,19 ± 0,06 ^A	0,42 ± 0,14 ^B	2,88 ± 0,87 ^C
Leucin	0,12 ± 0,01 ^{ab}	0,15 ± 0,06 ^{bc}	0,19 ± 0,03 ^c	0,10 ± 0,01 ^a	0,22 ± 0,04 ^A	0,16 ± 0,06 ^A	0,25 ± 0,01 ^A	0,26 ± 0,07 ^A
Tirozin	0,12 ± 0,01 ^a	0,21 ± 0,06 ^b	0,29 ± 0,01 ^b	0,56 ± 0,02 ^c	0,23 ± 0,02 ^A	0,24 ± 0,02 ^A	0,55 ± 0,17 ^B	0,16 ± 0,01 ^A
Fenilalanin	0,09 ± 0,01 ^a	0,12 ± 0,01 ^a	0,22 ± 0,01 ^c	0,15 ± 0,01 ^b	0,12 ± 0,01 ^A	0,10 ± 0,01 ^A	0,15 ± 0,02 ^B	0,17 ± 0,01 ^B
Asparagin	0,07 ± 0,01 ^a	0,12 ± 0,01 ^b	0,16 ± 0,01 ^b	0,33 ± 0,03 ^c	0,10 ± 0,01 ^A	0,12 ± 0,01 ^B	0,37 ± 0,04 ^A	0,14 ± 0,01 ^A
Valin	0,05 ± 0,01 ^a	0,09 ± 0,01 ^b	0,10 ± 0,01 ^b	0,17 ± 0,02 ^c	0,09 ± 0,01 ^A	0,06 ± 0,01 ^A	0,14 ± 0,02 ^A	0,08 ± 0,01 ^B
Izoleucin	0,05 ± 0,01 ^b	0,02 ± 0,01 ^a	0,05 ± 0,01 ^b	0,10 ± 0,01 ^c	0,10 ± 0,01 ^A	0,08 ± 0,02 ^A	0,06 ± 0,01 ^A	0,08 ± 0,01 ^A
Ornitin	0,02 ± 0,01 ^a	0,03 ± 0,01 ^b	0,03 ± 0,01 ^b	0,04 ± 0,01 ^c	0,02 ± 0,01 ^A	0,02 ± 0,01 ^A	0,03 ± 0,01 ^A	0,03 ± 0,01 ^A
Ukupne aminokiseline	5,64 ± 0,11 ^a	11,98 ± 0,68 ^b	10,32 ± 0,71 ^b	14,76 ± 0,65 ^c	6,45 ± 0,17 ^A	6,31 ± 0,38 ^A	14,83 ± 1,21 ^C	11,75 ± 0,75 ^B

Tabela P7. Rezultati dvo-faktorske ANOVA-e prikazuju efekte tretmana (suša – D i rehidracija – R), genotipa (divlji tip i *flacca* mutant) i njihove interakcije na sadržaj slobodnih aminokiselina. Skraćenice: Asparaginska kiselina – Asp, Glutaminska kiselina – Glu, Glutamin – Gln, Serin – Ser, Alanin – Ala, Prolin – Pro, Treonin – Thr, Arginin – Arg, Glicin – Gly, Lizin – Lys, Leucin – Leu, Tirozin – Tyr, Fenilalanin – Phe, Asparagin – Asn, Valin – Val, Izoleucin – Ile, Ornitin – Orn.

Parametar	Izvor varijacije	df	F	p	Parametar	Izvor varijacije	df	F	p
Asp (D)	Genotip	1	10,63	0,006818	Asp (R)	Genotip	1	304,51	0,000000
	Tretman	1	6,15	0,029009		Tretman	1	76,49	0,000001
	Genotip × Tretman	1	115,92	0,000000		Genotip × Tretman	1	96,18	0,000000
Glu (D)	Genotip	1	50,71	0,000012	Glu (R)	Genotip	1	97,78	0,000000
	Tretman	1	46,58	0,000018		Tretman	1	28,75	0,000170
	Genotip × Tretman	1	0,22	0,646210		Genotip × Tretman	1	46,85	0,000018
Gln (D)	Genotip	1	198,30	0,000000	Gln (R)	Genotip	1	69,92	0,000002
	Tretman	1	67,37	0,000003		Tretman	1	29,52	0,000152
	Genotip × Tretman	1	20,48	0,000695		Genotip × Tretman	1	42,42	0,000029
Ser(D)	Genotip	1	29,07	0,000162	Ser (R)	Genotip	1	151,51	0,000000
	Tretman	1	30,05	0,000140		Tretman	1	25,64	0,000278
	Genotip × Tretman	1	0,16	0,694734		Genotip × Tretman	1	4,55	0,054161
Ala (D)	Genotip	1	22,38	0,000488	Ala (R)	Genotip	1	5,57	0,036084
	Tretman	1	5,48	0,037267		Tretman	1	141,91	0,000000
	Genotip × Tretman	1	0,00	0,964919		Genotip × Tretman	1	0,00	0,970112
Pro (D)	Genotip	1	7,39	0,018665	Pro (R)	Genotip	1	61,14	0,000005
	Tretman	1	1803,36	0,000000		Tretman	1	44,81	0,000022
	Genotip × Tretman	1	14,67	0,002392		Genotip × Tretman	1	36,85	0,000056

Tabela P7. (nastavak tabele sa prethodne strane)

Parametar	Izvor varijacije	df	F	<i>p</i>					
Thr (D)	Genotip	1	6,18	0,028614	Tre (R)	Genotip	1	43,77	0,000025
	Tretman	1	14,79	0,002329		Tretman	1	29,42	0,000154
	Genotip × Tretman	1	0,73	0,409787		Genotip × Tretman	1	33,44	0,000087
Arg (D)	Genotip	1	16,95	0,001427	Arg (R)	Genotip	1	5,47	0,037413
	Tretman	1	1,62	0,227618		Tretman	1	6,44	0,026071
	Genotip × Tretman	1	0,36	0,560661		Genotip × Tretman	1	24,15	0,000357
Gly (D)	Genotip	1	0,04	0,842515	Gly (R)	Genotip	1	11,53	0,005316
	Tretman	1	18,49	0,001032		Tretman	1	175,49	0,000000
	Genotip × Tretman	1	4,63	0,052375		Genotip × Tretman	1	16,39	0,001613
Lys (D)	Genotip	1	105,22	0,000000	Lys (R)	Genotip	1	11,37	0,005547
	Tretman	1	18,19	0,001098		Tretman	1	1,9724	0,185546
	Genotip × Tretman	1	0,13	0,727969		Genotip × Tretman	1	2,1866	0,164981
Leu (D)	Genotip	1	0,75	0,403964	Leu (R)	Genotip	1	0,75	0,403964
	Tretman	1	4,75	0,049925		Tretman	1	4,75	0,049925
	Genotip × Tretman	1	34,90	0,000072		Genotip × Tretman	1	34,90	0,000072
Tyr (D)	Genotip	1	155,71	0,000000	Tyr (R)	Genotip	1	3,57	0,083094
	Tretman	1	73,46	0,000002		Tretman	1	9,49	0,009518
	Genotip × Tretman	1	17,89	0,001168		Genotip × Tretman	1	10,83	0,006445
Phe (D)	Genotip	1	109,74	0,000000	Phe (R)	Genotip	1	48,31	0,000015
	Tretman	1	6,81	0,022854		Tretman	1	0,38	0,550781
	Genotip × Tretman	1	38,40	0,000046		Genotip × Tretman	1	7,20	0,019917

Tabela P7. (nastavak tabele sa prethodne strane)

Parametar	Izvor varijacije	df	F	<i>p</i>	Parametar	Izvor varijacije	df	F	<i>p</i>
Asn (D)	Genotip	1	154,02	0,000000	Asn (R)	Genotip	1	85,79	0,000001
	Tretman	1	93,75	0,000001		Tretman	1	41,27	0,000033
	Genotip × Tretman	1	25,79	0,000271		Genotip × Tretman	1	62,77	0,000004
Val (D)	Genotip	1	53,35	0,000009	Val (R)	Genotip	1	22,46	0,000481
	Tretman	1	40,17	0,000037		Tretman	1	27,58	0,000204
	Genotip × Tretman	1	2,44	0,144336		Genotip × Tretman	1	5,78	0,033235
Ile (D)	Genotip	1	372,71	0,000000	Ole (R)	Genotip	1	3,27	0,095841
	Tretman	1	31,64	0,000112		Tretman	1	0,01	0,908896
	Genotip × Tretman	1	245,33	0,000000		Genotip × Tretman	1	4,27	0,061041
Orn (D)	Genotip	1	34,28	0,000078	Orn (R)	Genotip	1	8,95	0,011233
	Tretman	1	22,21	0,000503		Tretman	1	0,27	0,615684
	Genotip × Tretman	1	0,25	0,626623		Genotip × Tretman	1	0,53	0,481160
Gly/Ser odnos (D)	Genotip	1	14,525	0,005154	Gly/Ser odnos (R)	Genotip	1	172,77	0,000001
	Tretman	1	44,578	0,000156		Tretman	1	4,12	0,076853
	Genotip × Tretman	1	0,902	0,370111		Genotip × Tretman	1	8,05	0,021928
Ukupne aminokiseline (D)	Genotip	1	39,68	0,000233	Ukupne aminokiseline (R)	Genotip	1	55,94	0,000710
	Tretman	1	83,05	0,000017		Tretman	1	5,87	0,041625
	Genotip × Tretman	1	2,58	0,146667		Genotip × Tretman	1	4,83	0,059093

Tabela P8. Rezultati tro-faktorske ANOVA-e prikazuju efekte tretmana, broja ciklusa suše, dva genotipa (WT i *flacca*) i njihovih interakcija na sadržaj ABA, provodljivost stoma (g_s), ukupnog vodnog potencijala (Ψ), pH vrednosti ksilemskog soka, sadržaj prolina i zbirnog sadržaja Glc, Fru Suc i Sor u listovima paradajza.

Parametar	Izvor varijacije	df	F	p
ABA	Genotip	1	140,79	0,000000
	Ciklus	2	0,21	0,807973
	Tretman	2	73,31	0,000000
	Genotip × ciklus	2	5,07	0,008248
	Genotip × tretman	2	23,51	0,000000
	Ciklus × tretman	4	0,63	0,641365
	Genotip × ciklus × tretman	4	2,10	0,087148
g_s	Genotip	1	587,30	0,000000
	Ciklus	2	60,83	0,000000
	Tretman	2	113,57	0,000000
	Genotip × ciklus	2	15,76	0,000001
	Genotip × tretman	2	50,90	0,000000
	Ciklus × tretman	4	88,88	0,000000
	Genotip × ciklus × tretman	4	51,39	0,000000
Ψ	Genotip	1	11,28	0,001255
	Ciklus	2	90,07	0,000000
	Tretman	2	154,89	0,000000
	Genotip × ciklus	2	24,75	0,000000
	Genotip × tretman	2	1,78	0,176347
	Ciklus × tretman	4	6,08	0,000284
	Genotip × ciklus × tretman	4	11,25	0,000000
pH ksilemskog soka	Genotip	1	134005,5	0,000000
	Ciklus	1	34,3	0,000000
	Tretman	2	4,9	0,010741
	Genotip × ciklus	2	211,4	0,000000
	Genotip × tretman	2	1,0	0,370449
	Ciklus × tretman	2	8,4	0,000652
	Genotip × ciklus × tretman	4	7,7	0,000053
Pro	Genotip	1	84,97	0,000000
	Ciklus	2	213,19	0,000000
	Tretman	2	320,53	0,000000
	Genotip × ciklus	2	112,09	0,000000
	Genotip × tretman	2	114,08	0,000000
	Ciklus × tretman	4	222,32	0,000000
	Genotip × ciklus × tretman	4	99,92	0,000000
Glc + Fru + Suc	Genotip	1	96,357	0,000000
	Ciklus	2	2,406	0,099764
	Tretman	2	6,616	0,002692
	Genotip × ciklus	2	8,174	0,000792
	Genotip × tretman	2	3,156	0,050541
	Ciklus × tretman	4	3,438	0,014162
	Genotip × ciklus × tretman	4	4,592	0,002897

Tabela P8 (nastavak sa prethodne strane)

Parametar	Izvor varijacije	df	F	p
Sor	Genotip	1	417,059	0,000000
	Ciklus	2	8,661	0,000547
	Tretman	2	1,531	0,225530
	Genotip × ciklus	2	4,942	0,010691
	Genotip × tretman	2	0,124	0,883604
	Ciklus × tretman	4	1,303	0,280571
	Genotip × ciklus × tretman	4	0,675	0,611965

Tabela P9. Rezultati tro-faktorske ANOVA-e prikazuju efekte tretmana, broja ciklusa suše, dva genotipa (WT i *flacca*) i njihovih interakcija na sadržaj ukupnog askorbata i njegovo redoks stanje u listovima paradajza gajenim pri intenzitetu svetlosti ($250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

Parametar	Izvor varijacije	df	F	p
Ukupni askorbat	Genotip	1	12,617	0,000802
	Ciklus	2	146,725	0,000000
	Tretman	2	74,365	0,000000
	Genotip × ciklus	2	25,073	0,000000
	Genotip × tretman	2	25,570	0,000000
	Ciklus × tretman	4	37,122	0,000000
	Genotip × ciklus × tretman	4	36,430	0,000000
Redoks stanje askorbata	Genotip	1	12,617	0,000802
	Ciklus	2	15,451	0,000005
	Tretman	2	1,057	0,354682
	Genotip × ciklus	2	7,693	0,001149
	Genotip × tretman	2	3,345	0,042687
	Ciklus × tretman	4	12,960	0,000000
	Genotip × ciklus × tretman	4	3,963	0,006831

Tabela P10. Rezultati tro-faktorske ANOVA-e prikazuju efekte tretmana, broja ciklusa suše, dva genotipa (WT i *flacca*) i njihovih interakcija na sadržaj ukupnog askorbata i njegovo redoks stanje u listovima paradajza gajenim pri intenzitetu svetlosti ($800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

Parametar	Izvor varijacije	df	F	p
Ukupni askorbat	Genotip	1	44,27	0,000000
	Ciklus	2	76,90	0,000000
	Tretman	2	27,14	0,000000
	Genotip × ciklus	2	23,90	0,000000
	Genotip × tretman	2	22,16	0,000000
	Ciklus × tretman	4	8,29	0,000010
	Genotip × ciklus × tretman	4	1,32	0,267438
Redoks stanje askorbata	Genotip	1	0,01	0,911552
	Ciklus	2	13,09	0,000010
	Tretman	2	17,11	0,000001
	Genotip × ciklus	2	30,29	0,000000
	Genotip × tretman	2	16,69	0,000001
	Ciklus × tretman	4	9,79	0,000001
	Genotip × ciklus × tretman	4	3,39	0,012384

Tabela P11. Rezultati tro-faktorske ANOVA-e prikazuju efekte tretmana, broja ciklusa suše, dva genotipa (WT i *flacca*) i njihovih interakcija na sadržaj hlorofila u listovima paradajza.

Parametar	Izvor varijacije	df	F	p
Hlorofil (250 μmol $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	Genotip	1	4,125	0,045200
	Ciklus	2	33,803	0,000000
	Tretman	2	8,259	0,000509
	Genotip \times ciklus	2	6,558	0,002193
	Genotip \times tretman	2	3,366	0,038923
	Ciklus \times tretman	4	1,264	0,289982
	Genotip \times ciklus \times tretman	4	1,007	0,408427
Hlorofil (800 μmol $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	Genotip	1	2,440	0,121749
	Ciklus	2	25,912	0,000000
	Tretman	2	22,156	0,000000
	Genotip \times ciklus	2	0,890	0,414042
	Genotip \times tretman	2	2,345	0,101685
	Ciklus \times tretman	4	3,220	0,016129
	Genotip \times ciklus \times tretman	4	3,727	0,007471

Tabela P12. Rezultati tro-faktorske ANOVA-e prikazuju efekte tretmana, broja ciklusa suše, dva genotipa (WT i *flacca*) i njihovih interakcija na sadržaj epidermalnih flavonoida u listovima paradajza.

Parametar	Izvor varijacije	df	F	p
Epidermalni flavonoidi (250 μmol $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	Genotip	1	0,0053	0,942297
	Ciklus	2	0,4875	0,615798
	Tretman	2	3,9461	0,022763
	Genotip \times ciklus	2	1,4666	0,236166
	Genotip \times tretman	2	0,3869	0,680313
	Ciklus \times tretman	4	5,1370	0,000897
	Genotip \times ciklus \times tretman	4	1,8782	0,121099
Epidermalni flavonoidi (800 μmol $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	Genotip	1	12,617	0,000802
	Ciklus	2	15,451	0,000005
	Tretman	2	1,057	0,354682
	Genotip \times ciklus	2	7,693	0,001149
	Genotip \times tretman	2	3,345	0,042687
	Ciklus \times tretman	4	12,960	0,000000
	Genotip \times ciklus \times tretman	4	3,963	0,006831

Tabela P13. Rezultati tro-faktorske ANOVA-e prikazuju efekte tretmana, broja ciklusa suše, dva genotipa (WT i *flacca*) i njihovih interakcija na sadržaj antocijana u listovima paradajza.

Parametar	Izvor varijacije	df	F	p
Antocijani (250 μmol $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	Genotip	1	0,767	0,383518
	Ciklus	2	8,658	0,000364
	Tretman	2	1,894	0,156392
	Genotip \times ciklus	2	1,020	0,364747
	Genotip \times tretman	2	1,894	0,156392
	Ciklus \times tretman	4	4,724	0,001661
	Genotip \times ciklus \times tretman	4	0,353	0,841488
Antocijani (800 μmol $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	Genotip	1	0,243	0,623528
	Ciklus	2	83,314	0,000000
	Tretman	2	19,163	0,000000
	Genotip \times ciklus	2	0,308	0,735688
	Genotip \times tretman	2	1,206	0,304064
	Ciklus \times tretman	4	25,958	0,000000
	Genotip \times ciklus \times tretman	4	0,820	0,515908

Tabela P14. Rezultati tro-faktorske ANOVA-e prikazuju efekte tretmana, broja ciklusa suše, dva genotipa (WT i *flacca*) i njihovih interakcija na vrednosti NBI u listovima paradajza.

Parametar	Izvor varijacije	df	F	p
NBI (250 μmol $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	Genotip	1	17,035	0,000082
	Ciklus	2	13,454	0,000008
	Tretman	2	5,598	0,005110
	Genotip \times ciklus	2	5,167	0,007512
	Genotip \times tretman	2	2,097	0,128799
	Ciklus \times tretman	4	14,020	0,000000
	Genotip \times ciklus \times tretman	4	17,035	0,000082
NBI (800 μmol $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	Genotip	1	8,256	0,005065
	Ciklus	2	5,908	0,003882
	Tretman	2	10,462	0,000082
	Genotip \times ciklus	2	4,219	0,017720
	Genotip \times tretman	2	6,546	0,002218
	Ciklus \times tretman	4	9,332	0,000002
	Genotip \times ciklus \times tretman	4	9,249	0,000003

Biografija

Bojana Živanović rođena je 1987. u Svilajncu, gde je završila osnovnu školu i gimnaziju opšteg smera. Hemijski fakultet Univerziteta u Beogradu, smer Biohemija, završila je 2012, odbranivši završni rad pod nazivom „Ispitivanje huminskih kiselina tokom *ex situ* bioremedijacije na poluindustrijskom nivou“. Na istoj katedri 2013. završila je master studije, odbranivši master rad „Antioksidativni metabolizam i oksidativni stres kod korena graška – uticaj podloge i hitosana“. Doktorske akademske studije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, na modulu Fiziologija i molekularna biologija biljaka, upisala je 2013. godine. Od jula 2014. zaposlena je u Institutu za multidisciplinarna istraživanja Univerziteta u Beogradu, na projektu Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije III43010 pod nazivom „Modifikacije antioksidativnog metabolizma biljaka sa ciljem povećanja tolerancije na abiotski stres i identifikacija novih biomarkera sa primenom u remedijaciji i monitoringu degradiranih staništa“. U periodu 2018–2022. bila je angažovana na četiri međunarodna projekta. Tokom oktobra 2018, u okviru međunarodne naučne saradnje između Republike Srbije i Republike Francuske, boravila je u Institutu za istraživanje hortikulturnih biljaka i semena (IRHS) u Anžeu.

Član je Društva za fiziologiju biljaka Srbije (DFBS) i učesnik COST akcije pod nazivom „Oxygen sensing a novel mean for biology and technology of fruit quality“.

U okviru doktorske disertacije objavila je dva naučna rada. Autor je i koautor pet radova u međunarodnim naučnim časopisima, jednog rada u časopisu od nacionalnog značaja i šest saopštenja na međunarodnim skupovima štampanih u izvodu.

Изјава о ауторству

Потписана: **Бојана Р. Живановић**

Број индекса: **Б3018/2013**

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом:

„Утицај циклуса суше на метаболизам угљених хидрата и антиоксиданата код дивљега типа и *flacca* мутанта парадајза (*Lycopersicon esculentum* Mill.) гајених на различитим светлосним режимима”

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, _____

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора: **Бојана Р. Живановић**

Број индекса: **Б3018/2013**

Студијски програм: **Биологија (Молекуларна биологија и физиологија биљака)**

Наслов рада: „Утицај циклуса суше на метаболизам угљених хидрата и антиоксиданата код дивљег типа и *flacca* мутанта парадајза (*Lycopersicon esculentum* Mill.) гајених на различитим светлосним режимима”

Ментори: **др Соња Вељовић Јовановић, научни саветник**

др Љиљана Прокић, ванредни професор

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, _____

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

„Утицај циклуса суше на метаболизам угљених хидрата и антиоксиданата код дивљег типа и *flacca* мутанта парадајза (*Lycopersicum esculentum* Mill.) гајених на различитим светлосним режимима”

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

① Ауторство (CC BY)

2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)

3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)

5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)

6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци. Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис докторанда

У Београду, _____

1. Ауторство. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. Ауторство – некомерцијално – без прерада. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. Ауторство – без прерада. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. Ауторство – делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.