Fiziološki odgovor kultivara soje na abiotski stres

Špoljarević, Marija

Doctoral thesis / Disertacija

2016

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:
Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Agrobiotechical Sciences Osijek / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:151:908111

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

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

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek

Repository / Repozitorij:

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

Image not found or type unknown

REPUBLIKA HRVATSKA
SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA
U OSIJEKU

POLJOPRIVREDNI FAKULTET U OSIJEKU

Marija Špoljarević, prof. biologije i kemije

FIZIOLOŠKI ODGOVOR KULTIVARA SOJE NA ABIOTSKI STRES

DOKTORSKA DISERTACIJA

Osijek, 2016.

REPUBLIKA HRVATSKA
SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA
U OSIJEKU

POLJOPRIVREDNI FAKULTET U OSIJEKU

Marija Špoljarević, prof. biologije i kemije

FIZIOLOŠKI ODGOVOR KULTIVARA SOJE NA ABIOTSKI STRES

- Doktorska disertacija -

Osijek, 2016.

REPUBLIKA HRVATSKA
SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA
U OSIJEKU

POLJOPRIVREDNI FAKULTET U OSIJEKU

Marija Špoljarević, prof. biologije i kemije

FIZIOLOŠKI ODGOVOR KULTIVARA SOJE NA ABIOTSKI STRES

- Doktorska disertacija -

Mentor: prof.dr.sc. Tihana Teklić

Povjerenstvo za ocjenu:

1. dr.sc. Miroslav Lisjak, docent Poljoprivrednog fakulteta u Osijeku, predsjednik

2. dr.sc. Tihana Teklić, redoviti profesor Poljoprivrednog fakulteta u Osijeku, mentor i član

3. dr.sc. Luka Andrić, znanstveni savjetnik Poljoprivrednog instituta Osijek, komentor i član

Osijek, 2016.

REPUBLIKA HRVATSKA
SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA
U OSIJEKU

POLJOPRIVREDNI FAKULTET U OSIJEKU

Marija Špoljarević, prof. biologije i kemije

FIZIOLOŠKI ODGOVOR KULTIVARA SOJE NA ABIOTSKI STRES

- Doktorska disertacija -

Mentor: prof.dr.sc. Tihana Teklić

Javna obrana doktorske disertacije održana je 15. ožujka 2016. godine pred Povjerenstvom za obranu:

1. dr.sc. Miroslav Lisjak, docent Poljoprivrednog fakulteta u Osijeku, predsjednik

2. dr.sc. Tihana Teklić, redoviti profesor Poljoprivrednog fakulteta u Osijeku, mentor i član

3. dr.sc. Luka Andrić, znanstveni savjetnik Poljoprivrednog instituta Osijek, komentor i član

Osijek, 2016.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Doktorska disertacija

Poljoprivredni fakultet u Osijeku
Poslijediplomski sveučilišni (doktorski) studij: Poljoprivredne znanosti
Smjer: Oplemenjivanje bilja i sjemenarstvo

UDK: 633.34:632.1 (043)
Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Poljoprivreda
Grana: Bilinogojstvo

Fiziološki odgovor kultivara soje na abiotski stres

Marija Špoljarević, prof. biologije i kemije

Disertacija je izrađena na Poljoprivrednom fakultetu u Osijeku Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Mentor: prof.dr.sc. Tihana Teklić

Otpornost na stres je značajan preduvjet za uspješnu proizvodnju soje u sve zahtjevnijim agroekološkim uvjetima, a među različitim vrstama abiotskog stresa ističu se sušni, temperaturni i solni stres. Cilj ove disertacije je bio istražiti neke od fizioloških mehanizama reakcije soje na navedene vrste stresa. Istraživanja su provedena sa šest kultivara soje u fazi klijanje-nicanje te dva kultivara u fazi cvatnje. U prvom pokusu je sjeme soje naklijavano u papirnim ručnicima natopljenim vodom ili otopinom koja je imala određeni osmotski potencijal. Primijenjene su po dvije razine sušnog (otopina PEG 5% i 10%), solnog (otopina NaCl 50 i 100 mM) i temperaturnog stresa (10°C i 30°C, voda) te kontrola (20°C, voda) tijekom 7 dana. Osim % klijavosti, mase klijanca i hipokotila, analiziran je sadržaj vodikovog peroksida, prolina, fenola, intenzitet lipidne peroksidacije te ukupna i specifična aktivnost enzima askorbat-peroksidaze, katalaze, gvajakol-peroksidaze i glutation-reduktaze u hipokotilu. Najjači stresni učinak imali su viša razina sušnog stresa (PEG 10%) te niska temperatura (10°C). Visoka temperatura je djelovala povoljno na razvoj klijanaca, a blagi sušni stres (PEG 5%) je imao *„priming"* efekt i povećao klijavost. Odabrana dva kultivara su u drugom eksperimentu uzgojena u posudama s tlom na otvorenom do faze cvatnje (R_2), nakon čega su izložene različitoj temperaturi (30°C, 10°C i 20°C kao kontrola) tijekom tri dana u klima komori. U najrazvijenijoj troliski su analizirani sadržaji fotosintetskih pigmenata i pokazatelji učinkovitosti fotosinteze, te svi prethodno navedeni pokazatelji reakcije biljke na stres. Vrlo značajan utjecaj tretmana u obje razvojne faze soje, potvrđuje da su primijenjeni tretmani izazvali oksidacijski stres i obrambene reakcije soje na molekularnoj razini. U cjelini, ukupne aktivnosti ispitivanih enzima su bile veće u klijanju na 10°C, a u cvatnji na 30°C, što sugerira različitost stresnog efekta ambijentalne temperature ovisno o fazi razvoja soje.

Broj stranica: 195
Broj slika: 53
Broj tablica: 34
Broj literaturnih navoda: 259
Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: soja, sortna specifičnost, abiotski stres, osmotski stres, sušni stres, solni stres, temperaturni stres.

Datum obrane: 15. ožujka 2016.

Povjerenstvo za obranu:
1. doc.dr.sc. Miroslav Lisjak – predsjednik
2. prof.dr.sc. Tihana Teklić – mentor i član
3. dr.sc. Luka Andrić, znanstveni savjetnik – komentor i član

Disertacija je pohranjena u:
Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici u Zagrebu, Knjižnici Poljoprivrednog fakulteta u Osijeku, Gradskoj i Sveučilišnoj knjižnici u Osijeku, Arhivi Poljoprivrednog fakulteta u Osijeku

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Josip Juraj Strossmayer in Osijek

PhD thesis

Faculty of Agriculture in Osijek
Postgraduate university study: Agricultural sciences
Course: Plant breeding and seed science

UDK: 633.34:632.1 (043)
Scientific Area: Biotechnical Sciences
Scientific Field: Agriculture
Branch: Plant production

The physiological response of soybean cultivars to abiotic stress

Marija Špoljaravić, MsC.

Thesis performed at Faculty of Agriculture in Osijek, University of Josip Juraj Strossmayer in Osijek

Supervisor: prof.dr.sc. Tihana Teklić

Stress resistance is an important pre-condition of successful soybean production in demanding agroecological conditions. Among different types of abiotic stress, drought, temperature and salt stress are the most prominent. This PhD dissertation aimed to investigate some of the physiological mechanisms of soybean response to the above mentioned stresses. The research was performed with 6 cultivars in the germination - emergence stage and two cultivars in the flowering stage. In the first experiment, soybean seed was germinated in paper towels soaked with water or the solution with given osmotic pressure. Two levels of drought (5% and 10% PEG solutions), salt (50 and 100 mM NaCl solutions) and temperature stress (10°C and 30°C), as well as control treatment (20°C, water) were applied through a 7 days germination period. Beside the evaluation of the seed germinability (%) at the end of the treatment, seedling and hypocotyl masses, the content of hydrogen peroxide, proline, phenols, the lipid peroxidation rate were determined, as well as total and specific activity of ascorbate peroxidase, catalase, guaiacol peroxidase and glutathione reductase in hypocotyl tissue were analysed. The highest stress effect in the germination stage had a higher level of drought stress (10% PEG) and low temperature (10°C). High temperature (30°C) was favourable for seedling development and mild drought stress (5% PEG) have had a "priming" effect and increased germination rate. In the second experiment, selected two cultivars were grown in the pots, filled with soil and kept in the open until the flowering stage (R_2), and afterwards exposed to different temperature conditions (30°C, 10°C and 20°C as control treatment) during 3 days in a climate chamber. The contents of photosynthetic pigments, photosynthesis efficiency parameters and all the aforementioned physiological indicators of plant response to stress were determined in the most developed trifoliate leaf. Highly significant treatment influence on the analysed parameters in the both growth stages, confirms that the applied treatments invoked the oxidative stress and defence reactions in soybean at molecular level. In general, the total activities of tested enzymes were higher at 10°C in germination stage, and at 30°C in flowering stage, which suggests a diversity of stress effects of ambient temperature depending on the growth stage in soybean.

Number of pages: 195
Number of figures: 53
Number of tables: 34
Number of references: 259
Original in: croatian

Key words: soybean, varietal specificity, abiotic stress, osmotic stress, drought stress, salt stress, temperature stress.

Date of the thesis defense: March 15th, 2016.

Reviewers:
1. PhD Miroslav Lisjak, assistant professor – President
2. PhD Tihana Teklić, full professor – Supervisor and member
3. PhD Luka Andrić, scientific adviser – Cosupervisor and member

Thesis deposited in:
National and University Library in Zagreb, Agricultural Faculty library in Osijek, City and University Library in Osijek, Agricultural Faculty Archives in Osijek

Doktorska disertacija je izrađena u sklopu znanstvenog projekta Ministarstva znanosti obrazovanja i sporta Republike Hrvatske „Fiziološki mehanizmi otpornosti biljaka na abiotski stres“ (079-0790494-0559) kojega je voditeljica prof.dr.sc. Tihana Teklić.

Tijekom svakog koraka ovog doktorskog rada, na moju sreću, pratili su me stručni, pouzdani i dragi ljudi kojima dugujem veliku zahvalnost.

Najiskrenije se zahvaljujem svojoj mentorici i prijateljici prof.dr.sc. Tihani Teklić bez koje ovaj doktorat ne bi ni nastao. Njezino neograničeno strpljenje i vjera u mene pomogli su mi da otkrijem snagu za koju nisam ni znala da postoji u meni. Hvala na prenesenom znanju i iskustvima, savjetima, idejama, vremenu, kao i na velikoj pomoći pri izradi i pisanju ove disertacije. HVALA na svemu!

Hvala komentoru dr.sc. Luki Andriću na velikoj podršci, savjetima, kao i na čitanju teksta doktorskog rada te korisnim prijedlozima za njegovo poboljšanje. Također, želim mu zahvaliti na pomoći u odabiru kultivara i donaciji sjemena soje.

Veliko hvala kolegi i prijatelju doc.dr.sc. Miroslavu Lisjaku na nesebičnoj pomoći u laboratoriju, podršci, idejama, pomoći pri računanju i statističkoj obradi podataka. Naše dugotrajne rasprave o tome „kako i zašto“ nešto „je i treba biti“ ostat će mi u dragom sjećanju i nadam se da će ih biti još mnogo.

Zahvalnost upućujem i prof.dr.sc. Ivani Maksimović te doc.dr.sc. Marini Putnik-Delić na ustupljenom uređaju za mjerenje fluorescencije i obuci u radu s istim. Hvala vam na dosadašnjoj a veselim se i budućoj suradnji s vama.

Veliko hvala prijateljima Ivni Štolfa, Rosemary Vuković i Dejanu Agiću na nesebičnoj pomoći u laboratoriju kada god je to bilo potrebno. Bez vaše pomoći do danas bi homogenizirala tkivo soje. Ivna hvala ti na ustupljenim analitičkim protokolima.

Hvala predstojniku prof.dr.sc. Zdenku Lončariću i svim članovima Zavoda za agroekologiju Poljoprivrednog fakulteta u Osijeku na prijateljstvu, razumijevanju, pomoći i savjetima. Hvala vam što ste me prihvatili kao člana vašeg znanstveno-istraživačkog tima. Veliko hvala kolegi i prijatelju Zoranu Semialjcu na pažljivom čitanju teksta doktorske disertacije.

Hvala Mihaeli Rakitić, Katici Klešić, Manueli Grčević, Danielu Hamanu, Dariu Iljkiću - prijateljima, kolegama i suradnicima koji su vjerovali u mene i bodrili me na svakom koraku. Hvala Sari Teklić-Ward na lekturi engleskog jezika.

Puno hvala prijateljici prof.dr.sc. Irelli Bogut na nesebičnoj prijateljskoj pomoći i čitanju teksta doktorskog rada.

Želim od srca zahvaliti Mariji Terke-Filko koja je u svom vrtu svakodnevno pazila na moje biljčice soje i podržavala moju želju da se upustim u ovaj osobni poduhvat.

Veliko hvala zaručniku Igoru Filku na bezuvjetnoj ljubavi, odricanju i razumijevanju. Hvala mu što je zbog mene naučio homogenizirati biljno tkivo kako bi mi pomogao završiti analitički dio doktorskog rada. Zahvalna sam što je bio uz mene kada mi je bilo najpotrebnije.

Posebno hvala mojim roditeljima na svim odricanjima, ljubavi, razumijevanju te na cjelokupnom trudu koji su uložili u moje školovanje.

Svima se vama i onima koje nisam spomenula, a doprinijeli su ovoj disertaciji, od srca zahvaljujem, iznimno poštujući vaš doprinos. HVALA VAM!

Disertaciju posvećujem svojoj obitelji.

“Any unfavorable condition or substance that affects or blocks a plants metabolism, growth or development, is to be regarded as stress.“

Hartmut K. Lichtenthaler, 1996.

KAZALO

1. UVOD 1

2. PREGLED LITERATURE 5

2.1. Soja 5

2.2. Abiotski i oksidacijski stres 7

2.3. Fiziološki mehanizmi obrane od stresa 12

2.4. Osmotski, sušni, solni i temperaturni stres 18

3. CILJ ISTRAŽIVANJA 27

4. MATERIJAL I METODE RADA 28

4.1. Opis eksperimenata 28

4.2. Utvrđivanje klijavosti i morfoloških svojstva 32

4.3. Metode utvrđivanja fiziološkog statusa biljke 32

4.3.1. Neenzimski pokazatelji stresa 32

4.3.2. Enzimski pokazatelji stresa 35

4.3.3. Utvrđivanje fotosintetske aktivnosti 38

4.5. Statistička analiza podataka 40

5. REZULTATI ISTRAŽIVANJA 41

5.1. FENOLOŠKA FAZA: KLIJANJE-NICANJE 41

5.1.1. Klijavost i morfološka svojstva 41

5.1.1.1. Klijavost sjemena soje 42

5.1.1.2. Masa klijanca soje 45

5.1.1.3. Masa hipokotila klijanca soje 48

5.1.2. Fiziološka svojstva 51

5.1.2.1. Neenzimski pokazatelji stresa kod soje u fenološkoj fazi klijanje-nicanje 51

5.1.2.1.1. Sadržaj vodikovog peroksida u tkivu hipokotila klijanaca soje 52

5.1.2.1.2. Intenzitet lipidne peroksidacije u tkivu hipokotila klijanaca soje 56

5.1.2.1.3. Sadržaj slobodnog prolina u tkivu hipokotila klijanaca soje 59

5.1.2.1.4. Sadržaj ukupnih fenola u tkivu hipokotila klijanaca soje 63

5.1.2.2. Enzimski pokazatelji stresa kod soje u fenološkoj fazi klijanje-nicanje 67

5.1.2.2.1. Aktivnost askorbat-peroksidaze u tkivu hipokotila klijanaca soje 67

5.1.2.2.2. Aktivnost katalaze u tkivu hipokotila klijanaca soje 74

5.1.2.2.3. Aktivnost gvajakol-peroksidaze u tkivu hipokotila klijanaca soje 81

5.1.2.2.4. Aktivnost glutation-reduktaze u tkivu hipokotila klijanaca soje 88

5.2. FENOLOŠKA FAZA: PUNA CVATNJA 94
5.2.1. Morfološka svojstva 94
5.2.1.1. Masa listova po biljci 95
5.2.1.2. Masa troliske 97
5.2.1.3. Broj troliski po biljci 98
5.2.2. Pokazatelji fotosintetske aktivnosti 99
5.2.2.1. Sadržaj i omjeri fotosintetskih pigmenata 101
5.2.2.2. Fotosintetska učinkovitost 106
5.2.3. Neenzimski pokazatelji stresa kod soje u fenološkoj fazi pune cvatnje 111
5.2.3.1. Sadržaj vodikovog peroksida u tkivu lista soje 111
5.2.3.2. Intenzitet lipidne peroksidacije u tkivu lista soje 113
5.2.3.3. Sadržaj slobodnog prolina u tkivu lista soje 115
5.2.3.4. Sadržaj ukupnih fenola u tkivu lista soje 116
5.2.4. Enzimski pokazatelji stresa kod soje u fenološkoj fazi pune cvatnje 118
5.2.4.1. Aktivnost askorbat-peroksidaze u tkivu lista soje 119
5.2.4.2. Aktivnost katalaze u tkivu lista soje 122
5.2.4.3. Aktivnost gvajakol-peroksidaze u tkivu lista soje 124
5.2.4.4. Aktivnost glutation-reduktaze u tkivu lista soje 125
5.3. KORELACIJSKE POVEZANOSTI IZMEĐU ISPITIVANIH POKAZATELJA U FAZI KLIJANJE-NICANJE I FAZI CVATNJE 127
6. RASPRAVA 134
6.1. Utjecaj razine sušnog, solnog i temperaturnog stresa na klijavost i razvoj klijanaca soje te utjecaj visokih i niskih temperatura na biljke u fazi cvatnje 134
6.2. Utjecaj induciranog stresa u fazama klijanje-nicanje i cvatnje na specifične metabolite, pojava oksidacijskog stresa i metabolički pokazatelji kao indikatori stresa 138
6.3. Različitost ispitivanih kultivara soje u vigoru sjemena, razvoju klijanaca i metaboličkoj reakciji na primijenjene stresne tretmane 146
6.4. Fotosintetska učinkovitost i razina antioksidativnog odgovora u listu soje pod utjecajem visokih i niskih temperatura u fazi cvatnje 149
6.5. Aktiviraju li se obrambeni fiziološki mehanizmi, utvrđeni u fazi klijanje-nicanje, i u fazi cvatnje? 154
7. ZAKLJUČCI 158
8. LITERATURA 161
9. SAŽETAK 182
10. SUMMARY 184
11. PRILOG 186
11.1. Popis tablica 186
11.2. Popis slika 189
11.3. Popis korištenih kratica 193
12. ŽIVOTOPIS 195

1. UVOD

U posljednjih dvadesetak godina, stres je postao popularna tema u fiziologiji različitih organizama, od jednostaničnih do čovjeka. Potrebno je naglasiti da je definicija stresa stvar dogovora, jer je nemoguće odrediti fiksne ili apsolutne vrijednosti stresa, specifične za pojedini organizam ili životne uvjete. Stresni uvjeti okoliša mogu biti širokog raspona, te određena razina nekog činitelja može na organizam djelovati različito, ovisno o velikom broju drugih činitelja, kako vanjskih (okolišnih) tako i unutarnjih, odnosno sposobnosti organizma da reagira na stres u smislu tolerancije ili netolerancije.

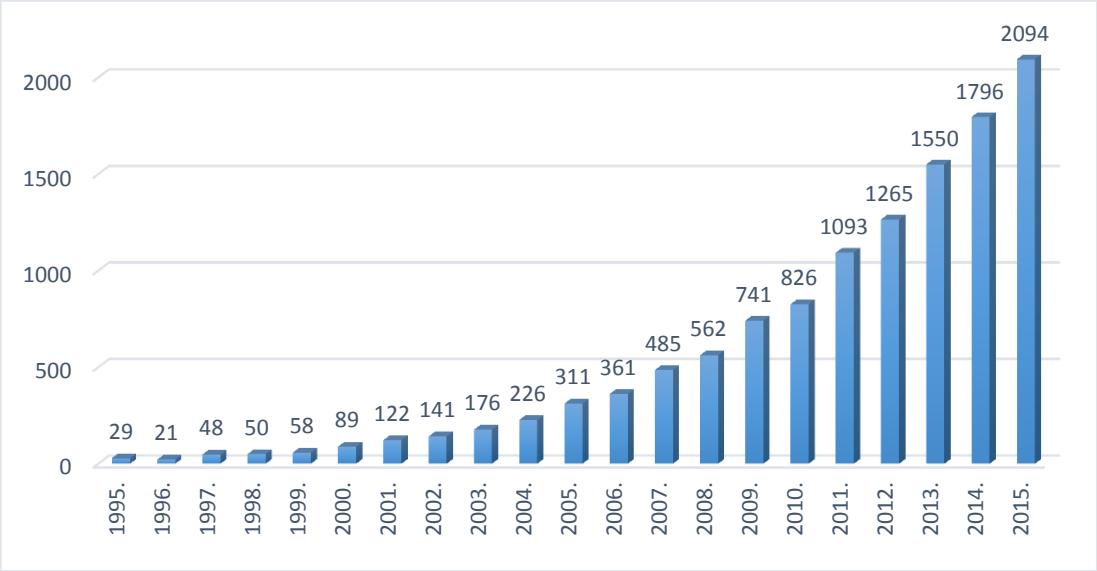
Prema često citiranoj definiciji **Lichtenthalera** iz **1996.** godine, stres kod biljaka u širem smislu podrazumijeva bilo kakve uvjete okoliša ili prisustvo tvari koje utječu ili blokiraju metabolizam, te rast odnosno razvoj biljaka. Međutim, „stres“ treba razlikovati od „poremećaja“ koji dovode do reakcije biljke u smislu promjena u dinamici njenog rasta i razvoja, ali ne ugrožavaju funkcioniranje biljnog organizma.

U osnovi, stres se kod biljaka može svrstati u dvije osnovne kategorije. Abiotski stres izazivaju fizikalni ili kemijski činitelji okoliša kao što su osvjetljenje, temperatura, vlaga, različite toksične tvari, dok je biotski stres izazvan djelovanjem drugih organizama, najčešće patogenih mikroorganizama i štetnika. Često se ove dvije osnovne kategorije okolišnog stresa u djelovanju na biljke preklapaju, tj. pojavljuju istovremeno ili su međusobno povezane. Biljke najčešće nisu izložene samo jednoj vrsti stresa jer se u određenim uvjetima tla i klime može dogoditi višestruki stres ako su dva ili više činitelja izvan granica optimuma za biljke.

S fiziološkog stanovišta, preživljavanje ili oporavak organizma biljke je glavno svojstvo koje se podrazumijeva kada se govori o tolerantnosti na stres, za razliku od agronomske točke gledišta gdje je za determinaciju tolerantnosti bitna značajka prinos ostvaren u stresnim uzgojnim uvjetima. Iz agronomske perspektive, okolišne vrste stresa se smatraju najznačajnijim činiteljima velikog i nepredvidljivog smanjenja produktivnosti biljaka u suvremeno vrijeme. Uslijed evidentnih klimatskih promjena na globalnoj i lokalnoj razini, smanjenju proizvodnih područja s optimalnim uvjetima za uzgoj biljaka, kao i rastućih potreba za povećanjem biljne proizvodnje uslijed porasta stanovništva na

Zemlji, pronalaženje ili stvaranje biljnih genotipova sposobnih za visoku produktivnost u stresnim uvjetima uzgoja postaje sve važniji cilj znanstvenih i stručnih aktivnosti.

Pretraživanjem baze Web of Science prema pojmu „plant abiotic stress“ dobiva se za razdoblje od 1995. do 2015. godine 10 570 rezultata, od čega 8 949 znanstvenih radova u časopisima, 1 527 preglednih radova te 77 poglavlja u knjigama. Ogroman interes znanstvenika za ovo područje u biologiji biljaka potvrđuju i podaci o broju objavljenih publikacija u navedenom razdoblju po godinama (*Slika 1.1.*). Uočljiv je trend izrazitog povećanja istraživanja i objavljivanja znanstvenih radova na temu abiotskog stresa u biljkama, te se može zaključiti da je aktualnost i značenje te problematike sve veće.



Slika 1.1. Prikaz broja objavljenih publikacija o abiotskom stresu u biljkama citiranih u bazi Web of Science po godinama (1995. - 2015.), prema pretrazi u bazi na dan 10. veljače 2016.

Razvoj kulturnih biljaka tolerantnih na stres zahtijeva dobro poznavanje fizioloških mehanizama reakcije biljke na stres i genetske kontrole specifičnih pokazatelja, odnosno poželjnih svojstava određene biljne vrste, u različitim fazama rasta i razvoja. Dosadašnja istraživanja nedvojbeno pokazuju da različiti oblici abiotskog stresa u biljkama mogu pokrenuti iste fiziološke mehanizme obrane. Također, utvrđeno je da poremećaji uslijed djelovanja abiotskih činitelja u biljkama izazivaju primarne i sekundarne učinke, od molekularne i stanične razine do vidljivih morfoloških pa čak i

evolucijskih promjena. Primarni učinci poput smanjenja vodnog potencijala, odnosno dehidracije stanice izazvane različitim vrstama stresa, direktno utječu na fizikalna i biokemijska svojstva stanica, što izaziva sekundarne učinke, kao što su smanjena metabolička aktivnost, citotoksičnost pojedinih iona, cjelokupno narušavanje stanične homeostaze (ravnoteže), uz izrazitu pojavu reaktivnih kisikovih jedinki i drugih radikala. Kao rezultat tih sekundarnih učinaka primarnog poremećaja na staničnoj razini, kod netolerantnih (osjetljivih) biljaka može doći do oksidacijskog stresa koji rezultira narušavanjem struktura i funkcija stanice te njenim odumiranjem. Pri jačem intenzitetu ili duljem trajanju stresa, osjetljive biljne vrste se ne mogu oporaviti od nastalih oštećenja. Kod tolerantnih biljnih vrsta, odnosno genotipova, brzo se aktiviraju mehanizmi obrane, u smislu promjena metabolizma prema sintezi različitih zaštitnih komponenata i popravljanju eventualnih oštećenja staničnih struktura tijekom procesa aklimatizacije na stres. Uspostavljanje novonastale homeostaze je rezultat brojnih fizioloških procesa i aktivacije brojnih signalnih putova, koji se međusobno nadopunjuju u različitom vremenskom trajanju.

Sve ove spoznaje stečene su kroz ogroman broj često interdisciplinarnih istraživanja. Relativno je manji broj takvih istraživanja u kojima su kao model korištene kulturne biljke, u odnosu na najčešće ispitivanu biljnu vrstu *Arabidopsis thaliana* L., kod koje je genom potpuno definiran. Saznanja dobivena pomoću *A. thaliana* potrebno je testirati na kulturnim biljkama poput soje, koje imaju presudan značaj za proizvodnju hrane u svijetu.

Soja je vodeća uljna i proteinska kultura, čije je zrno zbog svog kemijskog sastava vrlo značajno u ishrani životinja i prehrani ljudi te je važna sirovina u različitim granama prerađivačke industrije. Osim toga soja, kao leguminoza u plodoredu, ima i veliku agrotehničku i ekološku vrijednost. U simbiozi s bakterijama *Bradyrhizobium japonicum* na korijenu, soja zadovoljava dio svojih potreba za dušikom usvajajući ga iz zraka, pri čemu nakon žetve u tlu zaostaje značajna količina dušika, čime se smanjuje potreba za primjenom mineralnih dušičnih gnojiva kod slijedeće kulture u plodoredu.

Soja se uzgaja u više od 60 zemalja u svijetu, a udjel sojinog ulja u ukupnoj svjetskoj proizvodnji jestivih ulja čini oko 35%. Prema FAOSTAT podacima, u 2013. godini je u svijetu bilo zasijano 111 269 782 ha soje, s prosječnim urodom od 2,484 t/ha, odnosno

proizvedeno je 276 406 003 t zrna. U Republici Hrvatskoj je u istoj godini zasijano 47 156 ha, prosječan urod je bio 2,361 t/ha i proizvedeno je 111 316 t zrna.

Bolje poznavanje genetskog potencijala ove vrijedne kulture sve više dobiva na značaju, s ciljem njenog daljnjeg oplemenjivanja i kreiranja novih kultivara, sposobnih za visoku produktivnost u uzgojnim uvjetima koji odstupaju od optimuma u odnosu na potrebe biljke. Među najznačajnijim ekološkim činiteljima koji sve više ugrožavaju biljnu proizvodnju u cjelini, pa tako i proizvodnju sojinog zrna, ističu se raspoloživost vode, oscilacije temperature i zaslanjenost tla. Bilo kakav poremećaj navedenih činitelja i kod soje može izazvati abiotski stres, pri čemu je tolerantnost genotipa na stres svojstvo koje će biti sve interesantnije u oplemenjivačkim programima. Ova doktorska disertacija ima za cilj doprinijeti boljem poznavanju genetski definiranih fizioloških mehanizama kojima se soja odupire navedenim stresnim uvjetima, u različitim fazama rasta i razvoja.

2. PREGLED LITERATURE

2.1. Soja

Kulturna soja (*Glycine max* (L.) Merr.) je važna proteinska sirovina kako u ljudskoj prehrani tako i u hranidbi životinja, te ima velik značaj u proizvodnji jestivog ulja kao i biodizela (**Vratarić i Sudarić, 2008.**; **Nouri i sur., 2011.**; **Silvente i sur., 2012.**; **Fan i sur., 2013.**). **Vratarić i Sudarić (2008.)** smatraju da soji nema ravne među ratarskim biljkama jer se ona može koristiti u razne svrhe i kod prerade može biti iskorištena 100%, ali naglašavaju da je soja specifična biljka, daleko složenija i zahtjevnija od mnogih drugih ratarskih kultura. Soja je uspravna, granata jednogodišnja biljka s velikim variranjem u morfološkim svojstvima, ovisno o sorti i činiteljima vanjske sredine (**Vratarić i Sudarić, 2008.**), poput fotoperiodizma, temperature i pristupačnosti vode. Svaki propust u proizvodnji se može negativno odraziti na konačni urod zrna, naročito u kombinaciji sa stresnim klimatskim uvjetima tijekom vegetacije. Autori smatraju da se poznavanjem biljke soje i pravovremenom primjenom određenih tehnoloških mjera u proizvodnji mogu ublažiti stresne situacije tijekom vegetacije.

Soja je suptropska biljna vrsta, koja se uzgaja na području od umjerenog do tropskog klimata, stoga održivost i predvidljivost proizvodnje soje mogu biti jako ograničene okolišnim stresom (**Fenta i sur., 2011.**). Kao i kod drugih kultura, različite vrste abiotskog i biotskog stresa utječu na rast i razvoj soje, pri čemu su za ovu kulturu najznačajniji solni i sušni stres, prema mišljenju **Fan i sur. (2013.)**. Abiotski stres mijenja metabolizam u stanicama soje i u konačnici utječe na rast, razvoj i proizvodni potencijal biljke (**Nouri i sur., 2011.**). Ovisno o tipu, intenzitetu i trajanju stresa, soja pokazuje specifične odgovore na staničnoj razini, promjenama u ekspresiji gena i proteinskom sastavu. **Nouri i sur. (2011.)** smatraju da je za razliku od opsežno proučavanog proteoma biljaka modela poput *Arabidopsis thaliana* L. i *Oryza sativa* L., analizi važnih biljaka poput soje dano manje pozornosti. Autori naglašavaju da je globalno smanjenje obradivih površina, kao rezultat ljudske djelatnosti i okolišnih činitelja, ograničilo povećanje površina pod sojom. Također, ističu povećanu pozornost prema istraživanjima uzgoja soje na marginalnim tlima, pri čemu je produktivnost soje u nepovoljnim uvjetima okoliša značajno ograničena osmotskim stresovima (što uključuje zaslanjenost, sušu i hladnoću), koji imaju negativan učinak na rast, fiksaciju dušika, agronomska svojstva, kakvoću sjemena i prinos.

Tran i Mochida (2010.) ističu soju kao jedan od ekonomski značajnih usjeva, kod kojih abiotski stres poput ekstremnih temperatura, suše, zaslanjenosti, hladnoće ili poplavljenosti često rezultira značajnim gubitcima prinosa.

Prema **Vratarić i Sudarić (2008.)**, niske temperature usporavaju, a visoke ubrzavaju klijanje sjemena i razvoj listova, pa broj dana od sjetve do faze nicanja *VE* može varirati od 5 do 15 dana. Sušni stres smanjuje prinos soje oko 40%, a utječe na sve fenofaze razvoja od klijanja do cvatnje te smanjuje i kakvoću sjemena (Manavalan i sur., 2009., cit. **Nouri i sur., 2011.**). Sjeme soje sklono je oksidativnom stresu zbog visokog sadržaja lipida i proteina te pri hipoksičnim uvjetima imbibicije u vodi, najveći intenzitet lipidne peroksidacije je utvrđen u tkivu klice, a najmanji u sjemenjači, u istraživanju **Lisjak i sur. (2009.)**. **Fan i sur. (2013.)** smatraju da će identifikacija gena odgovornih za toleranciju stresa kod soje dovesti do boljeg razumijevanja molekularnih mehanizama i genetske osnove tolerancije stresa.

Konvencionalno oplemenjivanje soje značajno je doprinijelo poboljšanju svojstava ove biljke u posljednjih 50 godina (**Pathan i sur., 2007.**). Konvencionalnim oplemenjivanjem je lakše manipulirati visoko nasljednim svojstvima koja su manje osjetljiva na promjene okoliša, ali kvantitativna svojstva poput prinosa ili tolerancije na abiotski stres su značajno osjetljiva na promjene u okolišu. Većina za poljoprivredu važnih svojstava biljaka kvantitativno su nasljedna i teško ih je poboljšati konvencionalnim oplemenjivanjem. Uobičajeni sustav selekcije mogu upotpuniti molekularni markeri koji pomažu pri izboru željenih svojstava u mnogo kraćem vremenu, izbjegavajući radno intenzivni, vremenski zahtjevni, konvencionalni, fenotipski izbor. Dobro razvijene molekularne genetičke mape, funkcionalni genomski resursi i drugi molekularni alati dostupni su za soju, a njihovo korištenje omogućit će bolje razumijevanje osnovnih mehanizama tolerancije na abiotski stres. Autori također smatraju da će integracija tih alata u kombinaciji s dobro razvijenim oplemenjivačkim strategijama pomoći razvoju kultivara soje s visokom tolerancijom na abiotski stres.

2.2. Abiotski i oksidacijski stres

Biljke rastu u dinamičnom i nekontroliranom okolišu koji često izaziva poteškoće u njihovom rastu i razvoju. Prema **Reynolds-Henne i sur. (2010.)**, stres u biljkama se može razviti u razdoblju od nekoliko mjeseci (npr. stres uslijed poremećaja mineralne ishrane), nekoliko dana do tjedana (npr. sušni stres) pa čak i nekoliko minuta (npr. temperaturni stres).

Grover i sur. (1999.) tumače da se pojam abiotski stres odnosi na činitelje poput ispod- i iznad-optimalnih temperature, suvišak soli (najčešće NaCl) te smanjenu raspoloživost vode koji izazivaju stres dehidracijom, suvišak vode u uvjetima poplavljenosti koja zbog smanjene opskrbe kisikom dovodi do anaerobnog stresa, te oksidativni stres izazvan i svjetlosnim, kemijskim i dr. činiteljima. Autori smatraju da abiotski stres ugrožava gotovo sve glavne usjeve u različitim ekosustavima. Abiotski stres kao što su ekstremne temperature, suša, povećana zaslanjenost supstrata i poplavljenost tla često rezultira značajnim gubitcima uroda kod ekonomski važnih usjeva poput soje (**Tran i Mochida, 2010.**). **Verslues i sur. (2006.)** konstatiraju da su abiotski stres i njegovi učinci na biljke, i u prirodnom i u poljoprivrednom okruženju, tema koja izaziva povećanu pozornost zbog potencijalnih učinaka klimatskih promjena na raspored oborina, temperaturne ekstreme, salinizacije poljoprivrednih površina zbog navodnjavanja i sveopće potrebe za održavanjem ili povećanjem poljoprivredne proizvodnje na marginalnim tlima.

Pored ekonomski važnih usjeva, abiotski i biotski stres izazivaju promjene normalnih fizioloških procesa u svim biljnim organizmima (**Lichtenthaler, 1996.**; **Chen i Murata, 2002.**; **Alexieva i sur., 2003.**). Svi primarni uzroci stresa su često međusobno povezani i dovode do staničnog oštećenja i pojave sekundarnog stresa, kao što je osmotski i oksidativni stres (**Wang i sur., 2003.**). Prema istim autorima, početni stresni signali kao što su osmotski i ionski učinci, temperatura i promjene fluidnosti membrana, pokreću nizvodne signalne procese i transkripcijsku kontrolu s ciljem aktivacije mehanizma odgovora na stres, sa svrhom povrata homeostaze, zaštite i popravka oštećenih proteina i membrana. Autori zaključuju da nedovoljan odgovor u jednom ili više signalnih koraka, ili aktivaciji gena, može u konačnici rezultirati ireverzibilnim

promjenama stanične homeostaze te destrukcijom funkcionalnih i strukturnih proteina i membrana, što dovodi do smrti stanice.

Stresni okolišni uvjeti u biljkama izazivaju promjene na molekularnoj i fiziološkoj razini te razini pojedinih tkiva i cijele biljke, pri čemu su vidljive morfološke promjene biljke rezultat kumulativnog učinka pojedinih činitelja i sortno-specifičnog odgovora na stres, temeljenog na promjeni ekspresije gena i metaboličkih procesa (**Rasheed, 2009.**). **Atienza i sur. (2004.)** ističu da različiti stresni uvjeti mogu izazvati slične učinke u biljkama i da te sličnosti na fiziološkoj razini dovode do izvjesnog preklapanja molekularnih odgovora na različite vrste stresa. Tako npr. suša, solni stres, ekstremne temperature i oksidacijski stres su često međusobno povezani i mogu izazvati slična stanična oštećenja (**Wang i sur., 2003.**). Reakcije biljaka na zaslanjenost i sušu su usko povezane. Solni i sušni stres utječu na metabolizam te rast i razvoj biljaka, a zajedno s niskim temperaturama čine glavni problem za poljoprivredu jer onemogućuju postizanje punog genetskog potencijala rodnosti biljaka. Vodni stres usporava rast biljaka, a ABA (apscizinska kiselina) ima funkciju regulacije vodne ravnoteže u biljkama (**Zhu, 2002.**). Prema **Mittler (2006.)**, prilagodba biljaka određenim uvjetima abiotskog stresa zahtijeva specifičan odgovor, stoga se molekularni, biokemijski i fiziološki procesi pokrenuti specifičnim stresnim uvjetima mogu razlikovati u odnosu na one aktivirane nešto drugačijim kombinacijama okolišnih parametara. U skladu s tom spoznajom, **Qin i sur. (2011.)** smatraju da je potrebno definirati ispravno utvrđivanje tolerantnosti usjeva na okolišni stres, prema trenutnim potrebama poljoprivredne proizvodnje. Postizanje kombinacije visokog prinosa i tolerantnosti na stres u jednom kultivaru ovisi o našem razumijevanju kako se razvijaju pojedinačna svojstva i kakve su njihove međusobne interakcije. Autori ističu potrebu tijesne suradnje između molekularnih biologa, biljnih fiziologa i oplemenjivača. Da bi došlo do napretka u oplemenjivanju s ciljem povećanja tolerantnosti na stres, **Azevedo i Lea (2001.)** ističu neophodnost istraživanja učinaka različitih okoliša na genetsku varijabilnost. S druge strane, **Wang i sur. (2003.)** tvrde da je modificiranje biljaka sa svrhom povećanja tolerantnosti na stres većinom temeljeno na manipulaciji genima koji štite i održavaju funkciju i strukturu staničnih komponenata. Nasuprot većini kvalitativnih svojstava, kvantitativna svojstva (poput modificirane otpornosti na štetnike i pesticide te genetski kompleksnih odgovora na uvjete abiotskog stresa) je teže kontrolirati i modificirati.

S agronomskog stanovišta, okolišni stres predstavlja najznačajniji činitelj koji izaziva velika i nepredvidljiva smanjenja prinosa (**Pastori i Foyer, 2002.**). Autori također ističu da je interakcija genoma i okoliša ključna odrednica sastava biljnog tkiva (činitelji kakvoće), anatomije, morfologije i razvoja biljaka, te da su vigor i reakcija biljaka na okolišni stres rezultat stalnog prilagođavanja fiziologije i metabolizma tijekom života biljaka u okvirima genetske osnove. **Tran i Mochida (2010.)** smatraju da je genetska osnova tolerantnosti na stres složena i još nedovoljno razjašnjena. Molekularni i stanični odgovori na okolišne podražaje se intenzivno proučavaju na biokemijskoj, fiziološkoj, morfološkoj i metaboličkoj razini. Unatoč intenzivnim istraživanjima ove problematike, **Reguera i sur. (2012.)** također smatraju da je suvremeno razumijevanje mehanizama povezanih sa sposobnošću usjeva da zadrže prinos u uvjetima abiotskog stresa nedovoljno. Navedeni autori ističu da je, s fiziološkog stanovišta, preživljavanje (ili oporavak) glavno svojstvo koje čini tolerantnost biljke na stres, dok je, s agronomskog stanovišta, urod ključni pokazatelj uspješnosti usjeva koji su tolerantni na stres.

Općenito je prihvaćeno da je u osnovi metabolizma živih stanica, koje su izložene bilo kojoj vrsti okolišnog stresa, pojava povećane količine reaktivnih komponenti, pretežno kisika, i to se stanje u stanici naziva oksidacijskim stresom. Posljedica aerobnog oblika života je kontinuirano nastajanje reaktivnih oblika kisika (ROS), a taj je proces pojačan abiotskim stresom (**Vranová i sur., 2002.**; **Szalai i sur., 2009.**). Prema **Alsher i sur. (1997.)**, bilo koje stanje gdje dolazi do poremećaja stanične redoks ravnoteže, može se nazvati oksidacijskim stresom. Do toga mogu dovesti promjene okolišnih uvjeta: premalo ili previše vode, nepovoljne temperature, povećana koncentracija soli u tlu i dr. Oksidativni stres nastaje kao posljedica pojačanog stvaranja reaktivnih kisikovih jedinki koje nastaju prijenosom jednog, dva ili tri elektrona na molekularni kisik, pri čemu nastaju superoksidni radikal ($\bullet O_2^-$), vodikov peroksid (H_2O_2) ili hidroksilni radikal ($\bullet$HO), ili ekscitacijom molekularnog kisika uslijed čega dolazi do stvaranja visokoenergetskog singletnog kisika ($^1O_2$) (**Noctor i Foyer, 1998.**; **Yu i Rengel, 1999.**; **Pellinen, 2001.**; **Arora i sur., 2002.**; **Mittler, 2002.**; **Bhattacharjee, 2005.**). **Arora i sur. (2002.)** ističu da je zajedničko svojstvo različitih stresnih činitelja njihov potencijal stvaranja reaktivnih oblika kisika u biljnim tkivima, koji reagiraju sa staničnim komponentama poput lipida, nukleinskih kiselina i proteina (**Swigonska i Weidner, 2013.**). Oksidativni stres je u osnovi kontroliran proces, tj. u normalnim uvjetima je proizvodnja tih radikala dobro regulirana u staničnom metabolizmu, pri čemu ravnoteža

između oksidacijskog i antioksidacijskog kapaciteta određuje sudbinu biljke (**Arora i sur., 2002.**). Općenito, svaka stanična organela s visoko oksidacijskom metaboličkom aktivnošću ili s visokim intenzitetom protoka elektrona može generirati ROS, kao npr.: kloroplasti u fotosintezi, mitohondriji u staničnom disanju, peroksisomi tijekom fotorespiracije i oksidacije masnih kiselina, aktivnošću membranski vezane NADPH-oksidaze, amin-oksidaze i peroksidaze u apoplastu ili peroksidaza vezanih za staničnu stjenku (**Mittler, 2002.**; **Mundree i sur., 2002.**; **Mittler i sur., 2004.**).

Posljedice nastajanja slobodnih kisikovih radikala ovise o intenzitetu stresa i fizikalno-kemijskim uvjetima u stanici, kao što su antioksidativni status, redoks status i pH (**Blokhina, 2000.**). Autorica pretpostavlja da ROS utječu na stanicu kombinacijom nekoliko činitelja: količinom stvorenih kisikovih radikala (što je u korelaciji s jačinom stresa) i biokemijskim statusom stanice (aktivnost antioksidativnih i ostalih enzima, sadržaj antioksidanasa, pH, rezerve energije, integritet membrana, redoksna svojstva, itd.). ROS utječu na povećanje sinteze neenzimskih antioksidanasa poput tripeptid-tiola, glutationa, vitamina C (askorbat) i E (α-tokoferol), ali i na povećanje enzimskih antioksidanasa kao npr. superoksid-dismutaze (SOD), glutation-peroksidaze (GPX), glutation-reduktaze (GR), askorbat-peroksidaze (APX) i katalaze (CAT) (**Foyer i sur., 1997.**).

Oksidansi poput vodikovog peroksida (H_2O_2) djeluju u interakciji s drugim signalnim sustavima, naročito hormonalnim, te utječu na djelovanje drugih sekundarnih glasnika poput Ca^{2+} i NO, modificirajući njihovu aktivnost (**Pastori i Foyer, 2002.**). Vodikov peroksid u biljnim stanicama ima mnogo značajnih metaboličkih uloga, uglavnom nastaje tijekom procesa fotosinteze, fotorespiracije i staničnog disanja (**Foyer, 1997.**; **Pevalek-Kozlina, 2003.**; **Bhattacharjee, 2005.**). Do pojačanog stvaranja vodikovog peroksida u kloroplastima i drugim staničnim kompartimentima te u apoplastu dolazi kada je biljka izložena različitim stresnim uvjetima (**Foyer i sur., 1997.**). Taj metabolit je prva stabilna komponenta među reaktivnim kisikovim jedinkama koja nastaje u biljnoj stanici, kako u normalnim uvjetima, tako i kao rezultat stresa te je stoga najvjerojatniji „kandidat“ za prijenos signala reguliran kisikovim radikalima (**Blokhina, 2000.**). **Pastori i Foyer (2002.)** naglašavaju da H_2O_2 djeluje kao prenositelj signala i u optimalnim i u stresnim uvjetima te navode da je poluvrijeme postojanja molekule H_2O_2 u biljkama određeno kapacitetom dva glavna antioksidativna regulatora u biljnim

stanicama, askorbatom i glutationom, zajedno s antioksidativnim enzimima koji koriste navedene antioksidanse (**Noctor i Foyer, 1998.**). **Bhattacharjee (2005.)** naglašava da H_2O_2 kao jaki oksidans može inicirati lokalno stanično oštećenje koje dovodi do poremećaja metaboličkih funkcija, a može difundirati na relativno velike udaljenosti izazivajući promjene redoks stanja okolnih stanica i tkiva, gdje u niskim koncentracijama pokreće antioksidativni odgovor. Autor također tumači da akumulacija vodikovog peroksida predstavlja signal o oksidacijskom stresu u dijelovima stanice gdje se H_2O_2 stvara, što inicira odgovarajuće reakcije u staničnom sustavu obrane, pri čemu takav *„signalling“* dovodi do djelomične univerzalne obrane od više različitih stresnih činitelja. Isti autor smatra da ROS poput H_2O_2 imaju multifunkcionalne interaktivne uloge u ranim fazama reakcije biljke na stres. Subletalne koncentracije ROS prilagođavaju biljku različitim vrstama abiotskog i biotskog stresa, te smanjuju porast, vjerojatno kao dio mehanizma prilagodbe. Vodikov peroksid, kao sporedni produkt enzima SOD, mora se eliminirati konverzijom u H_2O u reakcijama kataliziranim enzimima APX, POX i CAT, koji reguliraju razinu vodikovog peroksida u biljkama (**Wang i sur., 2009.**).

Prekomjerno stvaranje ROS-a oštećuje makromolekularne strukture u stanici poput DNA, različitih proteina i lipida (**Esterbauer i sur., 1991**.). Degradacija membranskih lipida pri čemu nastaju slobodne masne kiseline, inicira oksidacijsko oštećenje stvarajući supstrat za enzim lipoksigenazu, čiji je rezultat peroksidacija lipida, uz pojavu alkoksi i peroksi radikala te singletnog kisika, stoga su te reakcije glavni izvor ROS u biljnim stanicama (**Bhattacharjee, 2005.**). Lipidna peroksidacija se smatra prirodnim metaboličkim procesom u normalnim fiziološkim uvjetima i jedna je od najistraživanijih posljedica djelovanja ROS na strukturu i funkciju membrana (**Blokhina, 2000.)**. Peroksidacijom viših masnih kiselina u prisustvu ROS-a nastaju lipidni peroksidi, koji se pri analizi u kojoj se koristi tiobarbiturna kiselina (Heath i Packer, 1968. cit. **Ambriović Ristov i sur., 2007.**) tijekom zagrijavanja kisele reakcijske smjese raspadaju. Pri tome nastaje malondialdehid (MDA) koji reagira s tiobarbiturnom kiselinom, a nastalo crveno obojenje mjeri se spektrofotometrijski. Koncentracija MDA utvrđena na taj način predstavlja intenzitet lipidne peroksidacije u biljnom tkivu, i često se izražava kao TBARS (thiobarbituric acid reactive substances), čiji je sadržaj prema **Wang i sur. (2004.)** pokazatelj tolerancije biljke na stres.

2.3. Fiziološki mehanizmi obrane od stresa

Qin i sur. (2011.) smatraju da je mehanizam odgovora biljaka na okolišni stres vjerojatno napredniji i značajniji nego kod životinja. Autori ističu da je pitanje kako biljne stanice reagiraju na različite okolišne stresove jedna od najatraktivnijih tema, ne samo biljnim biolozima, nego i agronomima jer je abiotski stres posebna prijetnja produktivnosti usjeva. Biljke raspolažu s nizom profinjenih mehanizama odgovora na promjene u okolišu, koji su nastali tijekom dugog razdoblja njihove evolucije i domestifikacije **(Shao i sur., 2007.)**. Autori ističu da su ti mehanizmi uključeni u mnoge aspekte anatomije, fiziologije, biokemije, genetike, razvoja, evolucije i molekularne biologije, pri čemu smatraju da je najvažniji mehanizam adaptacije na razini molekularne biologije. Slično, **Urano i sur. (2010.)** ističu da su biljke razvile različite mehanizme tolerancije kao različite procese, uključujući fiziološke i biokemijske promjene koje rezultiraju adaptivnim ili morfološkim promjenama. Raspon transkripata koji kodiraju enzime s funkcijom neutralizacije ROS je različit, prema **Rizhsky i sur. (2002.)**, te se detoksikacija ROS može u različitim tipovima stresa odvijati različitim putovima. Mehanizmi koji kontroliraju samu percepciju stresa su vjerojatno univerzalni u biljnom carstvu, obzirom na postojanje vrsta adaptiranih na stres u različitim biljnim porodicama, postojanje stres-tolerantnih divljih srodnika kod mnogih glikofitnih vrsta te genetske varijabilnosti otpornosti na stres kod uzgajanih biljaka (**Bohnert i sur., 1995.**).

U znanstvenoj literaturi se može naći velik broj preglednih radova na temu oksidacijskog stresa u biljkama, u kojima se objašnjava pojava, metabolizam i uloga ROS, te fiziološki mehanizmi njihovog neutraliziranja na molekularnoj i staničnoj razini. Još **1997.** godine **Alscher i sur.** objašnjavaju povezanost ROS i antioksidativnih enzima superoksid-dismutaze, askorbat-peroksidaze i glutation-reduktaze. Iste godine **Rice-Evans i sur. (1997.)** izvješćuju o antioksidativnom kapacitetu fenolnih spojeva u biljkama. **Grassmann i sur. (2002.)** također objašnjavaju zaštitno djelovanje biljnih fenola i terpenoida te mogućnosti njihove korisne primjene kod životinja i u medicini. Među brojnim preglednim radovima o oksidacijskom stresu u biljkama koje su objavili Foyer i Noctor sa suradnicima, ističe se Tansley review No. 112 (**Foyer i Noctor, 2000.**). U Tansley review No. 111, **Cakmak (2000.)** diskutira o mogućoj ulozi Zn u zaštiti od oksidacijskog oštećenja biljnih stanica, a **Hiraga i sur. (2001.)** daju pregled velike grupe enzima peroksidaza u biljkama. **Takahama (2004.)** objašnjava povezanost

askorbata, fenola i peroksidaza. Posebnost i značaj askorbat-peroksidaza u biljkama u obrani od stresa prikazani su radovima **Shigeoka i sur. (2002.)** te **Dąbrowska i sur. (2007.)**. U skladu s tim, glutation kao antioksidans i regulatorna komponenta u biljkama ima izuzetnu ulogu u uvjetima abiotskog stresa (**Szalai i sur. 2009.**). Povezanost oksidacijskog stresa i aklimatizacijskih sposobnosti biljaka na okolišne uvjete objašnjava **Greene (2002.)**, pri čemu je značajno utvrditi metaboličke i proteomske markere za oksidacijski stres (**Shulaev i Oliver, 2006.**). Genetska osnova aktivacije pojedinih obrambenih mehanizama kao objašnjenje različite tolerantnosti biljaka na stresne uvjete prikazana je u preglednim radovima **Pastori i Foyer (2002.)**, **Mittler i sur. (2004.)** i dr. Treba naglasiti da se nalazi sve više dokaza o signalnoj ulozi pojedinih ROS (**Foyer i Noctor, 2000.**; **Vranová i sur., 2002.**; **Bhattacharjee, 2005.**; **Pucciariello i sur., 2012.**).

Bohnert i sur. (1995.; **2006.)** smatraju da će proučavanje stresnih odgovora doprinijeti poznavanju temeljne biljne biokemije, jer na taj način saznajemo sve više o metabolizmu, njegovoj fleksibilnosti, ograničenjima i raznovrsnosti. Također, razumijevanje mehanizama koji osiguravaju tolerantnost objašnjava ekološku raznolikost i distribuciju vrsta te pruža bitne informacije o učinkovitosti usjeva. Sposobnost modifikacije tolerantnosti bi trebala doprinijeti potencijalu povećanja stabilnosti uroda u stresnim uzgojnim uvjetima. Biljke koje su prirodno tolerantne na stres imaju širok raspon prilagodbi, od kojih mnoge još nisu identificirane na molekularnoj razini (**Rathinasabapathi, 2000.**).

Alexieva i sur. (2003.) općenito dijele biljne antioksidativne sustave na: 1. antioksidanse topljive u lipidima i vezane za membrane kao što su α-tokoferol i β-karoten, koji direktno „gase“ slobodne radikale lipidne peroksidacije (tripletni klorofil i $^1O_2$); 2. vodotopljive antioksidanse poput glutationa i askorbata koji sudjeluju u detoksikaciji $\bullet O_2^-$ i H_2O_2; 3. enzimske antioksidanse: superoksid-dismutaza (SOD; EC 1.15.1.1), katalaza (CAT; EC 1.11.1.6), peroksidaze (POX; EC 1.11.1.7) i enzime askorbat-glutation ciklusa. Aktivacijom pojedinih ili svih tih sustava, biljni organizmi su različito sposobni prevladati oksidacijski stres. Pored navedenih, neke dodatne komponente poput osmolita (osmoprotektanata), antocijanina i nekih proteina mogu također neutralizirati ROS (**Blokhina, 2000.**; **Wang i sur., 2003.**).

Askorbinska kiselina (vitamin C) ima velik utjecaj na stanične funkcije, od temeljnih procesa poput stanične diobe do zaštite od okolišnog stresa (**Conklin, 2001.**). Svojstva askorbata, kao često zastupljenog metabolita u biljkama s ključnim ulogama u razvoju i toleranciji stresa ističu i **Millar i sur. (2003.)**. Značaj askorbata proizlazi iz njegovog svojstva da može neutralizirati različite oblike ROS, poput superoksidnog aniona, singletnog kisika i vodikovog peroksida (**Blokhina, 2000.**). Biljne stanice, prema **Noctor i Foyer (1998.)**, sadrže velike količine askorbata (10 - 100 mmol) i glutationa (1 - 10 mmol). Međutim, pri visokim koncentracijama i u prisustvu metalnih iona askorbat može djelovati i kao pro-oksidans (**Halliwell, 1996.**; **Smirnoff, 2005.**). Poznato je da glutation (GSH) doprinosi obnavljanju reduciranog oblika askorbata neenzimskom redukcijom dihidro-askorbata pri alkalnom pH (**Noctor i Foyer, 1998.**). **May i sur. (1998.)** ocjenjuju da glutation djeluje kao direktna poveznica između okolišnog stresa i velikog broja ključnih prilagodbi koje su biljke razvile. Taj snažni stanični reducens ima širok raspon djelovanja. Zahvaljujući redoks aktivnoj tiolskoj skupini GSH može sudjelovati u regulaciji staničnog ciklusa, a i kao zaštitna komponenta u uvjetima oksidacijskog stresa, između ostalog i neutralizacijom peroksida. Kako je to neproteinski tripeptid u čijem je sastavu sumpor, ujedno ima značaj u uskladištenju i transportu reduciranog oblika sumpora (**May i sur., 1998.**; **Tausz i sur., 2004.**). Smatra se da taj vodotopljivi, niskomolekularni antioksidans u početnoj fazi stresa mijenja svoj redoks status, dok je faza aklimatizacije na stres obilježena povećanjem njegove koncentracije u reduciranom obliku i pojačavanjem aktivnosti određenih enzima. **Tausz i sur. (2004.)** ističu da je sustav glutationa vrijedan stresni marker u ekofiziološkim istraživanjima, a **Foyer i sur. (2002.)** ga smatraju najvažnijim i najzastupljenijim niskomolekularnim tiolom u biljkama. Ciklična konverzija reduciranog (GSH) i oksidiranog oblika glutationa (GSSG) je, prema navedenim autorima, presudna za obrambene procese u stanici.

Kada su u pitanju enzimski mehanizmi obrane od oksidacijskog stresa, najčešće se spominje SOD koja superoksid radikal prevodi u vodikov peroksid (**Noctor i Foyer, 1998.**; **Wang i sur., 2009.**), nakon čega se u neutralizaciju istog uključuje više enzima. Poznata su tri razreda SOD koji se razlikuju po svojim metalnim kofaktorima: Cu, Mn ili Fe i Zn (**Pellinen, 2001.**). MnSOD je lokalizirana u mitohondrijima, FeSOD u plastidima, a CuZnSOD u plastidima i citoplazmi. Katalaza razlaže vodikov peroksid do vode i kisika (**Noctor i Foyer, 1998.**; **Pellinen, 2001.**; **Wang i sur., 2009.**). Prema **Gill i**

Tuteja (2010.), jedna molekula CAT može razgraditi više od $6x10^6$ molekula H_2O_2 u vodu i kisik u minuti. Katalaza uklanja peroksid stvoren oksidazama uključenim u β-oksidaciju masnih kiselina, fotorespiraciju i katabolizam purina. Peroksidaze reduciraju H_2O_2 do vode koristeći različite supstrate kao donore elektrona, nalaze se u svim dijelovima stanice i imaju veći afinitet prema H_2O_2 nego CAT (**Pellinen, 2001.**). U slučaju askorbat-peroksidaze (APX) donor elektrona je askorbat (**Wang i sur., 2009.**; **Gill i Tuteja, 2010.**). Zajedno s glutation-reduktazom (GR), APX omogućuje uspješno neutraliziranje peroksida u askorbat-glutation ciklusu (**van Heerden i Krüger, 2002.**; **Kranner i Seal, 2013.**), kao i „voda-voda" ciklusu (**Gill i Tuteja, 2010.**). Ovaj enzim djeluje u suradnji s dehidroaskorbat-reduktazom, glutationom i glutation-reduktazom, uz učešće NADPH kao donora redukcijskih ekvivalenata (**Blokhina, 2000.**). Prema **Sharma i Dubey (2004.)**, APX štiti stanice od H_2O_2 u normalnim kao i u stresnim uvjetima. Autori ističu da je povećanje aktivnosti APX u reakciji na okolišni stres poput suše, visoke i niske temperature, toksičnosti metala i solnog stresa i dr., utvrđeno kod različitih biljnih vrsta. APX se razlikuje od gvajakol-peroksidaze (GPOX) prema razlikama u sekvenci i fiziološkim funkcijama (**Gill i Tuteja, 2010.**). Autori navode da GPOX razgrađuje indol-3-octenu kiselinu (auksin) i ima ulogu u sintezi lignina te obrani od oksidacijskog stresa razgradnjom H_2O_2. Ovaj enzim pripada peroksidazama razreda III. Biljne peroksidaze ovog razreda imaju velik broj izoformi i različito reguliranu ekspresiju, a uključene su u brojne stanične procese tijekom razvoja biljaka te u odgovor biljaka na stresne okolišne činitelje (**Passardi i sur., 2005.**). Glutation-reduktaza je flavo-proteinska oksidoreduktaza koja ima esencijalnu ulogu u obrani od ROS putem održanja reduciranog oblika glutationa (**Gill i Tuteja, 2010.**), iz glutation disulfida (GSSG). U zelenim tkivima aktivnost GR je prisutna uglavnom u kloroplastima, iako su utvrđene izoforme ovog enzima i u citoplazmi te u mitohondrijima (**Pellinen, 2001.**).

Bohnert i sur. (1995.) smatraju da, iako se biljne vrste razlikuju u osjetljivosti i reakciji na pad vodnog potencijala izazvan sušom, niskom temperaturom ili visokom zaslanjenosti, može se pretpostaviti da sve biljke imaju kodiranu sposobnost percepcije stresa, prijenosa signala i reakcije. Biljke se mogu braniti od sušnog stresa mehanizmom nazvanim osmotska regulacija. U tom procesu, biljke povećavaju svoj stanični osmotski potencijal akumulacijom otopljenih tvari. Sintetiziraju se različiti spojevi, koji imaju glavnu ulogu u održavanju osmotske ravnoteže i zaštite strukture membrana i

makromolekula (**Mahajan i Tuteja, 2005.**). Kao rezultat akumulacije netoksičnih (stoga kompatibilnih) osmotski aktivnih komponenata, dolazi do ulaska vode u stanice ili bar smanjenja njenog gubitka, kako bi se osigurao turgor (**Hare i sur., 1998.**; **Botela i sur., 2005.**; **Verslues i sur., 2006.**). Važnost tog mehanizma sprječavanja dehidracije proizlazi iz činjenice da sve stanične strukture moraju funkcionirati u vodenoj sredini te da je bitna sposobnost stanica da zadrže integritet membrana i spriječe denaturaciju proteina. Biosinteza i akumulacija kompatibilnih osmolita je bitan adaptacijski mehanizam koji omogućuje zaštitu staničnog turgora, očuvanje vodnog potencijala stanica te stabilizacije membrana kao i/ili neutralizacije ROS (**Ashraf i Foolad, 2007.**; **Reguera i sur., 2012.**; **De Cruz i sur., 2013.**). Akumulacija osmoprotektanata je samo jedno od brojnih svojstava odnosno specifičnosti tolerantnosti na stres koje se mogu naći u prirodi (**Rathinasabapathi, 2000.**). Prema **Silvente i sur. (2012.)**, tip osmoprotektanta i njegovo relativno učešće u snižavanju osmotskog potencijala se značajno razlikuju ovisno o biljnoj vrsti. Kompatibilni osmoliti su komponente male molekulske mase, visoke topljivosti i uobičajeno netoksični pri visokim koncentracijama (**Ashraf i Foolad, 2007.**). Kako neki od tih spojeva štite stanične komponente od oštećenja uslijed dehidracije, obično ih se naziva osmoprotektantima. Jedna od najčešćih reakcija na abiotski stres je akumulacija slobodnog prolina (**Špoljarević i sur., 2011.**), koji omogućava biljkama da prežive kraći period suše te da se oporave od sušnog stresa (**Shehab i sur., 2010.**). Glicin-betain i prolin su kompatibilni osmoliti koji se akumuliraju u različitim biljnim vrstama kao odgovor na stresne uvjete u okolišu. Obje molekule imaju pozitivan učinak na enzime i integritet membrana te su značajne u osmotskoj prilagodbi biljaka na različite stresne činitelje. **Szabados i Savouré (2010.)** navode da je prolin proteinogena aminokiselina s izuzetnom konformacijskom čvrstoćom i da je esencijalan za primarni metabolizam biljaka. Međutim, autori ističu da korelacija između akumulacije prolina i tolerantnosti na abiotski stres nije uvijek jasna. Unatoč brojnim istraživanjima u kojima se pretpostavlja zaštitna uloga osmoprotektanata u različitim vrstama stresa koji izazivaju dehidraciju, **Serraj i Sinclair (2002.)** također smatraju da istraživanja na otvorenom ne pokazuju konzistentne rezultate u korist pozitivne veze između osmotske prilagodbe i prinosa usjeva.

Koncentracije prolina u stanicama su određene njegovom biosintezom, katabolizmom i transportom između stanica kao i različitih staničnih dijelova. Iako se uloga prolina već

dugo istražuje, u velikom broju biljnih vrsta (**Kavi Kishor i sur., 2005.**), prema **Szabados i Savouré (2010.)** još uvijek nema dovoljno spoznaja o signalnim putovima uključenih u njegovu regulaciju, te kako metabolizam prolina stabilizira staničnu homeostazu. Autori pretpostavljaju da nije ključan sam sadržaj prolina, već da je povećan intenzitet njegove biosinteze bitan činitelj adaptacije na stres. **De Ronde i sur. (2004.)** također smatraju da su procesi metabolizma prolina možda važniji od same koncentracije za adaptaciju biljaka na stres, kroz utjecaj na održavanje kritičnih razina $NADP^+$. U mnogim biljnim vrstama je dokazana vrlo visoka akumulacija prolina (do 80% od ukupnog sadržaja aminokiselina u stresnim uvjetima za razliku od 5% u normalnim uvjetima) uslijed povećane sinteze i smanjene razgradnje, u različitim stresnim uvjetima poput suše i solnog stresa (**Kavi Kishor i sur., 2005.**). **Posmyk i Janas (2007.)** izvješćuju da egzogena primjena prolina štiti klijance od lipidne peroksidacije, vjerojatno stabilizira membrane pri hladnom stresu, pri čemu dodani prolin može poslužiti kao izvor dušika i ugljika, poboljšavajući rast i regeneraciju klijanaca. U tilakoidima kloroplasta prolin može spriječiti lipidnu peroksidaciju sekvestracijom i/ili smanjenjem produkcije singletnog kisika (**Alia i sur., 1997.**). **Claussen (2005.)** smatra da je prosječna koncentracija prolina u listu rajčice akumulirana tijekom reproduktivnog rasta pokazatelj stresa kojem je biljka bila izložena u tom razdoblju, te tvrdi da se akumulacija prolina ne događa ukoliko nije prekoračena određena razina stresa. Na temelju tih saznanja, autor smatra da bi indikatori stresa poput prolina mogli biti sve značajniji u istraživanjima utjecaja razine stresa na produktivnost i kakvoću kulturnih biljaka. Prema **Ashraf i Foolad (2007.)**, akumulacija prolina pri stresu je kod mnogih biljnih vrsta u korelaciji s tolerancijom stresa, a njegova koncentracija je dokazano viša u biljkama tolerantnim na stres, u usporedbi s osjetljivim biljkama. **Nanjo i sur. (1999.)** potvrđuju učešće akumuliranog prolina u toleranciji stresa kod viših biljaka i smatraju da konstitutivna akumulacija prolina uslijed inhibicije njegove degradacije može biti obećavajući pristup u kreiranju biljaka tolerantnih na solni stres. Prema **Brugière i sur. (1999.)** regulacija metaboličkih putova sinteze prolina može biti kontrolirana putem raspoloživosti glutamina u specijaliziranim staničnim strukturama kao što je floem, a razjašnjenje signalnih putova koji reguliraju stresom induciranu akumulaciju prolina **Hare i sur. (1999.)** smatraju potencijalno značajnim za temeljna i primijenjena istraživanja tolerancije stresa kod biljaka. **Kocsy i sur. (2004.**; **2005.)** ističu da prolin i glutation imaju zajednički prekurzor (glutamat), stoga stresom inducirane promjene razine prolina mogu utjecati na sadržaj glutationa.

Kao naročito značajan mehanizam obrane od okolišnog stresa u mitohondrijima se ističe inhibicija oksidacije prolina (**Soccio i sur., 2010.**).

Fenoli su izuzetno brojna i vrlo raznolika skupina sekundarnih biljnih metabolita. Različiti fenoli imaju različite uloge poput obrane biljke od herbivornih kukaca i gljiva, zaštite od UV zračenja, redukcija rasta drugih biljaka i dr. (**Pevalek-Kozlina, 2003.**) a smatra se da imaju važnu ulogu i u obrani od abiotskog stresa. Prema **Rasheed (2009.)** fenoli su najzastupljenija skupina sekundarnih metabolita, u koju pripadaju flavonoidi, lignin, antocijanini i dr. Polifenoli imaju idealnu strukturu za neutralizaciju slobodnih radikala (**Blokhina, 2000.**), i dokazano je da mogu biti učinkovitiji antioksidansi *in vitro* u usporedbi s tokoferolom i askorbatom. Autorica objašnjava njihova antioksidativna svojstva kroz vrlo visoku reaktivnost kao donora vodika i elektrona, sposobnost njihovih derivata da stabiliziraju i dislociraju nespareni elektron *(„chain-braking function"*), te sposobnost kelatiranja iona prijelaznih metala, odnosno blokiranje Fentonove reakcije. Povećanje sadržaja fenola pod utjecajem različitih oblika abiotskog stresa je uočeno u brojnim istraživanjima, poput **Rivero i sur. (2001.)** i **Bellaloui (2012.)**. Prema **Shetty (2003.)**, sinteza fenolnih metabolita u biljkama se može tumačiti alternativnim oblikom metabolizma povezanim sa sintezom prolina preko pentozo-fosfatnog puta. Autor smatra da biosinteza prolina stimulira sintezu $NADPH_2$ i šećernih fosfata za anaboličke putove uključujući sinteze fenolnih spojeva i različitih antioksidanata. **Moore i sur. (2008.)** ističu ulogu fenola i lignifikaciju stanične stjenke u uvjetima suše, i smatra da promjene njene elastičnosti i prilagodljivosti mogu biti značajan fenomen u adaptaciji biljaka.

2.4. Osmotski, sušni, solni i temperaturni stres

Značajne promjene vodnog potencijala u okolišu mogu dovesti do osmotskog stresa u biljkama koji remeti normalne stanične aktivnosti te može prouzročiti čak i smrt biljke (**Xiong i Zhu, 2002.**; **Peñalosa-Barbero, 2004.**). Osmotski stres uslijed nedovoljne količine vode se javlja već u fazi klijanja sjemena. U toj fazi, sjeme soje treba apsorbirati vode više od 50% od svoje mase da bi moglo klijati (**Vratarić i Sudarić, 2007.**). Faza klijanja je naročito osjetljiva na solni učinak dušičnih gnojiva, posebno u relativno suhom tlu (**Zheng i sur., 1998.**). **Swigonska i Weidner (2013.)** također ističu da je učinak bilo kojeg stresa naročito vidljiv u klijanju koje je kompleksan proces, vrlo

ovisan o brojnim činiteljima uključujući temperaturu, sadržaj vode i dr. Navedene okolišne činitelje **Gorai i Neffati (2007.)** također spominju, ističući da je njihov utjecaj na klijanje istovremen, i da se izostanak klijanja u zaslanjenom tlu može objasniti visokim koncentracijama soli u zoni sjemena u tlu, koje se javljaju uslijed kretanja otopine tla prema gore i evaporacije na površini tla. **Wang i sur. (2009.)** smatraju da je klijanje normalno ograničeno povećanim abiotskim stresom poput visoke zaslanjenosti i suše. To su ujedno i glavni uzroci osmotskog stresa u biljkama u prirodnim uvjetima (**Wood, 2005.**). Više od 35% svjetske kopnene površine se smatra aridnim ili semiaridnim uslijed nedovoljnih količina oborina za većinu poljoprivrednih aktivnosti**.** U područjima ugroženim sušom prinosi mogu biti smanjeni i više od 50%. Stoga autor naglašava da je razumijevanje kako biljne stanice podnose gubitak vode bitan preduvjet za razvoj strategija koje mogu poboljšati produktivnost usjeva u poljoprivredi i hortikulturi, odnosno preživljavanje u uvjetima nedovoljne raspoloživosti vode. **Lea i sur. (2005.)** i **Parry i sur. (2005.)** ističu da su mediteranske zemlje naročito ugrožene zbog nedostatka vode. Autori navode da poljoprivreda sudjeluje sa 75% ukupne potrošnje vode i da je suša glavno ograničenje za uzgoj mnogih usjeva. Također, navode da je molekularnim pristupima identificiran velik broj gena koji se aktiviraju izlaganjem biljaka sušnim ili zaslanjenim uvjetima. Potencijalni kandidati gena za manipulaciju kod biljaka, da bi se stvorili genotipovi otporniji na sušni i solni stres, pripadaju skupinama transkripcijskih faktora, kompatibilnih osmolita, antioksidansa i detoksikacijskih enzima, ionskih prenositelja, HSP (*„heat shock"*) i LEA (*„late embryogenesis abundant"*) proteina. Genetsko poboljšanje usjeva za adaptaciju na sušu je, prema **Reynolds i sur. (2005.)**, vjerojatno najveći izazov u oplemenjivanju biljaka zbog složenosti sušnog okoliša. Poboljšani usjev bi trebao biti prilagođen suši i ostvarivati zadovoljavajuće visok prinos. U takvim stresnim uvjetima, u biljkama se pokreću različite reakcije na molekularnoj i staničnoj razini te razini cijele biljke, poput promjena u životnom ciklusu, morfoloških prilagodbi u razvoju korijena i izdanka, prilagodbe ionske ravnoteže te modifikacija metabolizma ugljikohidrata i sinteza kompatibilnih osmolita (**Peñalosa-Barbero, 2004.**). **Xoconostle-Cázares i sur. (2010.)** dijele strategije kojima se biljka brani od deficita vode na fiziološke, biokemijske i molekularne, te daju pregled saznanja o prijenosu signala, indukciji gena na razini transkripata, sušom induciranim proteinima i oksidacijskom stresu uslijed suše. Pored glavnih metoda oplemenjivanja na tolerantnost prema suši, autori ukratko opisuju najznačajnija postignuća u poboljšanju nekoliko najvažnijih poljoprivrednih kultura

poput soje, dok **Ashraf (2010.)** daje pregled suvremenih metoda genetskog inženjeringa kada je u pitanju otpornost na sušu. **Setter (2012.)** ističe da istraživači imaju na raspolaganju širok raspon analitičkih metoda za mjerenje metabolita, transkripata i proteina u biljnim tkivima, i da ta „pomagala“ potencijalno pomažu genetskim istraživanjima, gdje se fenotipizacijom traže genetičke linije za nasljedna svojstva koja doprinose tolerantnosti na sušu. Fenotipizaciju kao pristup u razjašnjavanju tolerancije na sušu u eri genomike prikazuje i **Tuberosa (2012.)**. Ocjenu postignutog primjenom genetskog inženjeringa u poboljšanju produktivnosti biljaka pri suši, ograničenja i daljnje mogućnosti također daju **Umezawa i sur. (2006.)** te **Lawlor (2012.)**.

Prema **Verslues i sur. (2006.)**, u poljskim uvjetima je suša povezana s drugim stresovima u biljci poput temperaturnog, svjetlosnog ili stresa mineralne ishrane. Međutim, stresna komponenta koja definira sušni stres je pad pristupačnosti vode u tlu. Deficit vode u biljkama nastaje kada je transpiracija veća od usvajanja vode i može biti komponenta različitih tipova stresa, uključujući sušu, zaslanjenost i nisku temperaturu (**Bray, 1997.**). U sušnim uvjetima dolazi do zatvaranja puči, što smanjuje pristupačnost CO_2, dok se svjetlom inicirani transport elektrona neometano odvija visokim intenzitetom. Preopterećenje transportnog lanca elektrona i inhibicija tamne faze fotosinteze nedostatkom CO_2 dovodi do pojave ROS, prijenosom viška elektrona na kisik (**Tausz i sur., 2004.**; **Osakabe i sur., 2014.**). Na taj način su sušni i fotooksidacijski stres međusobno povezani. U istraživanju **Toorchi i sur. (2009.)** sušni stres je rezultirao povećanom akumulacijom ROS i lipidnom peroksidacijom u soji. Proteomskom analizom utvrđen je velik broj proteina soje uključenih u stanične funkcije, poput metabolizma ugljikohidrata i dušika, osmotske prilagodbe, modifikacije stanične stjenke, prijenosa signala, obrane i programiranog odumiranja stanica, koji doprinose molekularnim mehanizmima tolerancije suše kod soje. Međutim, navedeni autori smatraju, kao i **Phang i sur. (2011.)**, da je razumijevanje osmotskog stresa u biljkama, naročito kod soje, još uvijek nedovoljno. **Kokubun (2004.)** navodi kako stres kod soje uslijed pomanjkanja vode prije formiranja cvijeta, inicira značajnije opadanje cvijeta u odnosu na kontrolu te objašnjava kako je fotosintetska stopa listova biljaka pod stresom izrazito niska u odnosu na dobro navodnjavane biljke. Autor zaključuje da se smanjenjem koncentracije produkata fotosinteze smanjuje raspodjela asimilata u cvjetove, što uzrokuje njihovo odbacivanje. Različite aspekte reakcije soje na sušni stres prikazuju istraživanja poput **Figueiredo i sur. (1997.)**, **Sakthivelu i sur. (2008.)**, **He (2008.)**, **Ishibashi i sur. (2011.)**, **Kobraei i sur. (2011.)**, **Makbul i sur. (2011.)**,

Masoumi i sur. (2011.), **Stolf-Moreira i sur. (2011.)**, **Neves-Borges i sur. (2012.)**, **Ghiyasi i Tajbakhsh (2013.)** i dr.

Širom svijeta poljoprivredna proizvodnja može biti ugrožena zbog povećane zaslanjenosti tla, uslijed neodgovarajućih poljoprivrednih aktivnosti i klimatskih promjena. Prirodna zaslanjenost tla je posljedica prirodnih procesa destrukcije stijena i soli dospjelih u tlo kišom, a podrijetlom iz mora (**Tester i Davenport, 2003.**; **Reynolds i sur., 2005.**). Sekundarna salinizacija je izazvana navodnjavanjem i predstavlja najstariji okolišni problem čovječanstva (**Reynolds i sur., 2005.**). Autori navode da je koncentracija soli u kišnici oko 10 - 30 mg l^{-1}, a voda za navodnjavanje dobre kvalitete može sadržavati i do 500 mg l^{-1}. Iako je zaslanjenost globalni problem, najizraženiji je u sušnim i polusušnim područjima gdje je prosječna količina oborina manja od evapotranspiracije. Autori smatraju da prije isticanja fizioloških svojstava direktno povezanih s tolerancijom zaslanjenosti treba definirati razinu zaslanjenosti kojoj su suvremeni usjevi prilagođeni. Leguminoze uvrštavaju među najosjetljivije na solni stres i navode da je njihova letalna granica na razini koncentracije 100 mM NaCl ili 10 dS m^{-1}. **Mahajan i Tuteja (2005.)** smatraju solni stres glavnim okolišnim stresom i značajnom prijetnjom biljnoj proizvodnji. Kao naročito osjetljive biljne vrste, poznate kao glikofite, autori navode rižu, kukuruz, soju i grah. **Nouri i sur. (2011)** soju smatraju relativno osjetljivom na solni stres, dok ju **Xu i sur. (2011.)** svrstavaju među osjetljive kulture, a **Ghassemi-Golezani** i **Taifeh-Noori (2011.)** ističu da razina osjetljivosti ovisi o kultivaru. **Shavrukov (2013.)** smatra da su solni stres i solni šok dva razdvojena fenomena, doduše oba izazvana prisustvom soli. Međutim, ovi pojmovi se često nekorektno koriste u literaturi, bez uvažavanja njihovog preciznog značenja. Autor naglašava da solni stres treba istraživati primjenom rastućih i/ili niskih koncentracija NaCl, dok solni šok izazvan naglim dodatkom soli izaziva plazmolitički/osmotski šok, pri kojem je ekspresija gena drugačija nego kod postupnog solnog stresa.

Solni stres je složen proces koji uključuje osmotski stres, učinak specifičnih iona i nedostatak pojedinih hraniva, stoga utječe na brojne fiziološke i biokemijske mehanizme povezane s rastom i razvojem biljke (**Sairam, 2002.**). **Ashraf i Harris (2004.)** navode da unatoč velikom broju objavljenih istraživanja o toleranciji biljaka na zaslanjenost, još nije dovoljno jasno koja su to mjesta u metabolizmu gdje dolazi do oštećenja biljaka niti su jasni mehanizmi adaptacije. **Kranner i Seal (2013.)** smatraju da

je iznenađujuće malo poznato o učinku solnog stresa na sjeme, obzirom na njegovu presudnu ulogu u razmnožavanju i rasprostiranju biljaka, te objašnjavaju tri-fazni koncept stresa u sjemenu tolerantnih biljaka, koji se sastoji od faza *„alarm“*, *„resistance“* i *„exhaustion“*. Solni stres se kod biljaka temelji na kombinaciji dva temeljna oblika fiziološkog stresa: osmotski - manja pristupačnost vode uslijed povećane koncentracije soli u tlu, supstratu ili hranjivoj otopini te ionski - akumulacija iona koji u većim koncentracijama mogu djelovati toksično za biljke, odnosno poremetiti usvajanje drugih hraniva (**Stanisavljević i sur., 2009.**). **Peñalosa-Barbero (2004.)** objašnjava da visoke koncentracije soli dovode do ionske neravnoteže i hiperosmotskog stresa u biljkama. Kao posljedica se javlja sekundarni stres u obliku oksidacijskih oštećenja. Biljni mehanizam za povećanje tolerancije na taj činitelj podrazumijeva ponovno uspostavljanje ionske homeostaze, uz sprječavanje usvajanja ili smanjenje razine Na^+ u citoplazmi. Autor naglašava potrebu za osmotskom komponentom i sintezu apscizinske kiseline, kao efekt koji se javlja i nakon dehidracije te pri temperaturnom stresu.

Botella i sur. (2005.) među glavne mehanizme adaptacije biljaka na solni stres ubrajaju: procese unutarstanične ionske homeostaze, prolaz Na^+ kroz staničnu membranu, uskladištenje i ograničenje Na^+ i Cl^- u vakuoli, selektivnu akumulaciju K^+ i Na^+, regulaciju Na^+ homeostaze u korijenu i izdanku, sposobnost prepoznavanja i regulatorne putove koji kontroliraju ionsku homeostazu, reakciju na oštećenja i antioksidativnu zaštitu. Također, navode da s izuzetkom K^+, većinu kompatibilnih osmolita čine organske komponente. Opsežan pregled mehanizama, metabolita i prijenosa signala u biljkama pod utjecajem solnog stresa dali su **Hasegawa i sur. (2000.)**. Značaj signalnih putova i bifunkcionalnu ulogu ROS u modifikaciji metabolizma i odgovoru na solni stres analiziraju **Ismail i sur. (2014.)**. U mnogim istraživanjima utjecaja solnog stresa na biljke utvrđena je povećana koncentracija prolina u biljnim tkivima. **Ramana i sur. (2012.)** su kod soje utvrdili povećan sadržaj prolina i glicin-betaina, te razlike u otpornosti na solni stres između ispitivanih kultivara. U istraživanju **Aghaei i sur. (2009.)**, na najvišoj razini solnog stresa, utvrđena je pet puta veća razina slobodnog L-prolina u odnosu na kontrolu. Također, veću koncentraciju prolina te smanjenje aktivnosti SOD, CAT i POX u listovima ovisno o koncentraciji natrijevog klorida utvrdio je **Amirjani (2010.)**. Reakciju soje na solni stres istraživali su i **Hilal i sur. (1998.)**, **Kao i sur. (2005.)**, **Luo i sur. (2005.)**, **Blanco i sur. (2007.)**, **Campestre i sur.**

(2011.), **Doğan (2011.)**, **Xu i sur. (2011.)**, **Im i sur. (2012.)**, **Kondetti i sur. (2012.)**, **Dong i sur. (2013.)**, **Dinler i sur. (2014.)** i dr.

Zaslanjenost može utjecati na rast biljaka na više načina (**Munns, 2002.**). U prvoj fazi reakcije rasta biljke reagiraju na osmotsku komponentu soli u otopini tla, uz pojavu niza efekata identičnih vodnom stresu uslijed suše. Kasnije se može pojaviti dodatni utjecaj na rast, poput senescencije starijih listova koji su duljim razdobljem transpiracije akumulirali sol do toksičnih razina. Posljedično je smanjen kapacitet asimilacije i smanjenje transporta asimilata u rastuća tkiva. Autor ističe da ta faza jasno razdvaja vrste i genotipove po sposobnosti tolerancije zaslanjenog tla. **Pathan i sur. (2007.)** smatraju da je genetsko poboljšanje soje na solni i osmotski stres ekonomski isplativo jer navodnjavanje i melioracije nisu ekonomski održive opcije u uzgoju soje. Međutim, uspješnost selekcijskih programa je ograničena nedostatkom jasnog razumijevanja genetske osnove tolerantnosti na solni stres (**Chinnusamy i Zhu, 2003.**; **Chinnusamy i sur., 2005.**). Poboljšanje tolerantnosti usjeva na solni stres konvencionalnim oplemenjivačkim programima je imalo, uslijed kompleksnosti svojstava, vrlo ograničen uspjeh, jer je tolerantnost na zaslanjenost genetski i fiziološki složena (**Flowers, 2003.**). Autor navodi da tolerantnost često pokazuje karakter multigenetskog svojstva, sa specifičnim QTL utvrđenim za ječam, citruse, rižu i rajčicu. **Ma i sur. (2006.)** navode da, nakon izlaganja stresu, *Arabidopsis* (uročnjak) mobilizira kompleksni set putova koji reguliraju ekspresiju gena i metaboličke prilagodbe koje pokušavaju uspostaviti novu energetsku i razvojnu ravnotežu. Manje od 25% reguliranih gena su solno-specifični, dok većina reagira i na druge tipove stresa, što govori u prilog saznanjima o povezanosti između metaboličkih odgovora na različite tipove stresa.

Dobrá i sur. (2010.) smatraju da su dominantni činitelji abiotskog stresa suša i visoka temperatura. Kako uopće biljke „osjećaju“ odnosno „prepoznaju“ temperaturu, objašnjavaju **Sung i sur. (2003.)** i **Ruelland i Zachowski (2010.)**. Biljke su razvile različite mehanizme za uspijevanje pri visokim temperaturama (**Rasheed, 2009.**), koji uključuju kratkoročne mehanizme izbjegavanja/aklimatizacije kao i dugoročne evolucijske prilagodbe. **Larkindale i sur. (2005.)** također objašnjavaju da se adaptacija ili aklimatizacija biljaka na visoke temperature događa u različitim vremenskim rasponima i razinama biljne organizacije. Izloženost biljaka visokim temperaturama može biti dugotrajna (u toplijim staništima) ili akutna uslijed sezonskih ili dnevnih temperaturnih ekstrema. Autori tumače da *„heat stress“*, a samim tim i *„heat*

tolerance" nisu pojedinačni fenomeni nego se radi o setu kompleksnih promjena homeostaze organizma. Na staničnoj razini visoka temperatura mijenja svojstva lipida, što čini membrane fluidnijima i dovodi do poremećaja membranskih procesa. Promjene enzimske aktivnosti utječu na metaboličke putove, a može doći i do denaturacije proteina, i uslijed svega navedenog, do oksidacijskog stresa. **Nouri i sur. (2011.)** ističu da je soja usjev osjetljiv na visoku temperaturu i u vegetativnim i u reproduktivnim fazama razvoja, te da stres zbog visoke temperature smanjuje ekspresiju proteina bitnih za primarnu asimilaciju ugljika, Kalvinov ciklus, fotosustave I i II i transport elektrona. Temperaturne promjene kojima su biljke izložene mogu imati za posljedicu poremećaj njihove sposobnosti da iskoriste apsorbiranu svjetlosnu energiju za fotokemijski rad, što dovodi do prekomjerne redukcije elektron-transportnog lanca (**Huner i sur., 1998.**), a što može dovesti do fotoinhibicije fotosustava II (PS II) i povećanog stvaranja kisikovih radikala (**Asada, 1994.**). U kloroplastima postoji dinamička ravnoteža između oštećenja i popravke elektron transportnog lanca. Kada je brzina kojom se fotokemijski sustav oštećuje veća od brzine kojom se on regenerira, dolazi do fotoinhibicije koja se ogleda u smanjenju odnosa između maksimalne i varijabilne fluorescencije (Fv/Fm). Upravo zato do izbjegavanja fotoinhibicije može doći ili smanjivanjem brzine kojom se fotosustav oštećuje ili povećanjem brzine njegove regeneracije (**Melis, 1999.**). Omjer Fv/Fm daje procjenu maksimalne učinkovitosti PS II za iskorištenje kvanta svjetlosti (**Butler, 1978.**) i naširoko se koristi za otkrivanje poremećaja u fotosintetskom aparatu pod utjecajem različitih vrsta stresa (**Agati i sur., 1996.**). Inaktivacije PS II i dezorganizacija tilakoida se smatraju ključnim obilježjima stresa izazvanog visokim temperaturama, koje prati nagli porast F_0 koja je zavisna od temperature i ukazuje na kritičnu temperaturu za inaktivaciju PS II (**Havaux, 1993.**). **Larkindale i sur. (2005.)** navode da se fotosinteza smanjuje već na temperaturama dosta nižim od letalnih za biljku, iako sam mehanizam kojim se to odvija ostaje kontroverzan. Najosjetljivija komponenta fotosintetskog aparata je fotosustav II. Međutim, potrebno je daljnje istraživanje činitelja koji limitiraju fotosintezu pri visokoj temperaturi.

Zaštitnu ulogu antioksidativnih enzima u uvjetima stresa zbog visoke temperature kod pšenice analiziraju **Almeselmani i sur. (2006.)**, dok **Kotak i sur. (2007.)** objašnjavaju ulogu *„heat shock"* proteina i ističu značaj sprječavanja oksidativnog stresa. **Nouri i sur. (2011.)** smatraju da je, izuzev nekoliko izoliranih istraživanja, premalo pažnje posvećeno analizi sojinog proteoma kod visoke temperature i, s obzirom na rastuću

opasnost od globalnog zatopljenja, trebalo bi proširiti spoznaje o biljnim mehanizmima obrane ili tolerancije na visoku temperaturu. Vrlo detaljan pregled različitih aspekata otpornosti biljaka na visoku temperaturu su dali **Wahid i sur. (2007.)**.

Kada je u pitanju stres uslijed niske temperature, općeniti pojam „cold stress" se može podijeliti na dva povezana fenomena - *„chilling stress"* i *„freezing stress"* (**Verslues i sur., 2006.**). Izlaganje hladnoći može mijenjati strukturu membrana uslijed lipidne peroksidacije, metaboličkih modifikacija, promjena u proteinskom sastavu i aktivnostima enzima, staničnog istjecanja elektrolita i aminokiselina, promjenama toka elektrona prema alternativnim putovima i na mnoge druge načine (**Posmyk i Janas, 2007.**). Autori navode da tropske i suptropske biljke, poput soje, pokazuju značajne fiziološke i biokemijske disfunkcije pri izlaganju temperaturi nižoj od 10°C. Niske temperature usporavaju, a visoke ubrzavaju klijanje sjemena i razvoj listova. Zbog toga broj dana od sjetve do nicanja može varirati od 5 do 15 (**Vratarić i Sudarić, 2008.**). Utjecaj niske temperature na različite stadije reproduktivne faze zrnatih usjeva detaljno opisuju **Thakur i sur. (2010.)**. **Van Heerden i Krüger (2002.)** su proučavali učinke hlađenja i sušnog stresa na fotosintezu, nakupljanje prolina i metabolizam antioksidansa na dva kultivara soje. Svi tretmani su uzrokovali vidljive fiziološke i biokemijske učinke na fotosintezu. Istovremeno induciranje sušnog stresa i stresa hlađenjem, rezultiralo je sprječavanjem nakupljanja prolina, dok je induciranjem samo sušnog stresa dovelo do značajne akumulacije prolina. Kapacitet za nakupljanje prolina se pokazao kao važan faktor za toleranciju stresa. Uobičajen odgovor biljaka osjetljivih na niže temperature je brza inhibicija fotosinteze (**Ort, 2002.**), koja čak i pri umjerenom intenzitetu svjetla može imati za posljedicu usporavanje aktivnosti i fotooštećenje PS II. **Posmyk i sur. (2005.)** navode kako niske temperature utječu na postupno veći porast produkata lipidne peroksidacije u korijenu nego u hipokotilima soje, jer je u hipokotilima aktivnost CAT i SOD izraženija. Koncentracija genisteina u hipokotilima je bila značajno veća u odnosu na korijen te je redukcija rasta manje izražena u kraćim periodima niskih temperatura. Istraživanje utjecaja temperaturnog stresa na rajčicu i lubenicu pokazalo je da kod rajčice dolazi do toplotnog stresa pri 35°C, a kod lubenice je pri 15°C bila temperatura tzv. *„chilling"* stresa (**Rivero i sur., 2001.**). Kod obje biljne vrste temperaturni stres je smanjio težinu nadzemnog dijela, rezultirao akumulacijom topljivih fenola uz najveću aktivnost fenilalanin amonia-liaze te smanjio aktivnost peroksidaze i polifenol-oksidaze. Autori zaključuju da temperaturni stres

inducira akumulaciju fenola u biljkama, aktivacijom njihove biosinteze kao i inhibicijom njihove oksidacije, te pretpostavljaju da bi taj mehanizam mogao biti bitan za prilagodbu biljaka na temperaturni stres. **Nouri i sur. (2011.)** ističu hladnoću kao jedan od glavnih okolišnih stresova koji ograničavaju produktivnost usjeva, kakvoću i posliježetveni život (*„postharvest life"*). Dok većina biljaka umjerenog klimata razvije tolerantnost na hladnoću i smrzavanje i prije izlaganja hladnom stresu, mnoge biljke važne u poljoprivredi, poput soje, nisu sposobne za aklimatizaciju na hladnoću. Iako postoje analize proteoma soje koje pokazuju razlike u ekspresiji proteina soje pod utjecajem niske temperature, poput istraživanja **Cheng i sur. (2010.)**, **Nouri i sur. (2011.)** smatraju da mehanizmi koji smanjuju osjetljivost strukture i funkcije enzima pri hladnom stresu nisu dovoljno razjašnjeni. Temperaturni stres u soji istraživali su: **Gass i sur. (1996.)**, **Roskruge i Smith (1997.)**, **Burke (1998.)**, **Kocsy i sur. (2001.)**, **Vu i sur. (2001.)**, **Tambussi i sur. (2004.)**, **Van Heerden i Krüger (2004.)**, **Lanna i sur. (2005.)**, **Li i sur. (2009.)**, **Balestrasse i sur. (2010.)**, **Ohnishi i sur. (2010.)**, **Sun i sur. (2011.)** i dr.

Ahuja i sur. (2010.) ističu da se strategije prilagodbe biljaka na stres koordiniraju i fino podešavaju kroz prilagodbe rasta i razvoja te staničnih i metaboličkih aktivnosti. U razumijevanju fizioloških, staničnih i molekularnih mehanizama odgovora biljaka na stresne činitelje okoliša dosadašnjim istraživanjima je učinjen značajan napredak. Međutim, **Shao i sur. (2008.)** te **Wu i sur. (2007.)** smatraju da su molekularne informacije iz stanica, tkiva i organa viših biljaka jedan od najvećih izazova biljne biologije u 21. stoljeću. Istraživanja ključnih regulatornih mehanizama koji upravljaju biljnim odgovorima rasta pri nedostatku vode, na razini cijelog organizma, staničnoj i genomskoj razini, nastavljaju pružati nova saznanja (**Neumann, 2008.**). U skladu s tim, **Wang i sur. (2003.)** smatraju da sveobuhvatne oplemenjivačke strategije na tragu poboljšanja tolerancije abiotskog stresa trebaju sadržavati sljedeće korake i pristupe: 1. konvencionalno oplemenjivanje i selekcija germplazme, naročito divljih srodnika; 2. prepoznavanje specifičnih kontrolnih molekularnih mehanizama u tolerantnim i osjetljivim genotipovima; 3. biotehnološki-orijentirano poboljšanje selekcijskih i oplemenjivačkih procedura kroz analizu funkcionalne genomike, uporaba molekularnih proba i markera za selekciju između prirodnih i uzgajanih populacija; i 4. poboljšanje i prilagodba suvremene poljoprivredne prakse.

3. CILJ ISTRAŽIVANJA

Nove spoznaje o fiziološkim mehanizmima otpornosti, odnosno specifičnom odgovoru kultivara soje na abiotski stres, neophodne su zbog postizanja bolje adaptabilnosti soje na sve nepovoljnije uvjete uzgoja. Ovaj doktorski rad obuhvaća dvije etape istraživanja, a s obzirom na to da se željelo utvrditi fiziološki odgovor kultivara soje u kritičnim fenofazama, tj. u fazi klijanje-nicanje i u fazi cvatnje. Istraživanje je obuhvatilo šest kultivara soje, uz primjenu ukupno sedam eksperimentalnih varijanata. U fokusu istraživanja bili su sušni, temperaturni i solni stres.

Ciljevi provedenog istraživanja su:

1. utvrditi utjecaj razine sušnog, solnog i temperaturnog stresa na klijavost i razvoj klijanaca šest kultivara soje te utjecaj visokih i niskih temperatura na biljke dva kultivara soje u fazi cvatnje
2. utvrditi kako inducirani stres u soji u fazi klijanje-nicanje i fazi cvatnje utječe na specifične metabolite, odnosno dolazi li do pojave oksidacijskog stresa i koji se metabolički pokazatelji ističu kao indikatori stresa
3. utvrditi razlikuju li se ispitivani kultivari soje po vigoru sjemena, razvoju klijanaca i metaboličkoj reakciji u primijenjenim stresnim tretmanima
4. utvrditi fotosintetsku učinkovitost i razinu antioksidativnog odgovora u listu soje pod utjecajem visokih i niskih temperatura u fazi cvatnje
5. utvrditi aktiviraju li se obrambeni fiziološki mehanizmi utvrđeni u fazi klijanje-nicanje i u fazi cvatnje.

Ovaj doktorski rad se temelji na slijedećim hipotezama:

Kultivar soje koji ima dobar genetski potencijal otpornosti na stres trebao bi pokazati adekvatan odgovor na stres u smislu aktivacije fizioloških obrambenih mehanizama, a što pretpostavlja bolje podnošenje stresnih uvjeta i preživljavanje većeg broja biljaka u potencijalno stresnim uvjetima tijekom vegetacije. Pretpostavlja se da su interakcije genetske osnove, faze rasta i razvoja, odnosno razine stresa, presudne u aktivaciji pojedinih fizioloških mehanizama obrane na stres u biljci soje. Osmotski i solni stres se, u većoj ili manjoj mjeri, mogu regulirati antropogenim djelovanjem, ali stres izazvan visokim ili niskim temperaturama u poljskim uvjetima u potpunosti ovisi o klimatskim uvjetima. Pretpostavlja se da su temperaturni ekstremi izrazito važni stresni čimbenici za soju, kako u fazi klijanje-nicanje, tako i u fazi cvatnje.

4. MATERIJAL I METODE RADA

4.1. Opis eksperimenata

Kao model biljke za ovo istraživanje odabrano je šest kultivara soje (Lucija, Korana, Vita, Ika, Tena, Zora) proizvedenih na Poljoprivrednom institutu Osijek u 2010. godini. U Laboratoriju za određivanje kakvoće sjemena Poljoprivrednog instituta Osijek napravljeni su testovi o kakvoći sjemena te su rezultati prikazani u *Tablici 4.1.* (preuzeto iz Izvješća o kakvoći sjemena poljoprivrednog bilja 2011.).

Tablica 4.1. Rezultati iz izvješća o kakvoći sjemena poljoprivrednog bilja.

Kultivari	Energija klijanja (%)	Klijavost sjemena (%)	Nenormalni klijanci (%)	Ukupno neklijavo sjeme / mrtvo sjeme (%)
Lucija	71	80	8	1
Korana	65	81	18	1
Vita	46	80	17	3
Ika	68	75	4	21
Tena	66	81	12	7
Zora	73	84	12	4

Pokusi su postavljeni 2011. godine u dvije etape. U prvoj etapi istraživani su učinci tri tipa stresa (solni, osmotski/sušni i temperaturni stres) na klijancima u fenofazi klijanja i nicanja (*VE; Slika 4.3.*). Svaki ispitivani stresni tretman je postavljen u dvije razine (*Tablica 4.2.*). Solni stres je induciran 50 mM (π; 25°C = -0,24 MPa) i 100 mM (π; 25°C = -0,49 MPa) otopinom natrijeva klorida (NaCl). Osmotski stres induciran je 5% (π; 25°C = -0,0499 MPa) i 10% (π; 25°C = -0,148 MPa) otopinom polietilen glikola 6000 (PEG). Sjeme šest kultivara soje naklijavano je na filter papiru natopljenom navedenim otopinama tijekom 7 dana, u klima komori pri temperaturi od 20°C (*Slika 4.1.; 4.2.*). Sjeme soje u temperaturnom stresu naklijavano je u klima komori na filter papiru natopljenom vodovodnom vodom, 4 dana pri temperaturi od 20°C, te 3 dana pri temperaturi od 10°C jedna serija, a druga pri temperaturi od 30°C. Sjeme soje u kontroli

naklijavano je na filter papiru natopljenom vodovodnom vodom u klima komori pri temperaturi od 20°C. U svim tretmanima naklijavanje je provedeno u klima komori bez svjetla. 50 sjemenki soje je predstavljalo jedno ponavljanje te je svaki tretman (ukupno 7 varijanata; *Tablica 4.2.*) bio zastupljen s 4 ponavljanja. Zbog prevencije infekcije tijekom klijanja sjeme soje tretirano je Vitavax® fungicidnim sredstvom, prije samog početka pokusa.

Tablica 4.2. Tretmani primijenjeni prilikom postavljanja eksperimenta u fazi klijanje-nicanje.

	Tretmani	**Temperature**	**Otopine**
1.	Kontrola	20°C	100 ml H_2O
2.	Niska temperatura	4 dana 20°C + 3 dana 10°C	100 ml H_2O
3.	Visoka temperatura	4 dana 20°C + 3 dana 30°C	100 ml H_2O
4.	Solni stres I	20°C	100 ml 50 mM NaCl
5.	Solni stres II	20°C	100 ml 100 mM NaCl
6.	Osmotski stres I	20°C	100 ml 5% PEG 6000
7.	Osmotski stres II	20°C	100 ml 10% PEG 6000



Slika 4.1. Rolanje natopljenog filter papira u kojem je posloženo sjeme soje.



Slika 4.2. Naklijavanje sjemena soje u klima komori.

Autor fotografija: Marija Špoljarević; 2011. g.



Slika 4.3. Klijanci soje.



Slika 4.4. Određivanje broja klijanaca soje.

Autor fotografija: Marija Špoljarević; 2011. g.

U drugoj etapi proučavani su učinci temperaturnih tretmana na biljke dva kultivara soje u fenofazi cvatnje (R_2). Kultivari za ovu etapu istraživanja, Tena i Zora, odabrani su na osnovu ključnih ispitivanih parametara iz prethodne etape istraživanja. Sjeme navedenih kultivara sijano je u tlom (karbonatni černozem) napunjene plastične posude volumena 0,5 l u uobičajenim terminima sjetve 2011. godine (*Slika 4.5.*; *4.6.*). Napravljene su standardne analize tla kojima je utvrđena pogodnost tla za optimalan rast biljaka (*Tablica 4.3.*). Od standardnih analiza tla određen je pH u vodi i kalijevom kloridu, količina lako pristupačnog kalija i fosfora te udio humusa i kalcijevog karbonata. Svaki kultivar i tretman zasijani su u 4 ponavljanja. Za svako ponavljanje sijano je 5 posuda sa po 4 sjemenke. Zbog prevencije infekcije tijekom klijanja sjeme soje tretirano je Vitavax® fungicidnim sredstvom. Krajnji broj biljaka u posudi je bio manji jer se nisu sve biljke razvile do fenološke faze pune cvatnje. Rast i razvoj biljaka do R_2 fenofaze odvijao se na otvorenom te su bile izložene vanjskim uvjetima temperature, svjetla i padalina. Biljke su dodatno zalijevane svaki dan. Nakon što su biljke dostigle ciljanu fazu razvoja, premještene su u klima komoru i podvrgnute različitim temperaturnim tretmanima uz zalijevanje vodom prema potrebi (*Slika 4.7.*). U tretmanima visokom temperaturom biljke su izložene temperaturi 30°C tijekom 3 dana. U tretmanima

niskom temperaturom biljke su izložene temperaturi 10°C tijekom 3 dana. U kontrolnim uvjetima biljke su izložene temperaturi 20°C tijekom 3 dana. Svjetlosni režim u kontroliranim uvjetima je bio 15 h svjetlo i 9 h tama. U obje etape istraživanja određena su morfološka svojstva te utvrđen fiziološki status biljke.

Tablica 4.3. Rezultati analize tla.

pH (H_2O)	pH (KCl)	Al- P_2O_5 (mg/100 g tla)	Al- K_2O (mg/100 g tla)	Humus (%)	$CaCO_3$ (%)
8,09	7,16	38,5	43,70	2,60	2,50



Slika 4.5. Uzgoj biljaka na otvorenom.



Slika 4.6. Biljke soje u R_2 fenofazi.



Slika 4.7. Biljke soje u klima komori.



Slika 4.8. Mjerenje fluorescencije.

Autor fotografija: Marija Špoljarević; 2011. g.

4.2. Utvrđivanje klijavosti i morfoloških svojstva

U prvoj etapi istraživanja nakon primijenjenih tretmana određen je broj klijanaca te su vrijednosti izražene u postotcima (%; *Slika 4.4.*). Izvagana je masa svih klijanaca te masa hipokotila, a vrijednosti su izražene kao prosječna masa (g) klijanca, odnosno hipokotila za svako ponavljanje.
U drugoj etapi istraživanja, nakon primijenjenih tretmana u R_2 fazi razvoja, određena je masa listova, broj biljaka i broj listova svih biljaka te je iz navedenih podataka izračunata prosječna masa listova po biljci, masa troliske i broj troliski po biljci u svakom ponavljanju.

4.3. Metode utvrđivanja fiziološkog statusa biljke

Kod biljaka iz obje etape istraživanja određeni su neenzimski i enzimski pokazatelji stresa, dok je samo kod biljaka iz druge etape istraživanja utvrđena fotosintetska aktivnost. U svim spektrofotometrijskim metodama mjerenje je vršeno UV-VIS spektrofotometrom Varian Cary 50. Prilikom mjerenja enzimskih reakcija korišten je Peltier elektrotermički sustav za održavanje konstantne temperature reakcijske smjese (25°C). Masa uzoraka određena je na analitičkoj vagi Sartorius group BL 120S s 4 decimale i tehničkoj vagi Acculab Sartorius group s dvije decimale. Uzorci su centrifugirani pri različitom broju okretaja na Hettich Rotanta 460R centrifugi.

4.3.1. Neenzimski pokazatelji stresa

Određivanje sadržaja vodikovog peroksida

Sadržaj vodikovog peroksida (H_2O_2) određen je spektrofotometrijski mjerenjem količine kompleksa titanovog peroksida koji se taloži kada se biljnom ekstraktu doda titanov oksisulfat u sulfatnoj kiselini i otopina amonijevog hidroksida (**Mukherjee i Choudhouri, 1983.**). Tkivo hipokotila i listova soje usitnjeno je maceriranjem u tekućem dušiku te je odvagano oko 0,1 g u mikroepruvetu od 2 ml. Vodikov peroksid iz tkiva je ekstrahiran s 1 ml hladnog acetona (80%) čime je nastao acetonov peroksid. Tkivo je od supernatanta odvojeno centrifugiranjem 5 minuta pri 6 000 rcf pri 4°C.

Supernatant je dekantiran u mikroepruvete od 2 ml te je dodano 400 µl titanovog reagensa i 500 µl NH_4OH (25%), uz hlađenje u posudi s usitnjenim ledom zbog jake egzotermne reakcije. Nakon ponovnog centrifugiranja supernatant je odvojen, a talog je otopljen pomoću 1 ml H_2SO_4 (2 M). Nakon centrifugiranja tijekom 10 minuta na 15 000 rcf pri 4°C supernatant je korišten za mjerenje apsorbancije na valnoj duljini 415 nm. Koncentracija vodikovog peroksida je izračunata pomoću molarnog ekstinkcijskog koeficijenta (ε = 1,878 mM^{-1} cm^{-1}). Konačni su rezultati izraženi kao nmol g^{-1} svježe tvari.

H_2O_2 (nmol g^{-1} sv.t.) = (A_{415} / 1,878) / m

A_{415} - apsorbanca uzorka
1,878 - molarni ekstinkcijski koeficijent mM^{-1} cm^{-1}
m - masa biljke (g)

Intenzitet lipidne peroksidacije

Intenzitet lipidne peroksidacije je jednostavna spektrofotometrijska metoda kojom se određuje količina produkata lipidne peroksidacije poput malondialdehida (MDA) koji reagiraju s tiobarbiturnom kiselinom (TBA). Ta se metoda naziva još i TBARS prema engleskom Thiobarbituric Acid Reactive Substances (**Heath i Packer, 1968.**). Reakcija se odvija u kiselim uvjetima i na visokoj temperaturi, pri čemu nastaje crveni fluorescentni derivat MDA-$(TBA)_2$ čiju koncentraciju mjerimo. Tkivo hipokotila i listovi soje usitnjeni su pomoću tekućeg dušika do finog praha. Oko 0,2 g usitnjenog biljnog tkiva je ekstrahirano sa 1 ml trikloroctene kiseline (0,1%). Nakon centrifugiranja na 6 000 rcf pri 4°C tijekom 5 minuta, na 0,5 ml supernatanta je dodano 1 ml tiobarbiturne kiseline (0,5%) u trikloroctenoj kiselini (20%). Smjesa je zagrijavana u vodenoj kupelji pri 95°C tijekom 30 minuta, te ohlađena. Nakon hlađenja supernatant je izdvojen centrifugiranjem pri 18 000 rcf tijekom 15 minuta na 4°C. Apsorbanca supernatanta uzorka izmjerena je spektrofotometrijski pri valnim duljinama 532 i 600 nm. Kao slijepa proba korištena je tiobarbiturna kiselina (0,5%) u trikloroctenoj kiselini (20%). Koncentracija produkata lipidne peroksidacije (TBARS) je izračunata koristeći molarni ekstinkcijski koeficijent (ε = 155 mM^{-1} cm^{-1}) i izražena u ekvivalentima tiobarbiturne kiseline (TBA) u jedinicama $nmol_{TBA}$ g^{-1} svježe tvari.

TBARS ($nmol_{TBA}$ g^{-1} sv.t.) = ((A_{532} - A_{600}) * V * 10^3) / (155 * m)

A_{532}, A_{600} - apsorbanca uzorka pri 532 nm i 600 nm valne duljine
V - volumen reakcijske smjese u ml (1,5 ml)
10^3 - koeficijent za preračunavanje u nmol g^{-1}
155 - molarni ekstinkcijski koeficijent mM^{-1} cm^{-1}
m - masa uzorka korigirana faktorom razrjeđenja (g)

Sadržaj slobodnog prolina

Sadržaj slobodnog prolina (PRO) u tkivu hipokotila i lista soje je određen spektrofotometrijski prema **Bates i sur.** (**1973.**). Tkivo je homogenizirano tekućim dušikom te odvagano (oko 0,5 g) u plastične epruvete. Prolin je ekstrahiran iz tkiva s 10 ml sulfo-salicilne kiseline (3%). Tkivo je od supernatanta odvojeno centrifugiranjem pri 3 500 rcf pri 4°C u trajanju od 15 minuta. U 2 ml supernatanta dodano je 2 ml kiselog ninhidrinskog reagensa (2,5%) i 2 ml ledene octene kiseline. Tako pripremljena smjesa promiješana je na vrtložnoj tresilici i zagrijavana 1 h u vodenoj kupelji pri 95 - 98°C. Nakon zagrijavanja smjesa je naglo ohlađena u ledenoj vodi te je svakom uzorku dodano 4 ml toluena. Uzorci su promiješani 20 s i ostavljeni na sobnoj temperaturi dok se gornji toluenski sloj s prolinom nije odvojio od donjeg, vodenog sloja. Standardna krivulja napravljena je pomoću osnovnog standarda otopine L-prolina koncentracije 20 µg ml^{-1} u rasponu koncentracija 0 - 20 µg ml^{-1}. Koncentracija prolina u toluenskoj frakciji određena je mjerenjem apsorbancije na 520 nm i izračunata iz standardne krivulje s poznatim koncentracijama prolina, koje su tretirane na isti način kao i uzorci. Konačni rezultati su izraženi kao µmol g^{-1} svježe tvari.

Sadržaj ukupnih fenola

Sadržaj ukupnih fenola (UF) u hipokotilima i listu soje određen je spektrofotometrijski metodom s Folin-Ciocalteu reagensom prema **Singleton i Rossi (1965.)**. Fenoli su ekstrahirani s 2,5 ml etanola (95%) na -20°C tijekom 48 h iz oko 0,5 g tkiva maceriranog u tekućem dušiku. Nakon ekstrakcije homogenati su centrifugirani na 10 000 rcf pri 4°C tijekom 10 min. Na određeni volumen supernatanta (ovisno o očekivanim vrijednostima koncentracije fenola) dodano je oko 1,5 ml destilirane vode (ukupni volumen supernatanta i vode je 1,6 ml), 100 µl Folin-Ciocalteu reagensa i 300 µl Na_2CO_3 (zasićena otopina). Reakcijska smjesa od ukupno 2 ml je promiješana na

vrtložnoj tresilici te je inkubirana na vodenoj kupelji pri 37°C tijekom 60 minuta. Folin-Ciocalteu reagens je smjesa fosfo-molibdenovog i fosfo-volframovog kiselinskog kompleksa koji u lužnatoj sredini s fenolima tvori plavo obojeni kompleks, koji se može spektrofotometrijski kvantificirati. Sadržaj fenola u inkubiranoj i ohlađenoj smjesi određen je mjerenjem apsorbancije na spektrofotometru pri valnoj duljini od 765 nm. Koncentracija fenola izračunata je iz standardne krivulje s poznatim koncentracijama galne kiseline (GA), u rasponu 0,05 - 0,5 mg GA ml^{-1}. Konačni sadržaj fenola izražen je kao mg GA g^{-1} svježe tvari. Uzorci standardne otopine, kao i otopine uzoraka, priređeni su u triplikatu.

4.3.2. Enzimski pokazatelji stresa

Ekstrakcija topljivih proteina

Tkivo hipokotila, odnosno listova soje, je usitnjeno maceriranjem s tekućim dušikom u tarioniku uz dodatak polivinil-polipirolidona (PVPP, dodaje se radi uklanjanja polifenola iz biljnih ekstrakata). Nakon maceriranja svježeg tkiva hipokotila, u plastične epruvete je odvagano oko 0,5 g (za askorbat-peroksidazu i glutation-reduktazu); oko 0,35 g (za gvajakol-peroksidazu) te 0,25 g tkiva (za katalazu). U eksperimentu sa sojom u fazi cvatnje, nakon maceriranja listova soje, u epruvete je odvagano 0,5 g (za askorbat-peroksidazu, glutation-reduktazu i katalazu) te 0,35 g tkiva (za gvajakol-peroksidazu). Iz usitnjenog tkiva proteini su ekstrahirani s 1 ml hladnog pufera tijekom 15 minuta, a zatim odijeljeni od ostataka tkiva centrifugiranjem 15 minuta pri 18 000 rcf. Supernatant je dekantiran u novu plastičnu epruvetu. Kod uzoraka lista nakon ekstrakcije napravljena je i reekstrakcija dodavanjem 1 ml istog pufera. Nakon odjeljivanja supernatanta iz postupka reekstrakcije, supernatanti iz obje ekstrakcije su spojeni i korišteni za odrađivanje aktivnosti enzima i sadržaja ukupnih proteina. Pufer korišten za ekstrakciju askorbat-peroksidaze i glutation-reduktaze je sadržavao 0,1 M K_2HPO_4, 0,1 M KH_2PO_4, 5 mM natrijev askorbat i 1 mM EDTA (pH 7,0). Ekstrakcijski pufer za katalazu je sadržavao 0,1 M K_2HPO_4, 0,1 M KH_2PO_4 (pH 7,0). Za ekstrakciju nespecifičnih gvajakol-peroksidaza korišteni pufer je sadržavao 0,1 M Tris(hidroksimetil)-aminometan i HCl (pH 8,0). Ukupna i specifična aktivnost navedenih enzima izračunata je prema sljedećim formulama:

AEu (μmol min^{-1} g^{-1} sv.t.) = (($\Delta A/\Delta t$) *V_{RS} * V_U) / (ε * V_A * $m_{sv.t.}$)

AEs (μmol min^{-1} mg^{-1} prot.) = AEu / c_{prot}.

AEu - ukupna aktivnost enzima
AEs - specifična aktivnost enzima
$\Delta A/\Delta t$ - srednja vrijednost razlika u promjeni apsorbancije u određenom vremenskom intervalu (ΔA min^{-1})
V_{RS} - volumen reakcijske smjese u ml
V_U - ukupni volumen proteinskog ekstrakta u ml
ε - molarni ekstinkcijski koeficijent mM^{-1} cm^{-1}
V_A - volumen mjernog alikvota u ml
$m_{sv.t.}$ - masa svježe tvari u g
$c_{prot.}$ - koncentracija proteina u $mg_{prot.}$ $g^{-1}_{sv.t.}$

Određivanje aktivnosti askorbat-peroksidaze (EC 1.11.1.11)

Ukupna aktivnost askorbat peroksidaze (APXu, EC 1.11.1.11) određena je prema **Nakano i Asada (1981.)**. Reakcijska smjesa za mjerenje aktivnosti APXu sadržavala je 50 mM kalij-fosfatni pufer (KP pufer; 50 mM KH_2PO_4 i 50 m M K_2HPO_4; pH 7), 0,1 mM EDTA, 50 mM askorbinsku kiselinu i 12 mM H_2O_2. U kivetu od kvarcnog stakla dodano je 880 μl KP pufera s EDTA, 10 μl askorbinske kiseline, 100 μl proteinskog ekstrakta i 10 μl H_2O_2. Stupanj oksidacije askorbinske kiseline praćen je smanjenjem apsorbancije pri valnoj duljini od 290 nm tijekom 60 sekundi, uz očitanje svake sekunde. Svaki je uzorak mjeren u triplikatu. Aktivnost APXu izražena je u μmol min^{-1} g^{-1} svježeg tkiva koristeći ekstinkcijski koeficijent (ε = 2,8 mM^{-1} cm^{-1}). Na kraju je izračunata i specifična aktivnost askorbat-peroksidaze (APXs) izražena u μmol min^{-1} mg^{-1} prot.

Određivanje aktivnosti katalaze (EC 1.11.1.6)

Ukupna aktivnost enzima katalaze (CATu, EC 1.11.1.6.) u proteinskim ekstraktima određena je spektrofotometrijski prema **Aebi (1984.)**. Reakcijska smjesa za mjerenje aktivnosti CATu sadržavala je 50 mM kalij-fosfatni pufer (50 mM KH_2PO_4, 50 mM K_2HPO_4; pH 7,0) i 10 mM H_2O_2. Enzimska reakcija započela je dodavanjem 50 - 100 μl proteinskog ekstrakta te reakcijskog pufera do ukupno 2000 μl reakcijske smjese u

kvarcnu kivetu za mjerenje na spektrofotometru. Pad apsorbancije, uslijed razgradnje H_2O_2, mjeren je svakih 10 sekundi tijekom 120 sekundi pri valnoj duljini od 230 nm. Svaki je uzorak mjeren u triplikatu. Aktivnost CATu izražena je kao količina razgrađenog H_2O_2 u μmol min^{-1} g^{-1} svježeg tkiva koristeći ekstinkcijski koeficijent ($\varepsilon = 81$ M^{-1} cm^{-1}; **Duh i sur., 1999.**). Iz ukupne aktivnosti CAT i sadržaja proteina izražena je specifična aktivnost katalaze (CATs). Zbog interferencija s neželjenim supstancama, proteinski ekstrakti svježeg tkiva lista iz kojih je mjerena aktivnost CAT pročišćeni su propuštanjem kroz kolonice za odsoljavanje PD-10 (PD-10 Desalting Columns) od proizvođača GE Healthcare Bio-Sciences AB. Postupci pročišćavanja provedeni su u skladu s naputcima proizvođača (Instructions 52-1308-00 BB).

Određivanje aktivnosti nespecifičnih gvajakol-peroksidaza (EC 1.11.1.7)

Ukupna aktivnost gvajakol-peroksidaza (GPOXu, EC 1.11.1.7) u proteinskim ekstraktima određena je metodom po **Perrey i sur. (1989.)**, te **Siegelu i Galstonu (1967.)**. Reakcijska smjesa sadržavala je 5 mM gvajakol, 0,2 M PK pufer (0,2 M KH_2PO_4, 0,2 M Na_2PO_4 x 12 H_2O; pH 5,8) te 5 mM H_2O_2 koji je dodan neposredno prije mjerenja. Na 900 μl reakcijske smjese dodano je 100 μl proteinskog ekstrakta te je povećanje apsorbancije mjereno pri valnoj duljini od 470 nm svake sekunde tijekom 60 sekundi. Do porasta apsorbancije dolazi uslijed oksidacije gvajakola pri čemu nastaje smeđe obojen produkt tetragvajakol. Svaki uzorak mjeren je u triplikatu. Ukupna aktivnost GPOXu izražena je kao količina nastalog tetragvajakola u μmol min^{-1} g^{-1} sv.t., a specifična aktivnost GPOXs izražena je u μmol min^{-1} mg^{-1} prot. Ekstinkcijski koeficijent korišten za izračun GPOXu je $\varepsilon = 26{,}6$ mM^{-1} cm^{-1}.

Određivanje aktivnosti glutation-reduktaze (EC 1.6.4.2)

U proteinskim ekstraktima ukupna aktivnost enzima glutation-reduktaze (GR; EC 1.6.4.2) određena je metodom prema **Dolphin i sur. (1989.)**. Reakcijska smjesa sadržavala je 0,1 M KP pufer (0,1 M KH_2PO_4 i 0,1 M K_2HPO_4; pH 7,5), 1 mM EDTA, 2 mM NADPH (nikotinamid-adenin-dinukleotid fosfat) i 2 mM GSSG (oksidirani oblik glutationa). U kvarcnu kivetu je dodano 500 μL GSSG, 400 μl KP pufera s EDTA, 50 μl ekstrakta proteina te 50 μl otopine NADPH, čime je započela reakcija. Smanjenje apsorbancije praćeno je svakih 10 sekundi tijekom 100 sekundi pri valnoj duljini od 340 nm. Svaki uzorak mjeren je u triplikatu. Do pada apsorbancije dolazi zbog oksidacije NADPH uslijed redukcije oksidiranog glutationa (GSSG) u reducirani

glutation (GSH) u prisutnosti GR. Ukupna aktivnost enzima glutation-reduktaze (GRu) izražena je kao promjena apsorbancije u minuti po gramu svježe tvari. Specifična aktivnost (GRs) određena je kao kvocijent GRu i koncentracije proteina te izražena u min^{-1} mg^{-1} prot. Ekstinkcijski koeficijent korišten za izračun GRu je $\varepsilon = 6{,}22$ mM^{-1} cm^{-1}. Proteinski ekstrakti za određivanje GRs iz svježeg tkiva lista soje pročišćeni su propuštanjem kroz kolonice za odsoljavanje PD-10.

Određivanje sadržaja proteina

Koncentracija proteina u proteinskim ekstraktima je određena spektrofotometrijski metodom prema **Bradfordu (1976.)**. Postupak se temelji na pomaku apsorbancije (s 465 nm na 595 nm valne duljine) do kojeg dolazi zbog vezivanja boje Coomassie briljant plavo G-250 (engl. *Coomassie brilliant blue* - CBB) na proteine, u kiseloj otopini. Razrijeđeni proteinski ekstrakt (100 µl) je pomiješan s 1 ml CBB (100 mg CBB G-250, 50 ml etanola, 100 ml 85% fosforne kiseline, dH_2O do 1 l) te inkubiran 5 minuta na sobnoj temperaturi. Intenzitet obojenja otopine izmjeren je pri 595 nm valne duljine na spektrofotometru. Koncentracija proteina ekstrapolirana je iz baždarne krivulje napravljene s poznatim koncentracijama albumina goveđeg seruma (engl. *bovine serum albumine* - BSA) pripremljene u rasponu koncentracija 0,01 - 0,4 mg_{BSA} ml^{-1}. Koncentracija proteina je izražena u mg g^{-1} svježe tvari i korištena je za izračun specifičnih aktivnosti antioksidativnih enzima. Uzorci standardne otopine, kao i otopine uzoraka, priređeni su u triplikatu.

4.3.3. Utvrđivanje fotosintetske aktivnosti

Sadržaj fotosintetskih pigmenata

Sadržaj pigmenata (klorofil a, klorofil b, karotenoidi) određen je spektrofotometrijskom metodom po Holmu i Wettsteinu (**Holm, 1954.**; **Wettstein, 1957.**). Oko 0,2 g tkiva lista soje je macerirano u tarioniku uz dodatak 10-ak ml acetona, kvarcnog pijeska i $MgCO_3$. Macerat je profiltriran preko guča u epruvetu pomoću vakuum sustava. Filtrat je prenešen u odmjernu tikvicu od 25 ml i nadopunjen acetonom do oznake. Pomoću spektrofotometra u ekstraktu pigmenata, pripremljenog na prethodno opisan način, izmjerena je apsorbancija pri valnim duljinama 662, 644 i 440 nm. Dobivene vrijednosti

apsorbancija uvrštene su u Holm-Wettsteinove formule kako bi se izračunale koncentracije pigmenata u mg dm^{-3}.

klorofil a (mg dm^{-3}) = 9,784 * A_{662} – 0,990 * A_{644}
klorofil b (mg dm^{-3}) = 21,426 * A_{644} – 4,650 * A_{662}
klorofil a+b (mg dm^{-3}) = 5,134 * A_{662} + 20,436 * A_{644}
karotenoidi (mg dm^{-3}) = 4,695 * A_{440} – 0,268 * (klorofil a+b)

A_{662}, A_{644}, A_{440} - apsorbancija pri 662 nm, 644 nm i 440 nm valne duljine
brojevi u jednadžbama - molarni adsorpcijski koeficijenti po Holmu i Wettsteinu

Konačni rezultati sadržaja pigmenata su izračunati i izraženi kao mg g^{-1} svježe tvari prema navedenoj jednadžbi.

sadržaj pigmenata (mg g^{-1} sv.t.) = (c_1 * V * r) / m

c_1 - koncentracija pigmenata (klorofila a; klorofila b; karotenoida) u mg dm^{-3}
V - volumen filtrata u ml (25 ml)
r - razrjeđenje filtrata
m - masa uzorka u mg

Iz izračunatih vrijednosti sadržaja pigmenata izračunati su i omjeri klorofil a/klorofil b; klorofil a+b/karotenoidi.

Mjerenje fluorescencije

Mjerenjem fluorescencije određuje se fotosintetska učinkovitost fotosustava II (PS II). Parametri fluorescencije su mjereni u uvjetima ambijentalne koncentracije O_2 i CO_2, na sobnoj temperaturi (*Slika 4.8.*). Nakon prethodne adaptacije na uvjete mraka, pomoću posebnih plastičnih kopči, tijekom 15 minuta, listovi soje su osvjetljavani aktinskom svjetlošću (Philips 131 65 halogen lamp 35 W/14 V) s 200 $\mu mola_{fotona}$ m^{-2} s^{-2} tijekom 5 ms, koristeći Plant Stress Meter (PSM Chlorophyll Fluorometer, Biomonitor S.C.I. AB, Umeå, Sweden; **Öquist and Wass, 1988.**). Prilagodbom listova na uvjete tame dolazi do potpune redukcije plastokinona, odnosno do otvaranja svih reakcijskih

središta što je preduvjet za mjerenje minimalnog intenziteta fluorescencije (F_0). Ostali mjereni parametri su: maksimalna razina fluorescencije (Fm), varijabilna fluorescencija (Fv = Fm - F_0), maksimalni kvantni prinos PS II (Fv/Fm), omjer varijabilne i početne fluorescencije (Fv/F_0) te poluvrijeme porasta od F_0 do Fm ($t_{½}$).

4.5. Statistička analiza podataka

U prvoj etapi pokusa šest kultivara soje postavljeno je na klijanje u četiri ponavljanja s 50 sjemenki po ponavljanju, u kontrolnim uvjetima i ukupno šest stresnih tretmana. U drugoj etapi pokusa posijane su sjemenke dva kultivara soje u četiri ponavljanja. U svakom ponavljanju zasijano je pet plastičnih posuda sa po četiri sjemenke. Nakon faze klijanja biljke su uzgajane do fenofaze R_2 te su tada prenesene u klima komoru gdje su primijenjena tri temperaturna tretmana (kontrola i dva temperaturna stresa).

Za statističku obradu prikupljenih podataka korišten je računalni program Statistical Analysis System (SAS) Software 9.1.3. (2011. - 2012., SAS Institute Inc., USA). Podaci su analizirani monofaktorijalnom i dvofaktorijalnom analizom varijance (engl. *analysis of variance* - ANOVA) uz primjenu F-testa. Razlike između srednjih vrijednosti tretmana utvrđene su Fisherovim LSD testom (engl. Fishers Least Significant Difference). Za utvrđivanje povezanosti među mjerenim pokazateljima napravljena je linearna korelacijska analiza pomoću VVstat računalnog programa uz primjenu t-testa.

5. REZULTATI ISTRAŽIVANJA

5.1. FENOLOŠKA FAZA: KLIJANJE-NICANJE

5.1.1. Klijavost i morfološka svojstva

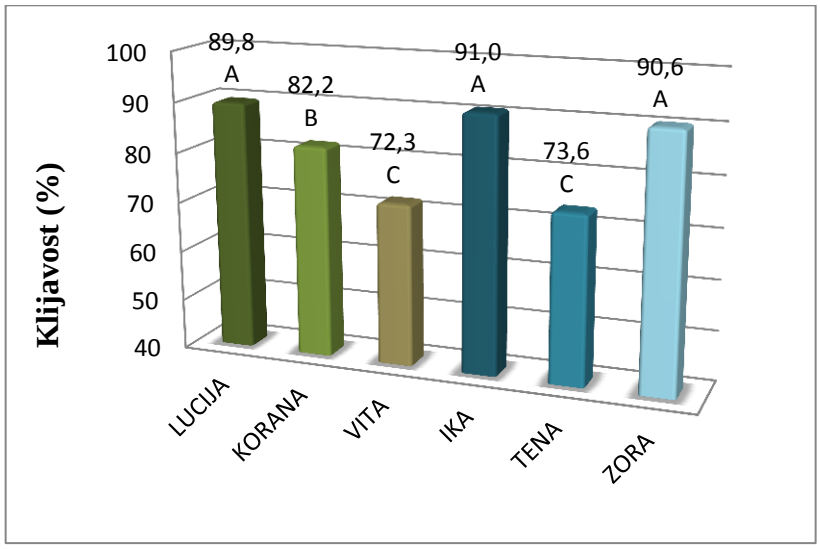
Analizom dobivenih rezultata ocijenjen je utjecaj kultivara, tretmana i njihove interakcije na klijavost i morfološka svojstva kultivara u fenofazi klijanja i nicanja (*VE*). Prema vrijednostima F testa kultivar, tretman, te interakcija kultivar x tretman su imali vrlo značajan utjecaj ($P < 0,0001$) na klijavost sjemena, masu klijanca i masu hipokotila (*Tablica 5.1.*).

Tablica 5.1. Značajnost utjecaja kultivara i tretmana na pokazatelje morfoloških svojstava klijanca soje (prikazani podaci su izračunate razine značajnosti (*P*) prema F testu).

		Klijavost	Masa klijanca	Masa hipokotila
KULTIVAR (A)	F test	76,37	125,64	34,68
	P	<0,0001	<0,0001	<0,0001
TRETMAN (B)	F test	33,39	1668,01	1407,86
	P	<0,0001	<0,0001	<0,0001
INTERAKCIJA (AxB)	F test	3,75	10,94	8,08
	P	<0,0001	<0,0001	<0,0001

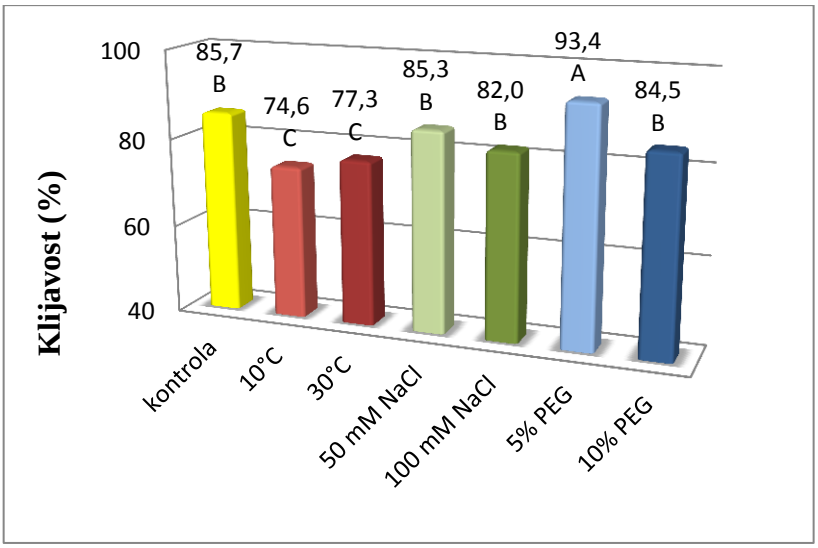
5.1.1.1. Klijavost sjemena soje

Kultivar je, u prosjeku za sve tretmane, vrlo značajno utjecao na klijavost sjemena (*Tablica 5.1.*). Najveći prosječni postotak klijavosti soje, za sve tretmane, imao je kultivar Ika (91%) a najmanji Vita (72,3%; *Slika 5.1.*). Ika, Zora i Lucija se nisu značajno razlikovale. Između Vite i Tene nije bilo statistički značajne razlike, no imale su značajno manju klijavost od ostalih kultivara. Korana je imala prosječan postotak klijavosti (82,2%), te se od ostalih kultivara statistički razlikovala.



Slika 5.1. Prosječna klijavost (%), za sve tretmane, kod šest kultivara soje. Značajne razlike između kultivara soje označene su različitim slovima prema LSD testu (A,B,C: $P \leq 0,01$).

U prosjeku za sve tretmane, F testom je utvrđen i vrlo značajan utjecaj tretmana na klijavost (*Tablica 5.1.*). Tretmani u uvjetima više i niže razine solnog stresa, te više razine osmotskog stresa nisu se međusobno značajno razlikovali i nisu se razlikovali od kontrole (*Slika 5.2.*). Najveću klijavost soja je imala u uvjetima nižeg osmotskog stresa (5% PEG). Najniža prosječna klijavost je utvrđena u temperaturnom tretmanu od 10°C. Vrijednosti klijavosti između temperaturnog tretmana 10°C i 30°C se nisu značajno razlikovale. Vidljivo je značajno smanjenje klijavosti pri tretmanima 10°C i 30°C u odnosu na kontrolu, te povećanje klijavosti pri 5% PEG-u.



Slika 5.2. Prosječna klijavost (%), za sve kultivare, po tretmanima. Značajne razlike između tretmana označene su različitim slovima prema LSD testu (A,B,C: $P \leq 0,01$).

Tablica 5.2. Značajnost utjecaja kultivara i tretmana na postotak klijavosti sjemena soje (podaci su izraženi u %; podaci su prosjek četiri ponavljanja; ANOVA, F test; prosjeci kultivara označenih istim slovom ne razlikuju se prema LSD testu (A,B,C,D,E,F: $P \leq 0,01$); prosjeci tretmana označenih istim slovom ne razlikuju se prema LSD testu (x,y,z: $P \leq 0,05$; X,Y,Z,W: $P \leq 0,01$)).

Klijavost (%)	Kontrola	10°C	30°C	50 mM NaCl	100 mM NaCl	5% PEG	10% PEG	F test - tretman	*P*- tretman
LUCIJA	91,5 A / xy	83,5 AB / z	86,5 AB / yz	94,5 A / x	87,5 A / yz	94,5 A / x	90,3 AB / xy	3,34	0,0182
KORANA	86,0 AB / XY	75,0 BC/ Z	76,5 BC / Z	79,5 CD / YZ	83,5 A / YZ	94,0 A / X	81,0 CD / YZ	7,85	0,0002
VITA	74,0 C / XY	54,5 D / Z	65,0 CD / YZ	82,0 BC / X	72,5 B / XY	82,5 B / X	75,8 D / XY	8,25	0,0001
IKA	89,0 AB / YZ	89,0 A / YZ	90,0 A / YZ	94,5 A / XY	91,0 A / Y	100,0 A / X	83,8 BC / Z	9,86	<0,0001
TENA	80,5 BC / XYZ	62,5 CD / W	58,5 D / W	70,0 D / YZW	67,5 B / ZW	93,0 A / X	83,3 BC / XY	13,67	<0,0001
ZORA	93,0 A / XY	83,0 AB / Z	87,5 AB / YZ	91,0 AB / XYZ	90,0 A / XYZ	96,5 A / X	93,0 A / XY	4,08	0,0072
F test - kultivar	8,30	17,45	15,71	12,98	17,21	9,58	11,92		
P- kultivar	0,0003	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0001	<0,0001		

Najveći postotak klijavosti imala je Ika pri tretmanu 5% PEG-om (100%) a najmanji Vita pri tretmanu 10°C (54,5%). Prema F testu, kultivar je vrlo značajno utjecao na postotak klijavosti sjemena u kontroli i svim tretmanima stresa (*Tablica 5.2.*). U

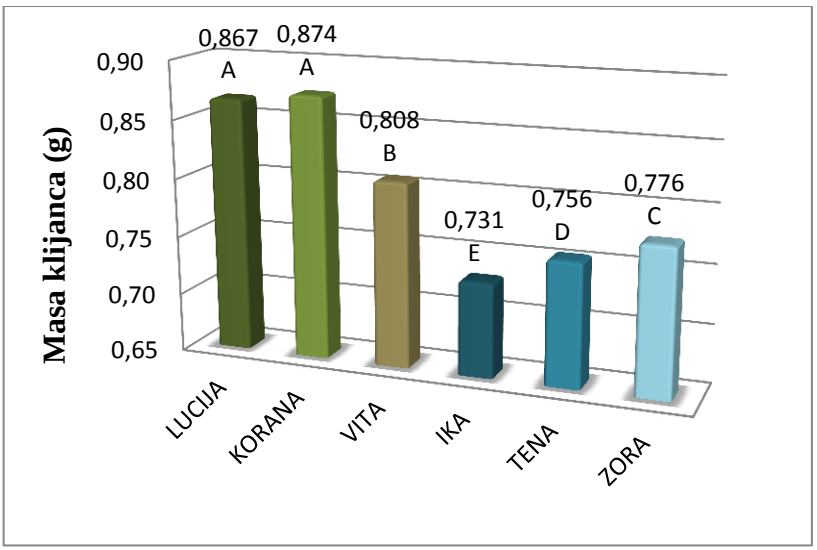
optimalnim uvjetima (kontrola) Zora je pokazala najveći postotak klijavosti (93,0%), a Vita je pokazala najniži (74,0%). Između Zore, Lucije, Ike i Korane nije bilo značajne razlike u optimalnim uvjetima. Najbolju klijavost imala je Ika pri tretmanu 10°C i 30°C. Postotak klijavosti kod Ike se nije značajno razlikovao od nešto nižih vrijednosti kod Lucije i Zore pri oba navedena tretmana. Najniži postotak klijavosti pri tretmanu 10°C imala je Vita, a pri 30°C imala je Tena. U tretmanima pri 10°C i 30°C između Vite i Tene nije bilo značajne razlike. Ika je, također, imala najbolji postotak klijavosti pri višoj i nižoj razini solnog stresa, no pri nižoj razini solnog stresa Lucija je imala jednaku klijavost kao i Ika (94,5%). Pri tretmanu s 50 mM NaCl-om Lucija i Ika se nisu značajno razlikovale od Zore. Pri tretmanu 100 mM NaCl-om Ika se nije značajno razlikovala od Lucije, Zore i Korane. Pri tretmanu nižeg osmotskog stresa najbolju klijavost je imala Ika, a pri tretmanu višeg osmotskog stresa Zora. Pri tretmanu s 5% PEG-om Ika se nije značajno razlikovala od Zore, Lucije, Korane i Tene. Pri tretmanu s 10% PEG-om Zora se nije značajno razlikovala od Lucije, a od Ike se značajno razlikovala. Najniži postotak klijavosti pri oba tretmana osmotskog stresa je imala Vita. Vita se pri uvjetima nižeg osmotskog stresa značajno razlikovala od svih ostalih kultivara, dok se pri uvjetima višeg osmotskog stresa nije značajno razlikovala jedino od Korane. Zora, Lucija i Ika su u kontroli i pri svim stresnim tretmanima imale visoki postotak klijavosti, dok su Tena i Vita u kontroli i većini stresnih tretmana imale nižu klijavost.

Utvrđen je vrlo značajan utjecaj primijenjenih tretmana na postotak klijavosti kod Korane, Vite, Ike, Tene i Zore, a značajan utjecaj kod Lucije (*Tablica 5.2.*). Svi kultivari soje su imali najbolju klijavost pri tretmanu s 5% PEG-om, osim Lucije koja je imala jednaku klijavost i pri navedenom tretmanu i tretmanu s 50 mM NaCl-om (94,5%). Najmanju klijavost su imale Lucija, Korana, Vita i Zora pri tretmanu 10°C, Tena pri tretmanu 30°C, a Ika pri tretmanu 10% PEG-om. Kod Lucije klijavost sjemena pri temperaturnom tretmanu 10°C je bila značajno niža u odnosu na kontrolu, a ostali tretmani nisu pokazali značajnu razliku prema LSD testu, na razini značajnosti $P \leq 0,05$. Statistički značajno nižu klijavost, pri tretmanima s višom i nižom temperaturom, u odnosu na kontrolu su pokazale Korana i Tena. Kultivari Zora i Vita su pokazali statistički značajno nižu klijavost pri tretmanu 10°C u odnosu na kontrolu. Ika, uz izuzetak 5% PEG, nije imala statistički značajnu razliku između kontrole i ostalih

tretmana. Pri tretmanu 30°C većinom je klijavost bila veća u usporedbi s tretmanom 10°C, ali bez statističke značajnosti. Klijavost pri tretmanu 50 mM NaCl-om je bila značajno niža nego pri tretmanu 100 mM NaCl-om samo kod Lucije. Klijavost pri tretmanu 5% PEG-om bila je viša u odnosu na tretman 10% PEG-om, ali značajno viša bila je samo kod Ike i Korane.

5.1.1.2. Masa klijanca soje

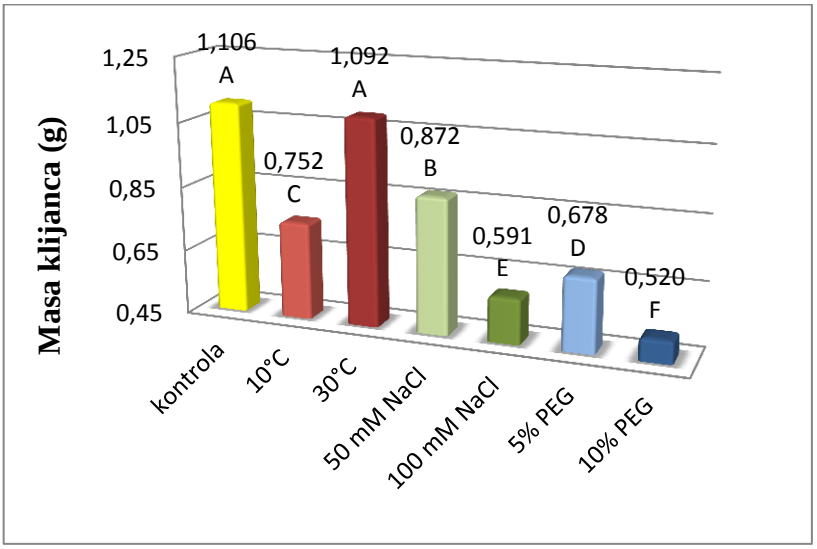
Kultivar je, u prosjeku za sve tretmane, vrlo značajno utjecao na masu klijanca (*Tablica 5.1.*). Korana je imala najveću masu klijanca (0,874 g) u prosjeku za sve tretmane, ali se nije značajno razlikovala od Lucije (*Slika 5.3.*). Ika je imala najmanju masu klijanca (0,731 g) i značajno se razlikovala od svih ostalih kultivara. Vita je imala prosječnu masu za sve tretmane 0,808 g, Zora 0,776 g, Tena 0,756 g, te su se značajno razlikovale međusobno i u odnosu na druge kultivare.



Slika 5.3. Prosječna masa klijanca (g), za sve tretmane, kod šest kultivara soje. Značajne razlike između kultivara soje označene su različitim slovima prema LSD testu (A,B,C,D, E: $P \leq 0{,}01$).

Analizirajući masu klijanca prosječno za sve kultivare po primijenjenim tretmanima, utvrđen je vrlo značajan utjecaj tretmana na masu klijanca (*Tablica 5.1.*). Najveću prosječnu masu klijanca kultivari su imali u kontroli (1,106 g), što se nije značajno

razlikovalo od tretmana pri 30°C (*Slika 5.4.*). Najmanju masu klijanca kultivari su imali pri 10% PEG-u (0,520 g), te se masa u tom tretmanu značajno razlikovala od ostalih tretmana. Međusobno i u odnosu na druge tretmane razlikovali su se tretmani, slijedom od najveće do najmanje mase klijanca, 50 mM NaCl (0,872 g), 10°C (0,752 g), 5% PEG (0,678 g), 100 mM NaCl (0,591 g).



Slika 5.4. Prosječna masa klijanca (g), za sve kultivare, po tretmanima. Značajne razlike između tretmana označene su različitim slovima prema LSD testu (A,B,C,D, E, F: $P \leq 0{,}01$).

Najveću masu klijanca je imala Korana pri tretmanu 30°C (1,286 g), a najmanju Ika pri tretmanu 10% PEG-om (0,485 g). Kultivar je vrlo značajno utjecao na masu klijanca u kontrolnim i svim stresnim uvjetima (*Tablica 5.3.*). U kontroli najveću masu klijanca imala je Korana, a najmanju Ika. Korana se nije značajno razlikovala od Lucije, no Ika se značajno razlikovala od ostalih kultivara u masi klijanca. Pri tretmanu 10°C Lucija je imala značajno najveću masu klijanca u odnosu na ostale kultivare, dok je Ika imala najmanju masu klijanca te se nije značajno razlikovala od Tene i Zore. Pri tretmanu 30°C najveću masu klijanca je imala Korana koje se nije značajno razlikovala od Lucije. Pri istom tretmanu najmanju masu klijanca je imala Tena koja se značajno razlikovala od ostalih kultivara. Najveću masu klijanca u uvjetima nižeg solnog stresa je imala Lucija koja se nije značajno razlikovala od Korane. U uvjetima višeg solnog stresa najveću masu klijanca imala je Korana koja nije imala značajno različite vrijednosti mase klijanaca od Lucije i Vite. Najmanju masu klijanca pri uvjetima nižeg i višeg solnog stresa imala je Ika. Ika se pri tretmanu 50 mM NaCl-om vrlo značajno

razlikovala od ostalih kultivara, a pri tretmanu 100 mM NaCl-om nije se značajno razlikovala od Tene i Zore. Korana je pri tretmanima 5% i 10% PEG-om imala najveću masu klijanca, a Ika je imala najmanju masu klijanca. Pri tretmanu 5% PEG-om Korana, se nije značajno razlikovala od Lucije, Vite i Zore, a Ika se nije značajno razlikovala od Tene. Pri tretmanu 10% PEG-om Korana se nije značajno razlikovala od Lucije, Vite i Tene, a Ika se nije značajno razlikovala od Zore. Uočljivo je kako se, uspoređujući tretmane, broj kultivara koji se značajno ne razlikuju od kultivara s najvećim masom klijanca povećava od kontrole prema tretmanima s jačim i intenzivnijim stresom. U kontroli najveću masu klijanca imaju Korana i Lucija (2), pri tretmanu 10°C Lucija (1), pri tretmanima 30°C i 50 mM NaCl-om Lucija i Korana (2), pri tretmanu 100 mM NaCl-om Lucija, Korana i Vita (3), pri tretmanu 5% PEG-om Lucija, Korana, Vita i Zora (4), pri tretmanu 10% PEG-om Lucija, Korana, Vita i Tena (4).

Tablica 5.3. Značajnost utjecaja kultivara i tretmana na prosječnu masu klijanca soje (podaci su izraženi u g; podaci su prosjek četiri ponavljanja; ANOVA, F test; prosjeci kultivara označenih istim slovom ne razlikuju se prema LSD testu (A,B,C,D: $P \leq 0{,}01$); prosjeci tretmana označenih istim slovom ne razlikuju se prema LSD testu (X,Y,Z,W,Q,R,S: $P \leq 0{,}01$)).

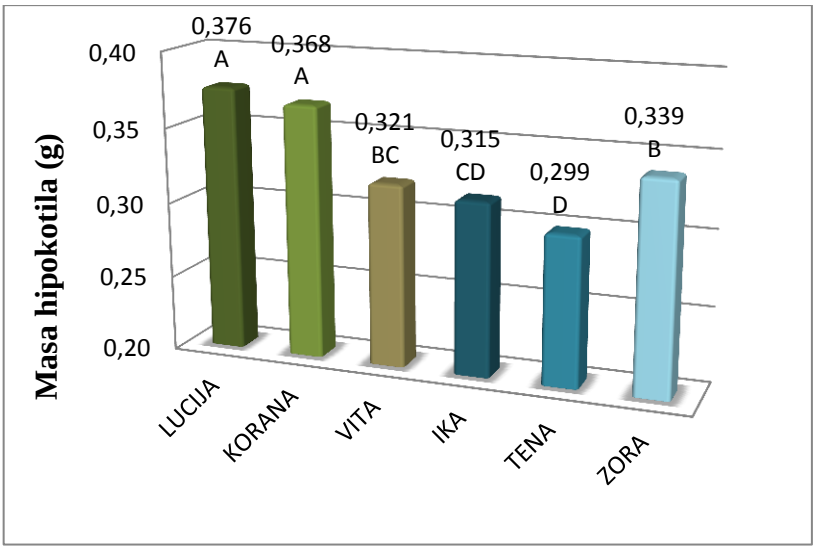
Masa klijanca (g)	Kontrola	10°C	30°C	50 mM NaCl	100 mM NaCl	5% PEG	10% PEG	F test - tretman	*P*-tretman
LUCIJA	1,172 AB / X	0,853 A / Z	1,215 A / X	0,957 A / Y	0,632 A / Q	0,704 AB / W	0,533 A / R	589,56	<0,0001
KORANA	1,223 A / Y	0,782 B / W	1,286 A / X	0,908 AB / Z	0,652 A / R	0,717 A / Q	0,553 A / S	412,95	<0,0001
VITA	1,125 BC / X	0,756 BC / W	1,036 B / Y	0,890 BC / Z	0,629 A / Q	0,688 AB / WQ	0,530 A / R	155,13	<0,0001
IKA	0,978 E / Y	0,689 D / W	1,047 B / X	0,786 D / Z	0,525 B / R	0,605 C / Q	0,485 B / R	249,07	<0,0001
TENA	1,061 D / X	0,708 CD / W	0,932 C / Y	0,844 C / Z	0,564 B / Q	0,654 BC / W	0,527 A / Q	191,07	<0,0001
ZORA	1,081 CD / X	0,725 BCD / Z	1,038 B / X	0,845 C / Y	0,548 B / W	0,700 AB / Z	0,493 B / Q	336,49	<0,0001
F test - kultivar	31,53	14,75	51,98	18,11	24,36	9,49	13,34		
P-kultivar	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0001	<0,0001		

Tretman je vrlo značajno utjecao na masu klijanca kod šest kultivara soje (*Tablica 5.3.*). Uspoređujući tretmane, svi kultivari su imali najmanju masu klijanca pri tretmanu 10%

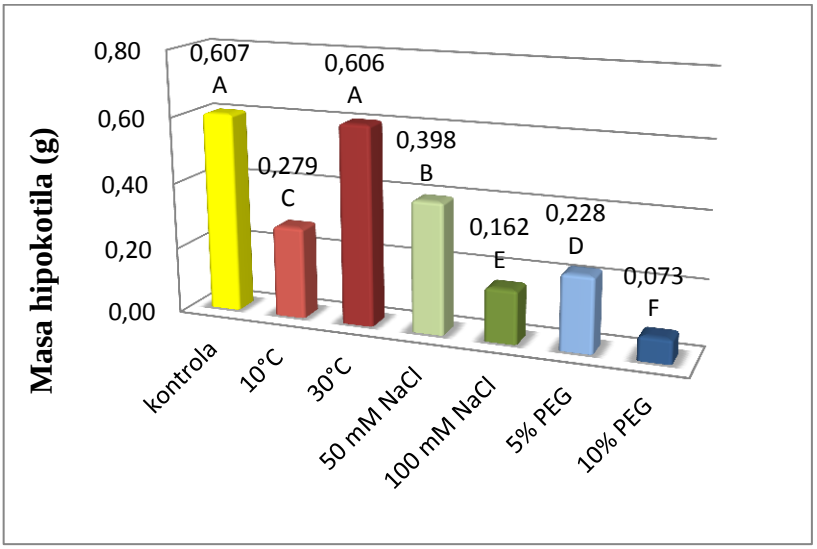
PEG-om. Najveću prosječnu masu klijanca su imale Vita, Tena i Zora na 20°C (kontrola), dok su Lucija, Korana i Ika imale na 30°C. Najviše vrijednosti mase klijanca svi kultivari su imali u kontroli i 30°C. Kod Vite i Tene pokazalo se značajno smanjenje mase klijanca u svim primijenjenim stresnim tretmanima u odnosu na kontrolu, dok su Korana i Ika imale značajno povećanje pri 30°C u usporedbi s kontrolom, a smanjenje kod svih ostalih tretmanima. Kod Lucije i Zore između kontrole i tretmana s 30°C nije bilo statistički značajne razlike, ali se u odnosu kontrole i ostalih tretmana pokazalo značajno smanjenje mase klijanca. Pri tretmanu 30°C masa klijanca je bila značajno veća u odnosu na tretman 10°C kod svih kultivara soje. Značajno smanjenje mase klijanca kod svih kultivara je utvrđeno pri tretmanu 100 mM NaCl-om u odnosu na tretman 50 mM NaCl-om te pri tretmanu 10% PEG-om u odnosu na tretman s 5% PEG-om.

5.1.1.3. Masa hipokotila klijanca soje

U prosjeku za sve tretmane utvrđen je vrlo značajan utjecaj kultivara na masu hipokotila klijanaca (*Tablica 5.1.*). Najveću masu hipokotila je imala Lucija (0,376 g), a nešto nižu masu Korana (0,368 g; *Slika 5.5.*), bez statističke značajnosti te razlike. Najmanju masu je imala Tena (0,299 g), a nešto veću Ika (0,315), također bez statističke značajnosti. Zora je imala masu hipokotila statistički značajno različitu od svih kultivara, osim Vite. Kultivar Vita se nije značajno razlikovao od Ike, ali se razlikovao od Tene.



Slika 5.5. Prosječna masa hipokotila (g), za sve tretmane, kod šest kultivara soje. Značajne razlike između kultivara soje označene su različitim slovima prema LSD testu (A,B,C,D: $P \leq 0{,}01$).



Slika 5.6. Prosječna masa hipokotila (g), za sve kultivare, po tretmanima. Značajne razlike između tretmana označene su različitim slovima prema LSD testu (A,B,C,D, E, F: $P \leq 0{,}01$).

Analizirajući prosječnu masu hipokotila klijanca u prosjeku svih kultivara po pojedinim tretmanima, tretman je vrlo značajno utjecao na masu hipokotila (*Tablica 5.1.*). Najveću masu hipokotila imali su prosječno kultivari u kontroli (0,607 g), a nešto manju masu (0,606 g) imali su kultivari pri 30°C (*Slika 5.6.*), bez statistički značajne razlike između te dvije varijante pokusa. Najnižu masu su kultivari imali pri 10% PEG-u (0,073 g). Vrijednost pri ovom tretmanu značajno se razlikuje od ostalih tretmana. Mase

hipokotila klijanca pri tretmanima 50 mM NaCl (0,398 g), 10°C (0,279 g), 5% PEG (0,228 g), 100 mM NaCl (0,162 g) značajno se razlikuju međusobno i u odnosu na preostale tretmane.

Najveću masu hipokotila klijanca je imala Korana pri temperaturnom tretmanu 30°C (0,721 g), a najmanju masu je imala Vita pri 10% PEG-u (0,065 g). Utvrđen je vrlo značajan utjecaj kultivara na masu hipokotila kod kontrole, temperaturnih tretmana, tretmana sa NaCl-om i pri tretmanu 5% PEG-om (*Tablica 5.4.*). Pri tretmanu 10% PEG-om nije utvrđen značajan utjecaj kultivara na masu hipokotila. U optimalnim uvjetima Korana (0,688 g) je imala najveću masu, a Ika najmanju masu (0,547 g) hipokotila. Između Korane, Lucije i Zore nije bilo značajne razlike u kontroli, kao ni između Ike, Vite, Tene i Zore. Uspoređujući kultivare pri pojedinim tretmanima, masa hipokotila najveća je pri tretmanu 10°C kod Lucije, pri tretmanu 30°C kod Korane, pri tretmanu 50 mM NaCl-om kod Lucije, pri tretmanu 100 mM NaCl-om kod Korane, pri tretmanu 5% PEG-om kod Zore, te pri tretmanu 10% PEG-om kod Ike. Pri nižoj i višoj razini temperaturnog stresa najmanju masu je imala Tena. Pri tretmanu 50 mM NaCl-om najmanju masu je imala Ika, a pri tretmanu 100 mM NaCl-om Tena. Vita je imala najmanju masu hipokotila klijanca pri tretmanima 5% i 10% PEG-om. Pri tretmanu 10°C Lucija je imala značajno najveću masu hipokotila, dok je Tena imala značajno najmanju masu. Pri tretmanu 30°C Korana se nije značajno razlikovala od Lucije, a Tena od Vite, Ike i Zore. Pri tretmanu s 50 mM NaCl-om Lucija se značajno razlikovala od ostalih kultivara koji se međusobno nisu značajno razlikovali. Korana se pri tretmanu s 100 mM NaCl-om nije značajno razlikovala od Lucije i Vite, a Tena od Ike. Masa hipokotila kod Korane pri tretmanu 5% PEG-om se nije značajno razlikovala od mase hipokotila ostalih kultivara. Zora se pri istom tretmanu značajno razlikovala od Lucije, Vite, Ike i Tene koje se međusobno nisu značajno razlikovale.

F testom je utvrđen vrlo značajan utjecaj tretmana na masu hipokotila klijanca šest kultivara soje (*Tablica 5.4.*). Uspoređujući tretmane kod pojedinog kultivara, svi kultivari su imali najmanju masu hipokotila pri tretmanu 10% PEG-om. Svi kultivari su imali najveću masu hipokotila u kontroli i pri tretmanu 30°C. Kod svih kultivara se pokazalo značajno smanjenje mase hipokotila kod svih tretmana u odnosu na kontrolu, osim kod 30°C. Pri tretmanu 30°C značajno smanjenje mase hipokotila u odnosu na kontrolu je imala Tena, povećanje mase je imala Lucija, dok kod Korane, Vite, Ike i

Zore nije bilo značajne razlike. Svi kultivari su pokazali značajno povećanje mase hipokotila pri tretmanu 30°C u odnosu na tretman 10°C. Značajno smanjenje mase hipokotila klijanca imale su svi kultivari pri tretmanu 100 mM NaCl-om u odnosu na tretman 50 mM NaCl-om, kao i pri tretmanu 10% PEG-om u odnosu na tretman 5% PEG-om.

Tablica 5.4. Značajnost utjecaja kultivara i tretmana na prosječnu masu hipokotila klijanca soje (podaci su izraženi u g; podaci su prosjek četiri ponavljanja; ANOVA, F test; prosjeci kultivara označenih istim slovom ne razlikuju se prema LSD testu (A,B,C,D: $P \leq 0{,}01$); prosjeci tretmana označenih istim slovom ne razlikuju se prema LSD testu (X,Y,Z,W,Q,R: $P \leq 0{,}01$)).

Masa hipokotila (g)	Kontrola	10°C	30°C	50 mM NaCl	100 mM NaCl	5% PEG	10% PEG	F test - tretman	*P*- tretman
LUCIJA	0,645 AB / Y	0,378 A / W	0,682 AB / X	0,456 A / Z	0,183 A / Q	0,214 B / Q	0,073 / R	748,56	<0,0001
KORANA	0,688 A / X	0,276 BC / Z	0,721 A / X	0,390 B / Y	0,186 A / W	0,247 AB / ZW	0,067 / Q	133,01	<0,0001
VITA	0,586 BC / X	0,245 D / Z	0,575 CD / X	0,400 B / Y	0,181 A / W	0,200 B / ZW	0,065 / Q	202,41	<0,0001
IKA	0,547 C / X	0,302 B / Z	0,562 CD / X	0,367 B / Y	0,140 C / Q	0,204 B / W	0,082 / R	346,21	<0,0001
TENA	0,572 BC / X	0,213 E / W	0,490 C / Y	0,390 B / Z	0,134 C / Q	0,217 B / W	0,076 / R	299,22	<0,0001
ZORA	0,607 ABC / X	0,260 CD / Z	0,606 BC / X	0,386 B / Y	0,152 B / W	0,289 A / Z	0,075 / Q	266,37	<0,0001
F test - kultivar	5,76	73,20	13,30	9,36	66,22	7,67	1,73		
P- kultivar	0,0024	<0,0001	<0,0001	0,0002	<0,0001	0,0005	0,1798		

5.1.2. Fiziološka svojstva

5.1.2.1. Neenzimski pokazatelji stresa kod soje u fenološkoj fazi klijanje-nicanje

Analizom dobivenih rezultata ocijenjen je utjecaj kultivara, tretmana i njihove interakcije na neenzimske pokazatelje stresa soje u fenofazi klijanje-nicanje. Mjereni pokazatelji neenzimskih fizioloških svojstava u tkivu hipokotila klijanaca (sadržaj vodikovog peroksida, sadržaj ukupnih fenola, sadržaj slobodnog prolina i intenzitet lipidne peroksidacije) bili su, prema vrijednostima F testa, pod vrlo značajnim utjecajem kultivara, tretmana te interakcije kultivar x tretman (*Tablica 5.5.*).

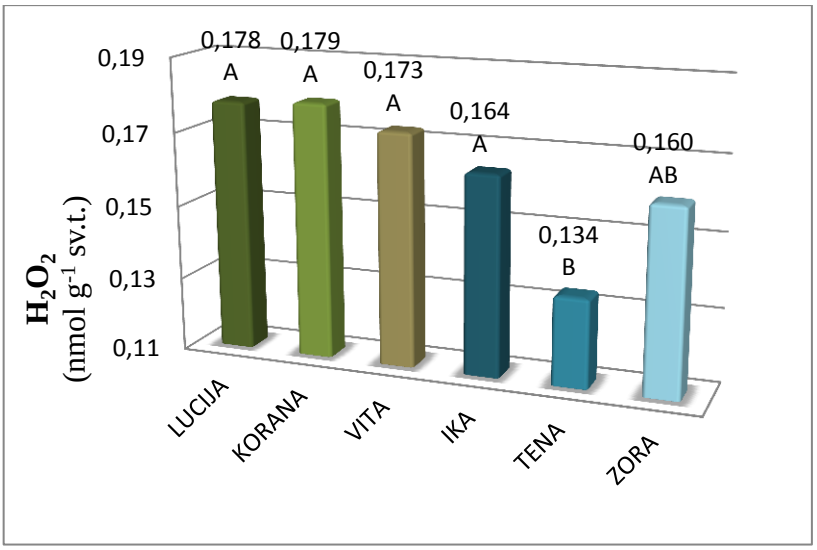
Tablica 5.5. Značajnost utjecaja kultivara i tretmana na pokazatelje fizioloških svojstava (H_2O_2 = sadržaj vodikovog peroksida; LP = intenzitet lipidne peroksidacije; Prolin = sadržaj slobodnog prolina; Fenoli = sadržaj ukupnih fenola) u tkivu hipokotila klijanaca soje (prikazani podaci su izračunate razine značajnosti (*P*) prema F testu).

		H_2O_2	LP	Prolin	Fenoli
KULTIVAR (A)	F test	4,78	22,11	26,05	5,90
	P	0,0005	<0,0001	<0,0001	<0,0001
TRETMAN (B)	F test	38,58	1060,61	560,32	319,60
	P	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
INTERAKCIJA (AxB)	F test	2,49	6,76	16,80	6,35
	P	0,0002	<0,0001	<0,0001	<0,0001

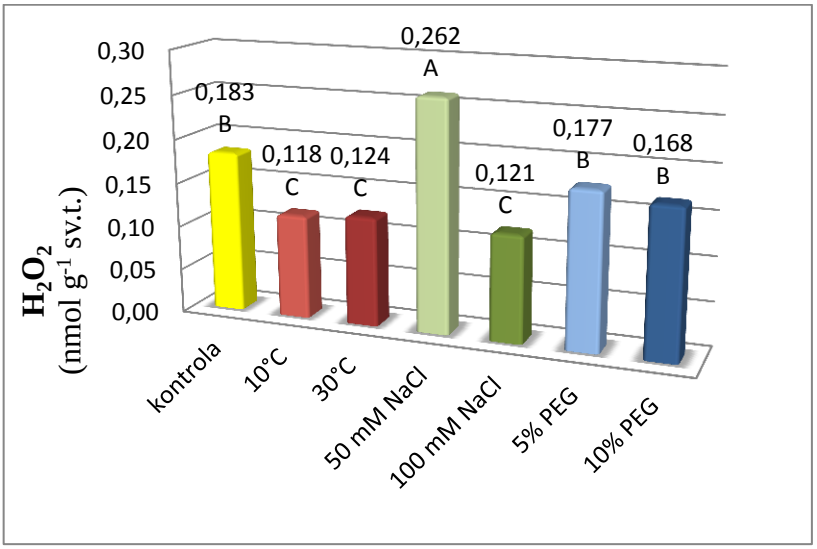
5.1.2.1.1. Sadržaj vodikovog peroksida u tkivu hipokotila klijanaca soje

U prosjeku za sve tretmane kultivar je vrlo značajno utjecao na sadržaj vodikovog peroksida (H_2O_2) u tkivu hipokotila klijanaca (*Tablica 5.5.*). Korana je, u prosjeku za sve tretmane, imala najveći sadržaj H_2O_2 (0,179 nmol g^{-1} sv.t.), a Tena najmanji (0,134 nmol g^{-1} sv.t.; *Slika 5.7.*). Nije bilo značajne razlike između Korane, Lucije, Vite, Ike i Zore. Sadržaj vodikovog peroksida kod Tene bio je značajno niži u odnosu na Koranu, Luciju, Vitu i Iku, no nije bio značajno različit od Zore.

Također, tretman je vrlo značajno utjecao na sadržaj vodikovog peroksida u tkivu hipokotila klijanaca u prosjeku za sve kultivare (*Tablica 5.5.*). Najveći utvrđeni sadržaj H_2O_2, u prosjeku za sve kultivare, je pri tretmanu 50 mM NaCl-om, te se značajno razlikuje od ostalih tretmana (*Slika 5.8.*). Najmanji sadržaj H_2O_2 imali su kultivari pri temperaturnom tretmanu 10°C (0,118 nmol g^{-1} sv.t.), a nešto veću vrijednost sadržaja H_2O_2 imali su kultivari pri tretmanima 100 mM i 30°C. Između navedenih tretmana nije bilo značajne razlike. Vrijednosti sadržaja H_2O_2 pri tretmanima više i niže razine osmotskog stresa nisu se značajno razlikovale od kontrole.



Slika 5.7. Prosječan sadržaj vodikovog peroksida (H_2O_2; nmol g^{-1} sv.t.), za sve tretmane, u tkivu hipokotila klijanaca šest kultivara soje. Značajne razlike između kultivara soje označene su različitim slovima prema LSD testu (A,B: $P \leq 0,01$).



Slika 5.8. Prosječan sadržaj vodikovog peroksida (H_2O_2; nmol g^{-1} sv.t.), za sve kultivare, po tretmanima, u tkivu hipokotila klijanaca. Značajne razlike između tretmana označene su različitim slovima prema LSD testu (A,B,C: $P \leq 0,01$).

Najveći sadržaj vodikovog peroksida je imala Korana pri tretmanu 50 mM NaCl (0,350 nmol g^{-1} sv.t.), a najmanji Tena pri tretmanu 10°C (0,087 nmol g^{-1} sv.t.). Utjecaj kultivara na sadržaj vodikovog peroksida u tkivu hipokotila klijanaca soje bio je vrlo značajan kod tretmana natrijevim kloridom koncentracije 50 mM i značajan kod

tretmana 10%-tnim PEG-om (*Tablica 5.6.*), dok kod ostalih tretmana nije bilo značajne razlike.

U optimalnim uvjetima (kontrola) Tena je imala najmanji (0,136 nmol g^{-1} sv.t.), a Zora najveći (0,232 nmol g^{-1} sv.t.) sadržaj H_2O_2. Pri tretmanu 10°C i 30°C najmanji sadržaj H_2O_2 je imala Tena. Najveći sadržaj H_2O_2 pri tretmanu 10°C imala je Zora a pri 30°C Ika. Pri tretmanu 50 mM NaCl-om najveći sadržaj H_2O_2 je imala Korana, te nešto manji Vita, Lucija i Zora. Između njih nije bilo statistički značajne razlike. Pri istom tretmanu najmanji sadržaj H_2O_2 je imala Tena (0,150 nmol g^{-1} sv.t.) i nešto veći Ika, ali između njih također nije bilo značajne razlike. Pri tretmanima 100 mM NaCl-om i 5% PEG-om najveći sadržaj vodikovog peroksida je imala Vita, a najmanji Zora. Pri tretmanu 10% PEG-om najveći sadržaj je imala Lucija (0,211 nmol g^{-1} sv.t.) te se statistički značajno razlikovala od Korane, Vite, Ike, Tene i Zore prema LSD testu pri $P \leq 0,05$. Najmanji sadržaj H_2O_2 pri ovom tretmanu imala je Zora (0,149 nmol g^{-1} sv.t.). Korana, Vita, Ika, Tena i Zora se pri navedenom tretmanu međusobno nisu značajno razlikovale.

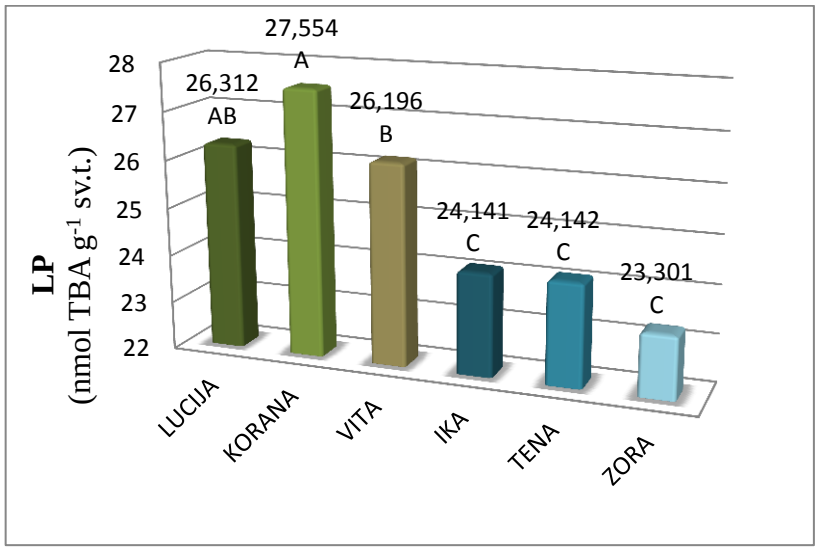
Tablica 5.6. Značajnost utjecaja kultivara i tretmana na sadržaj vodikovog peroksida u tkivu hipokotila klijanaca soje (podaci su izraženi u nmol g^{-1} sv.t.; podaci su prosjek četiri ponavljanja; ANOVA, F test; prosjeci kultivara označenih istim slovom ne razlikuju se prema LSD testu (a,b $P \leq 0,05$; A,B: $P \leq 0,01$); prosjeci tretmana označenih istim slovom ne razlikuju se prema LSD testu (X,Y,Z: $P \leq 0,01$)).

H_2O_2 (nmol g^{-1} sv.t.)	Kontrola	10°C	30°C	50 mM NaCl	100 mM NaCl	5% PEG	10% PEG	F test - tretman	*P*- tretman
LUCIJA	0,186 / YZ	0,104 / W	0,126 / ZW	0,277 A / X	0,142 / YZW	0,197 / YZ	0,211 a / XY	9,60	<0,0001
KORANA	0,183 / Y	0,131 / Y	0,144 / Y	0,350 A / X	0,126 / Y	0,150 / Y	0,167 b / Y	21,28	<0,0001
VITA	0,179 / YZ	0,114 / Z	0,112 / Z	0,285 A / X	0,146 / YZ	0,214 / XY	0,159 b / YZ	6,22	0,0007
IKA	0,181 / Y	0,123 / YZ	0,158 / YZ	0,251 AB / X	0,107 / Z	0,174 / Y	0,154 b / YZ	8,07	0,0001
TENA	0,136 / XYZ	0,087 / Z	0,099 / Z	0,150 B / XYZ	0,108 / YZ	0,191 / X	0,167 b / XY	5,78	0,0011
ZORA	0,232 / XY	0,148 / YZ	0,105 / Z	0,257 A / X	0,095 / Z	0,134 / YZ	0,149 b / YZ	5,70	0,0012
F test - kultivar	1,53	1,73	1,50	6,29	1,98	1,52	4,14		
P- kultivar	0,2306	0,1777	0,2387	0,0015	0,1298	0,2319	0,0111		

Utvrđen je vrlo značajan utjecaj tretmana na sadržaj H_2O_2 u tkivu hipokotila kod svih ispitivanih kultivara soje (*Tablica 5.6.*). LSD testom kod Lucije je utvrđeno značajno smanjenje sadržaja H_2O_2 pri tretmanu 10°C (najmanji sadržaj H_2O_2), te povećanje pri tretmanu 50 mM NaCl-om (najveći sadržaj H_2O_2) u odnosu na kontrolu. Usporedbom tretmana, Korana, Vita i Ika su imale najveći sadržaj H_2O_2 pri tretmanu 50 mM NaCl-om, te u odnosu sa kontrolom imale su značajno povećanje sadržaja H_2O_2 na navedenom tretmanu. Zora je imala najveći sadržaj pri tretmanu 50 mM NaCl-om, a najmanji pri 100 mM NaCl-u (0,095 nmol g^{-1} sv.t.) i 30°C (0,105 nmol g^{-1} sv.t.). Kod Zore je utvrđeno značajno smanjenje sadržaja pri tretmanima 100 mM NaCl-u i 30°C u odnosu na kontrolu. Tena je imala najmanji sadržaj H_2O_2 pri 10°C, a najveći pri višoj i nižoj razini osmotskog stresa, te pri 50 mM NaCl-u. Između kontrole i tretmana 50 mM NaCl-a, 5% PEG-a i 10% PEG-a kod ovog kultivara nije bilo značajne razlike. Između tretmana 10°C i 30°C, te 5% i 10% PEG-om kod svih kultivara nije bilo značajne razlike. Kod svih kultivara osim Tene utvrđeno je značajno smanjenje sadržaja H_2O_2 pri tretmanu 100 mM NaCl-om u odnosu na tretman 50 mM NaCl-om.

5.1.2.1.2. Intenzitet lipidne peroksidacije u tkivu hipokotila klijanaca soje

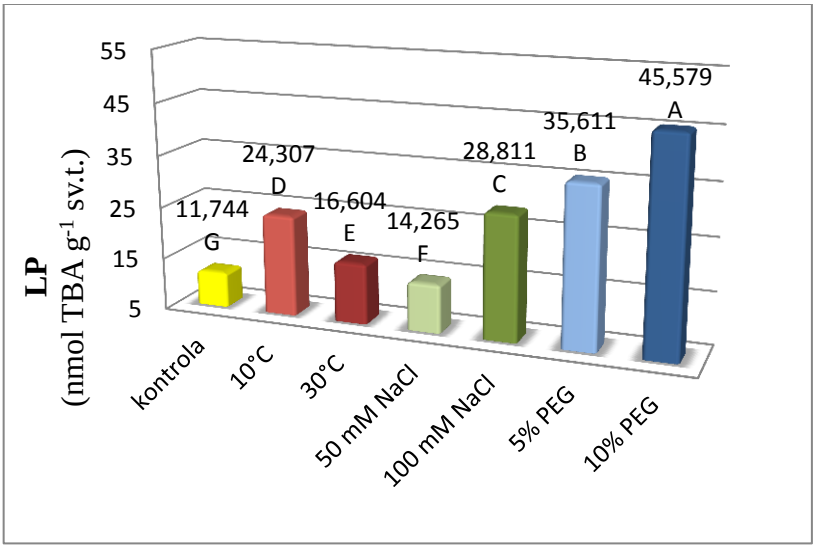
Analizirajući rezultate po tretmanima za pojedini kultivar, kultivar je vrlo značajno utjecao na intenzitet lipidne peroksidacije (LP) u tkivu hipokotila klijanaca (*Tablica 5.5.*). U prosjeku za sve tretmane, najveći intenzitet LP imala je Korana (27,554 $nmol_{TBA}$ g^{-1} sv.t.), a najmanju Zora (23,301 $nmol_{TBA}$ g^{-1} sv.t.; *Slika 5.9.*). Između Korane i Lucije nije bilo značajne razlike, ali je utvrđeno značajno smanjenje intenziteta LP kod Vite u odnosu na Koranu. Između Lucije i Vite nije bilo značajne razlike. Ika, Tena i Zora pokazale su značajno smanjenje intenziteta LP u odnosu na ostale kultivare, ali se međusobno nisu razlikovale.



Slika 5.9. Prosječne vrijednosti intenziteta lipidne peroksidacije (LP; $nmol_{TBA}$ g^{-1} sv.t.), za sve tretmane, u tkivu hipokotila klijanaca šest kultivara soje. Značajne razlike između kultivara soje označene su različitim slovima prema LSD testu (A,B,C: $P \leq 0,01$).

Analizirajući prosječne vrijednosti svih kultivara po pojedinim tretmanima, tretman je vrlo značajno utjecao na intenzitet lipidne peroksidacije (LP) u tkivu hipokotila klijanaca (*Tablica 5.5.*). Najmanju vrijednost intenziteta LP imali su kultivari u kontrolnim uvjetima (11,744 $nmol_{TBA}$ g^{-1} sv.t.; *Slika 5.10.*). Pri svim ostalim tretmanima uočava se značajno povećanje LP u odnosu na kontrolu. Najveću vrijednost LP imali su kultivari pri tretmanu 10% PEG-om (45,579 $nmol_{TBA}$ g^{-1} sv.t.), što se značajno razlikuje od ostalih tretmana. Statistički značajno povećanje LP od kontrole do tretmana 10%

PEG-om je vidljivo slijedom tretmana 50 mM NaCl, 30°C, 10°C, 100 mM NaCl, 5% PEG. Između navedenih tretmana međusobno je bila značajna razlika.



Slika 5.10. Prosječne vrijednosti intenziteta lipidne peroksidacije (LP; $nmol_{TBA}$ g^{-1} sv.t.), za sve kultivare, po tretmanima, u tkivu hipokotila klijanaca. Značajne razlike između tretmana označene su različitim slovima prema LSD testu (A,B,C,D, E, F: $P \leq 0{,}01$).

Najveći intenzitet lipidne peroksidacije (LP) je imala Korana pri tretmanu 10% PEG-om (54,656 $nmol_{TBA}$ g^{-1} sv.t.), a najmanji Tena u kontroli (10,017 $nmol_{TBA}$ g^{-1} sv.t.). Utjecaj kultivara na intenzitet lipidne peroksidacije bio je vrlo značajan u kontroli i tretmanima 10°C, 30°C, 100 mM NaCl-om i 10% PEG-om te značajan pri tretmanu 50 mM NaCl-om (*Tablica 5.7.*). Utjecaj kultivara na intenzitet LP nije bio značajan pri tretmanu 5% PEG-om prema F testu. U kontroli je najveći intenzitet LP imala Ika (13,692 $nmol_{TBA}$ g^{-1} sv.t.), a najmanji Tena. Tena i Korana imaju značajno niži intenzitet LP od Ike. Između Zore, Lucije i Vite nema međusobne značajne razlike, kao ni između njih i ostalih kultivara. Pri tretmanu 10°C najveći intenzitet LP je imala Korana koja se značajno razlikovala od ostalih kultivara, a oni se međusobno nisu značajno razlikovali. Najmanji intenzitet LP pri navedenom tretmanu je imala Zora. Pri tretmanu 50 mM NaCl-om, 100 mM NaCl-om i 30°C Lucija je imala najveći intenzitet LP. Najmanji intenzitet LP pri tretmanu 30°C je imala Zora, pri 50 mM NaCl-om Ika, a pri 100 mM NaCl-om Tena. Pri tretmanu 30°C Lucija i Vita su imale značajno veći intenzitet od Zore, ali se nisu značajno razlikovale od Korane. Pri istom tretmanu Ika i

Tena se nisu značajno razlikovale od Zore i Korane. Pri tretmanu 50 mM NaCl-om, prema LSD testu uz $P \leq 0,05$, Lucija se nije značajno razlikovala od Korane, Vite i Tene, a Ika se nije značajno razlikovala od Zore. Između Korane, Vite, Tene i Zore nije bilo značajne razlike. Pri tretmanu 100 mM NaCl-om Vita se nije značajno razlikovala od nijednog kultivara, dok su Lucija i Korana imale značajno veći intenzitet LP od Ike, Tene i Zore. Pri tretmanu 5% PEG-om najveći intenzitet LP imala je Ika, a najmanji Zora. Pri tretmanu 10% PEG-om najveći intenzitet LP imala je Korana, a najmanji Ika. Korana se značajno razlikovala od svih kultivara prema intenzitetu LP, a Ika se nije značajno razlikovala od Tene i Zore. Vita je imala značajno niži intenzitet od Korane te značajno viši od Ike i nije se značajno razlikovala od Lucije i Tene. Pri svim tretmanima u kojima je kultivar značajno ili vrlo značajno utjecao na intenzitet LP, prema LSD testu između Zore i Tene nije bilo značajne razlike te su imale niži intenzitet LP. U uvjetima nižeg i višeg osmotskog stresa te višeg temperaturnog stresa Lucija, Korana i Vita su imale visoki intenzitet LP.

Tablica 5.7. Značajnost utjecaja kultivara i tretmana na intenzitet lipidne peroksidacije u tkivu hipokotila klijanaca soje (podaci su izraženi u nmol TBA g^{-1} sv.t.; podaci su prosjek četiri ponavljanja; ANOVA, F test; prosjeci kultivara označenih istim slovom ne razlikuju se prema LSD testu (a,b,c: $P \leq 0,05$; A,B,C,D: $P \leq 0,01$); prosjeci tretmana označenih istim slovom ne razlikuju se prema LSD testu (X,Y,Z,W,Q,R: $P \leq 0,01$)).

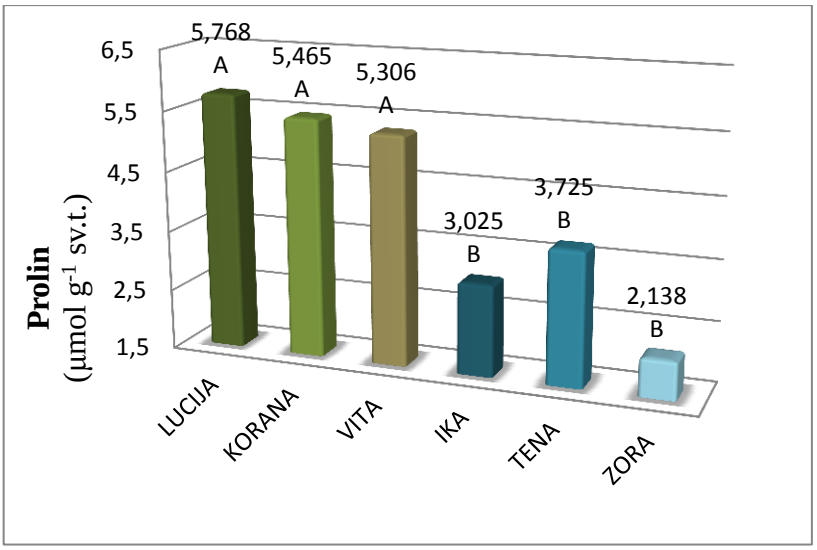
LP (nmol TBA g^{-1} sv.t.)	Kontrola	10°C	30°C	50 mM NaCl	100 mM NaCl	5% PEG	10% PEG	F test - tretman	*P*- tretman
LUCIJA	12,276 AB / Q	22,987 B / Z	18,429 A / ZW	15,598 a / WQ	32,672 A / Y	35,969 / Y	46,250 BC / X	115,68	<0,0001
KORANA	10,740 B / Q	28,947 A / Z	17,551 AB / W	14,373 ab / WQ	31,243 A / YZ	35,366 / Y	54,656 A / X	160,37	<0,0001
VITA	12,259 AB / R	23,127 B / W	18,361 A / Q	14,793 ab / R	29,463 AB / Z	37,108 / Y	48,264 B / X	289,25	<0,0001
IKA	13,692 A / WQ	23,538 B / Z	15,625 BC / W	12,595 c / Q	26,387 B / Y	38,349 / X	38,804 D / X	256,36	<0,0001
TENA	10,017 B / Q	24,312 B / Z	15,296 BC / W	14,893 ab / W	26,365 B / Z	34,679 / Y	43,435 BCD / X	205,06	<0,0001
ZORA	11,478 AB / Q	22,932 B / W	14,359 C / Q	13,339 bc / Q	26,734 B / Z	32,197 / Y	42,067 CD / X	191,39	<0,0001
F test - kultivar	4,80	10,54	6,65	3,88	7,78	2,23	21,69		
P- kultivar	0,0058	<0,0001	0,0011	0,0146	0,0005	0,0962	<0,0001		

F testom utvrđen je vrlo značajan utjecaj tretmana na intenzitet LP kod šest kultivara soje (*Tablica 5.7.*). Uspoređujući tretmane, najniži intenzitet LP je bio za sve kultivare osim Ike u kontrolnim uvjetima. Ika je imala najniži intenzitet pri tretmanu 50 mM NaCl-om, ali se on nije značajno razlikovao u odnosu na kontrolu. Svi kultivari osim Tene između kontrole i tretmana 50 mM NaCl-om nisu imali značajnu promjenu intenziteta LP. Kod Tene je uočljivo značajno povećanje intenziteta LP pri svim tretmanima u odnosu na kontrolu. Najveći intenzitet LP, značajno veći u odnosu na ostale tretmane i kontrolu, imali su svi kultivari pri tretmanu 10% PEG-om. Lucija, Korana i Vita imale su u odnosu na kontrolu značajno povećanje LP pri svim tretmanima, osim 50 mM NaCl-u. Ika i Zora su pokazale povećanje intenziteta LP u odnosu na kontrolu pri tretmanima 10°C, 100 mM NaCl-om, 5% i 10% PEG-om, dok kod 30°C i 50 mM NaCl-a nije bilo značajne razlike. Korana, Vita, Ika, Tena i Zora su imale značajno smanjenje intenziteta LP pri tretmanu 30°C u odnosu na tretman 10°C. Svi kultivari imali su značajno povećanje intenziteta LP pri tretmanu 100 mM NaCl-om u odnosu na tretman 50 mM NaCl-om. Lucija, Korana, Vita, Tena i Zora su imale značajno veći intenzitet LP pri tretmanu 10% PEG-om u odnosu na tretman 5% PEG-om.

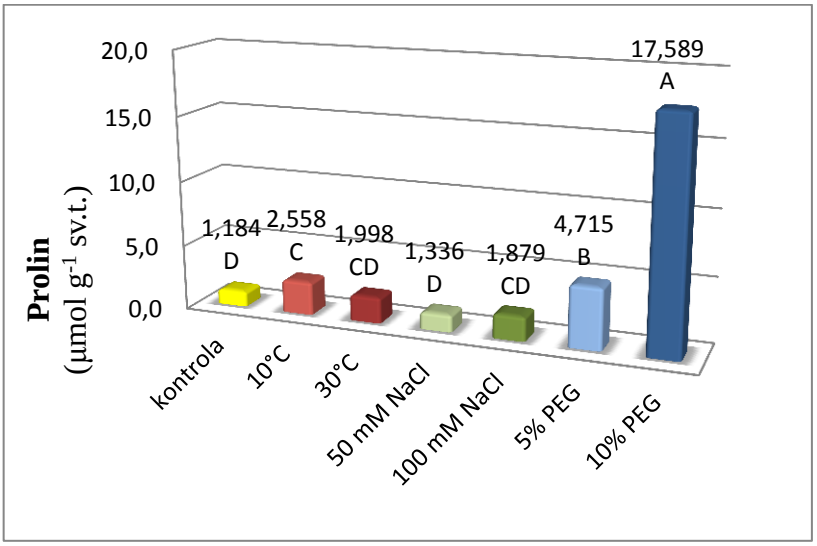
5.1.2.1.3. Sadržaj slobodnog prolina u tkivu hipokotila klijanaca soje

Analizirajući prosječne vrijednosti svih tretmana za pojedine kultivare, prema F testu kultivar je vrlo značajno utjecao na sadržaj slobodnog prolina u tkivu hipokotila klijanaca (*Tablica 5.5.*).

Lucija je, u prosjeku za sve tretmane, imala najveći sadržaj prolina u tkivu (5,768 μmol g^{-1} sv.t.), a nešto manji sadržaj imale su Korana i Vita (*Slika 5.11.*). Između Lucije, Korane i Vite nije bilo značajne razlike u sadržaju prolina. Najmanji sadržaj prolina, prosječno za sve tretmane, imala je Zora (2,138 μmol g^{-1} sv.t.), a od nje statistički značajno se nisu razlikovale Ika i Tena.



Slika 5.11. Prosječan sadržaj slobodnog prolina (µmol g^{-1} sv.t.), za sve tretmane, u tkivu hipokotila klijanaca šest kultivara soje. Značajne razlike između kultivara soje označene su različitim slovima prema LSD testu (A,B: $P \leq 0{,}01$).



Slika 5.12. Prosječan sadržaj slobodnog prolina (µmol g^{-1} sv.t.), za sve kultivare, po tretmanima, u tkivu hipokotila klijanaca. Značajne razlike između tretmana označene su različitim slovima prema LSD testu (A,B,C,D: $P \leq 0{,}01$).

Analizirajući prosječne vrijednosti svih kultivara pri pojedinom tretmanu, tretman je vrlo značajno utjecao na sadržaj prolina u tkivu hipokotila klijanaca (*Tablica 5.5.*). Najmanje prolina imali su prosječno kultivari u optimalnim uvjetima (1,184 µmol g^{-1} sv.t.), što se nije značajno razlikovalo od tretmana više i niže razine solnog stresa, te više razine temperaturnog stresa (*Slika 5.12.*). Značajno veći sadržaj prolina u odnosu na kontrolu imali su kultivari pri tretmanu s niskom temperaturom, no

tretmani s visokom temperaturom i većom koncentracijom NaCl-a se nisu značajno razlikovali od temperaturnog tretmana pri 10°C. Tretman s 10% PEG-om je imao, u prosjeku za sve kultivare, značajno najveći sadržaj prolina (17,589 μmol g^{-1} sv.t.). Tretman 5% PEG-om značajno se razlikovao od tretmana 10% PEG-om, ali i od ostalih tretmana koji su imali niži sadržaj prolina.

Najveći sadržaj slobodnog prolina u tkivu hipokotila klijanaca je imala Korana pri tretmanu 10% PEG-om (24,034 μmol g^{-1} sv.t.), a najmanji Ika u kontroli (0,977 μmol g^{-1} sv.t.). Utjecaj kultivara na sadržaj slobodnog prolina je vrlo značajan pri tretmanima s višom i nižom koncentracijom NaCl-a i PEG-a, dok pri temperaturnim tretmanima nije bio značajan (*Tablica 5.8.*). U optimalnim uvjetima (20°C) kultivar je značajno utjecao na sadržaj prolina u tkivu klijanaca, pri čemu je Ika imala najniži sadržaj prolina. Nešto veći sadržaj prolina imale su Lucija i Tena, ali se one značajno nisu razlikovale od Ike. Najveći sadržaj prolina u kontroli imala je Vita (1,335 μmol g^{-1} sv.t.) i ona se nije značajno razlikovala od Korane, Zore i Tene prema LSD testu uz $P \leq 0,05$. Najveći sadržaj prolina su imale Korana pri tretmanu 10°C i Vita pri tretmanu 30°C. Pri tretmanu 10°C najmanji sadržaj prolina je imala Ika, a pri 30°C Tena. Najveći sadržaj prolina su imale Vita pri tretmanu 50 mM NaCl-om, Lucija pri tretmanima 100 mM NaCl-om i 5% PEG-om, te Korana pri 10% PEG-u. Najmanji sadržaj prolina su imale Ika pri 50 mM NaCl-u i 10% PEG-u, Tena pri 100 mM NaCl-u, te Zora pri 5% PEG-u. Pri navedenim tretmanima Ika, Tena i Zora se nisu značajno razlikovale, te su imale niži sadržaj prolina od Lucije i Korane. Pri tretmanu 50 mM NaCl-om Korana se nije značajno razlikovala od ostalih kultivara, a Vita je imala značajno veći sadržaj prolina od Lucije, Tene, Zore i Ike. Pri tretmanu 100 mM NaCl-om Lucija je imala značajno veći sadržaj prolina od ostalih kultivara koji se međusobno nisu značajno razlikovali. Korana se pri tretmanu 5% PEG-om nije značajno razlikovala od ostalih kultivara, no Lucija je imala značajno veći sadržaj prolina od Vite, Ike, Tene i Zore. Lucija, Korana i Vita su imale značajno veći sadržaj prolina pri tretmanu 10% PEG-om od Ike, Tene i Zore.

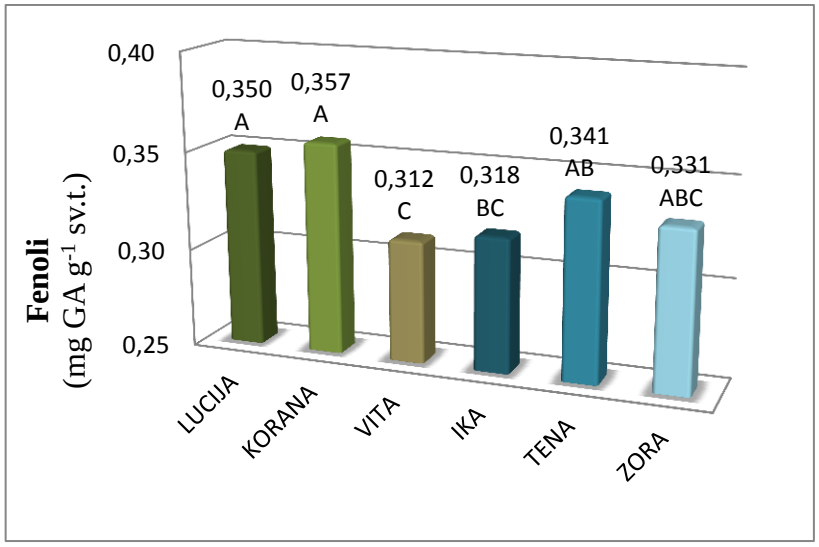
Tablica 5.8. Značajnost utjecaja kultivara i tretmana na sadržaj slobodnog prolina u tkivu hipokotila klijanaca soje (podaci su izraženi u μmol g^{-1} sv.t.; podaci su prosjek četiri ponavljanja; ANOVA, F test; prosjeci kultivara označenih istim slovom ne razlikuju se prema LSD testu (a,b: $P \leq 0{,}05$; A,B: $P \leq 0{,}01$); prosjeci tretmana označenih istim slovom ne razlikuju se prema LSD testu (X,Y,Z: $P \leq 0{,}01$)).

Prolin (μmol g^{-1} sv.t.)	Kontrola	10°C	30°C	50 mM NaCl	100 mM NaCl	5% PEG	10% PEG	F test - tretman	*P*- tretman
LUCIJA	0,994 b / W	2,498 / ZW	2,148 / ZW	1,296 B / W	2,951 A / Z	6,806 A / Y	23,680 A / X	460,62	<0,0001
KORANA	1,299 a / Z	2,819 / YZ	1,788 / Z	1,369 AB / Z	1,975 B / Z	4,971 AB / Y	24,034 A / X	233,60	<0,0001
VITA	1,335 a / Z	2,397 / YZ	2,285 / YZ	1,627 A / YZ	1,698 B / YZ	4,913 B / Y	22,888 A / X	83,31	<0,0001
IKA	0,977 b / Z	2,396 / YZ	2,061 / YZ	1,202 B / Z	1,745 B / Z	4,131 B / Y	8,666 B / X	25,00	<0,0001
TENA	1,215 ab / Z	2,572 / YZ	1,733 / Z	1,259 B / Z	1,260 B / Z	3,966 B / Y	14,069 B / X	77,60	<0,0001
ZORA	1,281 a / Y	2,664 / Y	1,976 / Y	1,265 B / Y	1,643 B / Y	3,504 B / Y	12,196 B / X	31,06	<0,0001
F test - kultivar	3,10	0,98	1,30	4,82	6,59	6,33	20,04		
P- kultivar	0,0343	0,4579	0,3070	0,0057	0,0012	0,0015	<0,0001		

Utvrđen je vrlo značajan utjecaj tretmana na sadržaj prolina istraživanih kultivara soje (*Tablica 5.8.*). Uspoređujući tretmane kod pojedinih kultivara, vidljivo je da su svi kultivari osim Zore imali najmanji sadržaj prolina u kontroli, a značajno najveći pri tretmanu 10% PEG-om. Kod svih kultivara nije bilo značajnog porasta pri tretmanima 10°C, 30°C i 50 mM NaCl-a u odnosu na kontrolu. Lucija je pri tretmanima 100 mM NaCl-a, 5% i 10% PEG-om imala značajno povećanje sadržaja prolina u odnosu na kontrolu. Korana, Vita, Ika i Tena u odnosu na kontrolu su imale značajno povećanje pri višoj i nižoj razini osmotskog stresa. Zora je jedino značajno povećanje u odnosu na kontrolu imala pri tretmanu 10% PEG-om. Kod svih kultivara nije bilo značajne razlike između tretmana 10°C i 30°C. Lucija je imala značajno veći sadržaj prolina pri tretmanu 100 mM NaCl-om u odnosu na tretman 50 mM NaCl-om. Između tretmana više i niže razine solnog stresa kod ostalih kultivara nije bilo značajne razlike. Značajno povećanje sadržaja prolina kod svih kultivara bilo je na tretmanu 10% PEG-om u odnosu na tretman 5% PEG-om.

5.1.2.1.4. Sadržaj ukupnih fenola u tkivu hipokotila klijanaca soje

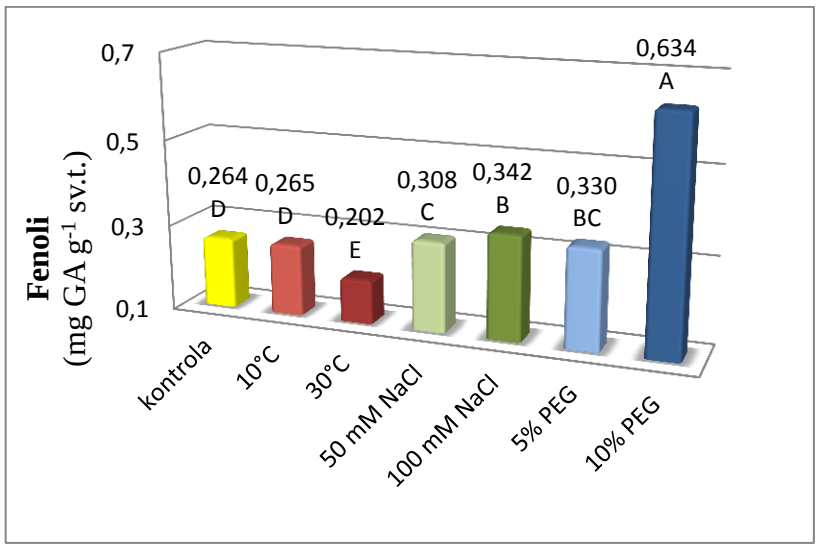
Analizirajući rezultate svih tretmana za pojedini kultivar, prema F testu kultivar je vrlo značajno utjecao na sadržaj ukupnih fenola u tkivu hipokotila klijanaca (*Tablica 5.5.*). Korana je, u prosjeku za sve tretmane, imala najveći sadržaj ukupnih fenola u tkivu hipokotila (0,357 mg GA g^{-1} sv.t.; *Slika 5.13.*). Lucija, Tena i Zora su imale nešto niže vrijednosti sadržaja ukupnih fenola, ali ne statistički značajno niže u odnosu na Koranu. Vita je imala najniži sadržaj fenola (0,312 mg GA g^{-1} sv.t.) koji se nije značajno razlikovao od Ike i Zore. Između Ike, Zore i Tene nije bilo značajne razlike, no Ika je imala značajno niži sadržaj u odnosu na Luciju i Koranu. Tena je imala značajno viši sadržaj u odnosu na Vitu, a Zora se nije značajno razlikovala od nijednog kultivara.



Slika 5.13. Prosječan sadržaj ukupnih fenola (mg GA g^{-1} sv.t.), za sve tretmane, u tkivu hipokotila klijanaca šest kultivara soje. Značajne razlike između kultivara soje označene su različitim slovima prema LSD testu (A,B,C: $P \leq 0,01$).

U prosjeku za sve kultivare, tretman je vrlo značajno utjecao na sadržaj ukupnih fenola u tkivu hipokotila klijanaca (*Tablica 5.5.*). Najniži sadržaj fenola imali su prosječno kultivari pri tretmanu 30°C (0,202 mg GA g^{-1} sv.t.) te su se vrijednošću značajno razlikovali od ostalih tretmana (*Slika 5.14.*). Nešto veći sadržaj fenola bio je u kontroli koja se nije značajno razlikovala od tretmana pri 10°C. Tretmani pri višoj i nižoj razini solnog stresa imali su vrlo značajno veći sadržaj fenola u odnosu na kontrolu. Kultivari su u uvjetima više razine solnog stresa imali značajno veći sadržaj fenola od onoga u

uvjetima nižeg solnog stresa. Sadržaj fenola pri 50 mM i 100 mM NaCl-u nije se značajno razlikovao od tretmana 5% PEG-om, ali su imali značajno niži sadržaj fenola od tretmana 10% PEG-om. Sadržaj fenola pri tretmanu 10% PEG-om bio je značajno veći od sadržaja pri tretmanu 5% PEG-om, ali i od ostalih tretman.



Slika 5.14. Prosječan sadržaj ukupnih fenola (mg GA g^{-1} sv.t.), za sve kultivare, po tretmanima, u tkivu hipokotila klijanaca. Značajne razlike između tretmana označene su različitim slovima prema LSD testu (A,B,C,D, E: $P \leq 0{,}01$).

Najveći sadržaj ukupnih fenola imala je Lucija pri tretmanu 10% PEG-om (0,738 mg GA g^{-1} sv.t.), a najmanji Vita u kontroli (0,173 mg GA g^{-1} sv.t.; *Tablica 5.9.*). Utjecaj kultivara na ukupni sadržaj fenola je vrlo značajan u kontroli i tretmanima 10°C, 50 mM NaCl-om i 5% PEG-om, a značajan pri tretmanu 100 mM NaCl-om. Pri tretmanima 30°C i 10% PEG-om nije bilo značajnog utjecaja kultivara. U kontrolnim uvjetima najveći sadržaj fenola je imala Tena (0,386 mg GA g^{-1} sv.t.), a najmanji Vita. Vita, Lucija i Ika se međusobno nisu značajno razlikovale u sadržaju fenola, ali su imale značajno manji sadržaj od Korane i Tene. Korana je u odnosu na Tenu imala značajno niži sadržaj fenola u tkivu hipokotila klijanaca. U uvjetima snižene temperature najveći sadržaj fenola imala je Zora, a najmanji Tena. Pri istom tretmanu, od Zore značajno niži sadržaj fenola imala je Korana, a od njih značajno niži sadržaj su imale Ika i Lucija. Između Tene i Vite nije bilo značajne razlike. Pri tretmanu 30°C najveći sadržaj fenola imala je Lucija, a najmanji Korana. Uspoređujući kultivare po pojedinim tretmanima, Korana je imala najveći sadržaj fenola pri tretmanima 50 mM i 100 mM NaCl-a, dok je

najmanji sadržaj imala Zora pri tretmanu 50 mM NaCl-om, a Ika pri 100 mM NaCl-om. Pri tretmanu 50 mM NaCl-om Ika se nije značajno razlikovala od Korane, značajno niži sadržaj fenola od njih imale su Lucija, Vita i Tena koje se međusobno nisu značajno razlikovale. Zora je imala značajno najniži sadržaj fenola od svih kultivara pri navedenom tretmanu. Između Ike, Zore i Vite pri tretmanu 100 mM NaCl-om nije bilo značajne razlike prema LSD testu ($P \leq 0,05$). Pri istom tretmanu, Korana se nije značajno razlikovala od Lucije i Tene, ali ni od Vite i Zore. Pri tretmanu 5% PEG-om najveći sadržaj fenola imala je Lucija, a najmanji Zora. Lucija se nije značajno razlikovala od Korane, a Zora se nije značajno razlikovala od Vite, Ike, Tene i Korane. Pri tretmanu 10% PEG-om Lucija je imala najviši, a Ika najmanji sadržaj fenola.

Tablica 5.9. Značajnost utjecaja kultivara i tretmana na sadržaj ukupnih fenola u tkivu hipokotila klijanaca soje (podaci su izraženi u mg GA g^{-1} sv.t.; podaci su prosjek četiri ponavljanja; ANOVA, F test; prosjeci kultivara označenih istim slovom ne razlikuju se prema LSD testu (a,b: $P \leq 0,05$; A,B,C,D,E: $P \leq 0,01$); prosjeci tretmana označenih istim slovom ne razlikuju se prema LSD testu (X,Y,Z,W,Q: $P \leq 0,01$)).

Fenoli (mg GA g^{-1} sv.t.)	Kontrola	10°C	30°C	50 mM NaCl	100 mM NaCl	5% PEG	10% PEG	F test - tretman	*P*- tretman
LUCIJA	0,214 D / Z	0,248 CD / Z	0,217 / Z	0,315 B / Y	0,354 a / Y	0,366 A / Y	0,738 / X	131,54	<0,0001
KORANA	0,303 B / YZ	0,279 B / Z	0,187 / W	0,367 A / YZ	0,379 a / Y	0,339 AB / YZ	0,642 / X	38,21	<0,0001
VITA	0,173 D / W	0,234 DE / ZW	0,197 / W	0,309 B / YZ	0,335 ab / Y	0,332 B / Y	0,605 / X	40,29	<0,0001
IKA	0,224 CD / WQ	0,252 C / ZWQ	0,210 / Q	0,365 A / Y	0,295 b / YZW	0,327 B / YZ	0,554 / X	35,09	<0,0001
TENA	0,386 A / Y	0,229 E / W	0,204 / W	0,279 B / ZW	0,358 a / YZ	0,312 B / YZ	0,619 / X	48,05	<0,0001
ZORA	0,282 BC / Z	0,347 A / Y	0,193 / W	0,212 C / W	0,333 ab / Y	0,306 B / YZ	0,645 / X	181,21	<0,0001
F test - kultivar	25,66	129,04	2,67	34,71	3,27	6,83	1,98		
P- kultivar	<0,0001	<0,0001	0,0564	<0,0001	0,0284	0,0010	0,1307		

Utvrđen je vrlo značajan utjecaj tretmana na sadržaj fenola kod šest kultivara soje (*Tablica 5.9.*). Najveći sadržaj fenola svi kultivari su imali pri tretmanu 10% PEG-om, koji je bio značajno veći od kontrole i ostalih tretmana. Uspoređujući tretmane, najmanji sadržaj fenola su imale Lucija i Vita u kontroli, Korana, Ika, Tena i Zora pri tretmanu 30°C. Lucija, Vita i Ika nisu pokazale značajne razlike između kontrole i

tretmana 30°C. Tena je imala u odnosu na kontrolu značajno smanjenje sadržaja fenola pri tretmanima niže koncentracije NaCl-om te niže i više temperature. Zora je u odnosu na kontrolu pokazala značajno povećanje sadržaja fenola pri tretmanima 10°C i 100 mM NaCl-om, te smanjenje pri tretmanima 30°C i 50 mM NaCl-om. Kod Korane i Zore je pri tretmanu 30°C u odnosu na kontrolu utvrđeno značajno smanjenje sadržaja fenola. Ika je imala značajno povećanje u odnosu na kontrolu kod tretmana 50 mM NaCl-om i 5% PEG-om, a Vita i Lucija kod tretmana 5% PEG-om, 50 mM i 100 mM NaCl-om. U odnosu na tretman 10°C svi kultivari su imali smanjenje sadržaja ukupnih fenola pri tretmanu 30°C, no kod Korane i Zore to smanjenje je bilo značajno. Kod svih kultivara osim Zore nije bilo značajne razlike između tretmana 50 mM i 100 mM NaCl-om. Kod Zore sadržaj fenola pri tretmanu 100 mM NaCl-om bio je značajno veći u odnosu na sadržaj pri tretmanu 50 mM NaCl-om. Pri tretmanu 10% PEG-om sadržaj ukupnih fenola bio je značajno veći u odnosu na tretman 5% PEG-om.

5.1.2.2. Enzimski pokazatelji stresa kod soje u fenološkoj fazi klijanje-nicanje

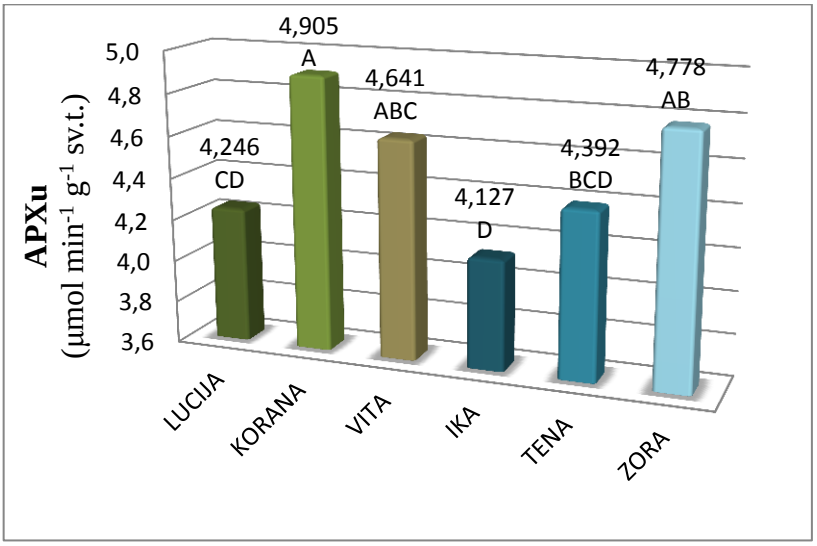
Analizom dobivenih rezultata mjerenja ukupne i specifične aktivnosti antioksidativnih enzima u tkivu hipokotila soje, utvrđen je utjecaj kultivara, tretmana i njihove interakcije na enzimske pokazatelje stresa soje u fenofazi klijanje-nicanje. Prema F testu, kultivar, tretman, te interakcija kultivar x tretman su imali vrlo značajan utjecaj na ukupnu i specifičnu aktivnost svih mjerenih enzimskih pokazatelja stresa (*Tablica 5.10.*).

Tablica 5.10. Značajnost utjecaja kultivara i tretmana na ukupnu (u) i specifičnu (s) aktivnost enzima askorbat-peroksidaze (APX), katalaze (CAT), gvajakol-peroksidaze (GPOX) i glutation-reduktaze (GR) u tkivu hipokotila klijanaca soje (prikazani podaci su izračunate razine značajnosti (*P*) prema F testu.

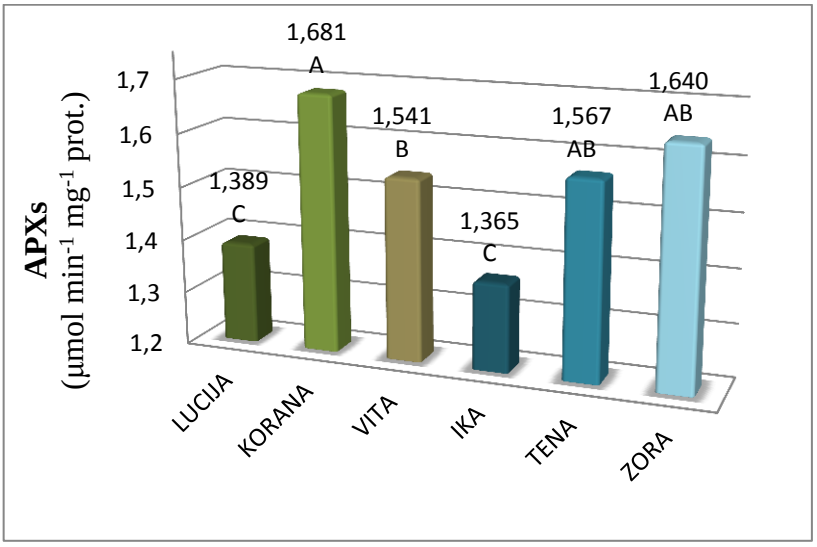
		APXu	CATu	GPOXu	GRu	APXs	CATs	GPOXs	GRs
KULTIVAR (A)	F test	7,17	7,07	9,61	10,38	14,92	4,15	7,30	14,08
	P	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0016	<0,0001	<0,0001
TRETMAN (B)	F test	193,23	64,41	451,85	205,54	110,35	39,64	16,91	157,19
	P	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
INTERAKCIJA (AxB)	F test	4,80	4,70	7,92	6,42	5,52	1,95	2,50	8,93
	P	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0058	0,0002	<0,0001

5.1.2.2.1. Aktivnost askorbat-peroksidaze u tkivu hipokotila klijanaca soje

U prosjeku za sve tretmane kultivar je vrlo značajno utjecao na ukupnu i specifičnu aktivnost askorbat-peroksidaze u tkivu hipokotila klijanaca (*Tablica 5.10.*). Najveću ukupnu aktivnost askorbat-peroksidaze (APXu), prosječno za sve tretmane, imao je kultivar Korana (4,905 μmol min^{-1} g^{-1} sv.t.; *Slika 5.15.*). Nešto niže vrijednosti su imale Vita i Zora, ali se nisu značajno razlikovale od Korane. Tena se značajno razlikovala od Korane, ali se nije značajno razlikovala od ostalih kultivara. Ika je, u prosjeku za sve tretmane, imala najnižu aktivnost APXs (4,127 μmol min^{-1} g^{-1} sv.t.), a nešto višu aktivnost je imala Lucija, ali ne značajno različito.



Slika 5.15 . Prosječna ukupna aktivnost askorbat-peroksidaze (APXu; μmol min^{-1} g^{-1} sv.t.), za sve tretmane, u tkivu hipokotila klijanaca šest kultivara soje. Značajne razlike između kultivara soje označene su različitim slovima prema LSD testu (A,B,C,D: $P \leq 0,01$).

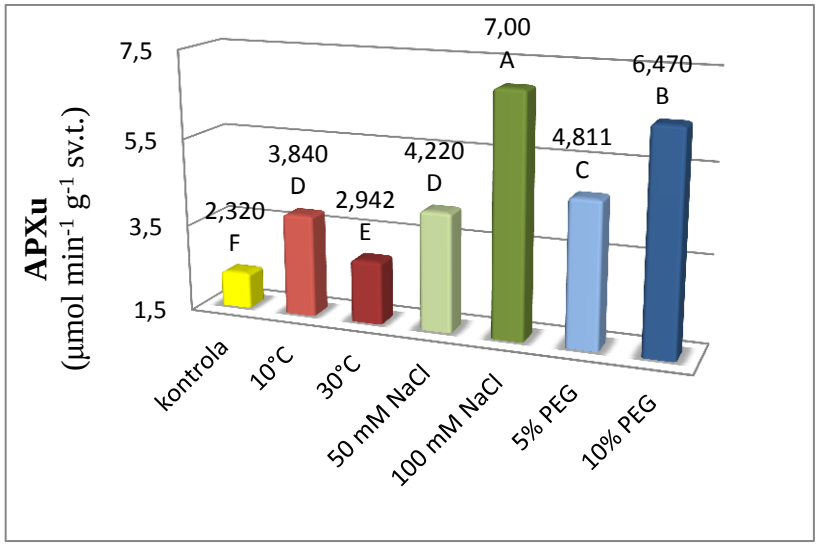


Slika 5.16. Prosječna specifična aktivnost askorbat-peroksidaze (APXs; μmol min^{-1} mg^{-1} prot.), za sve tretmane, u tkivu hipokotila klijanaca šest kultivara soje. Značajne razlike između kultivara soje označene su različitim slovima prema LSD testu (A,B,C: $P \leq 0,01$).

Najveću specifičnu aktivnost askorbat-peroksidaze (APXs), u prosjeku za sve tretmane, imala je Korana (1,681 μmol min^{-1} mg^{-1} prot.), no nije se značajno razlikovala od Tene i Zore koje su imale nešto niže aktivnosti (*Slika 5.16.*). Enzimska aktivnost APXs kod Vite nije se značajno razlikovala od Tene i Zore. Značajno nižu aktivnost, u odnosu na

Vitu, imale su Ika i Lucija, a višu Korana. Najnižu aktivnost APXs imala je Ika (1,365 µmol min^{-1} mg^{-1} prot.).

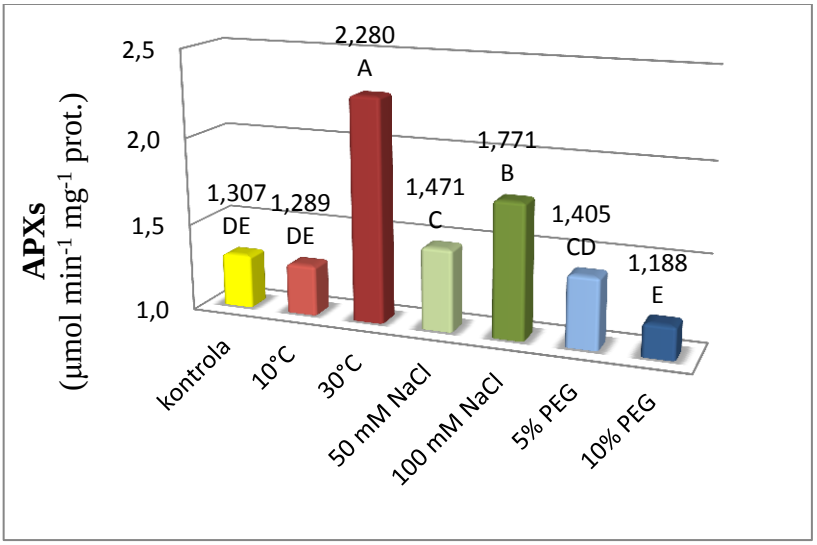
Prema F testu, u prosjeku za sve kultivare, tretman je vrlo značajno utjecao na ukupnu i specifičnu aktivnost askorbat-peroksidaze (*Tablica 5.10.*). Značajno različitu i najveću ukupnu aktivnost askorbat-peroksidaze (APXu) kultivari soje su imali pri tretmanu 100 mM NaCl-om (7,00 µmol min^{-1} g^{-1} sv.t.; *Slika 5.17.*). Najnižu i značajno različitu u odnosu na tretmane aktivnost APXu kultivari su imali u kontroli (2,320 µmol min^{-1} g^{-1} sv.t.). Pri tretmanima 10°C i 50 mM NaCl-om nije bilo značajne razlike. Aktivnost APXu je značajno rasla od kontrole do tretmana 100 mM NaCl-om slijedom: tretman 30°C, tretman 10°C/50 mM NaCl-om, zatim tretman 5% PEG-om, te tretman 10% PEG-om.



Slika 5.17. Prosječna ukupna aktivnost askorbat-peroksidaze u tkivu hipokotila klijanaca (APXu; µmol min^{-1} g^{-1} sv.t.), za sve kultivare, po tretmanima. Značajne razlike između tretmana označene su različitim slovima prema LSD testu (A,B,C,D,E,F: $P \leq 0{,}01$).

Značajno različitu u odnosu na druge tretmane i najveću specifičnu aktivnost askorbat-peroksidaze (APXs) kultivari su imali pri tretmanu 30°C (2,280 µmol min^{-1} mg^{-1} prot.; *Slika 5.18.*). Najmanja aktivnost bila je pri tretmanu 10% PEG-om (1,188 µmol min^{-1} mg^{-1} prot.) i nije se značajno razlikovala od kontrole i tretmana 10°C. Nešto veću aktivnost kultivari su imali pri tretmanu 5% PEG-om, koja se značajno razlikovala od tretmana 10% PEG-om, ali se nije razlikovala od kontrole i tretmana 10°C. Aktivnost APXs pri tretmanu 100 mM NaCl-om se značajno razlikovala

od ostalih tretmana. Pri tretmanu 50 mM NaCl-om aktivnost se značajno razlikovala od ostalih tretmana osim 5% PEG-om.



Slika 5.18. Prosječna specifična aktivnost askorbat-peroksidaze u tkivu hipokotila klijanaca (APXs; μmol min^{-1} mg^{-1} prot.), za sve kultivare, po tretmanima. Značajne razlike između tretmana označene su različitim slovima prema LSD testu (A,B,C,D,E: $P \leq 0{,}01$).

Najveću ukupnu aktivnost askorbat-peroksidaze je imala Zora pri tretmanu 100 mM NaCl-om (8,017 μmol min^{-1} g^{-1} sv.t.), a najnižu ukupnu aktivnost je imala Tena u kontroli (1,906 μmol min^{-1} g^{-1} sv.t.). Prema F testu, utjecaj kultivara na ukupnu aktivnost askorbat-peroksidaze je bio vrlo značajan u kontroli i pri tretmanima više i niže temperature, te više i niže razine solnog stresa (*Tablica 5.11.*). Pri tretmanima višeg i nižeg osmotskog stresa utjecaj kultivara na ukupnu aktivnost askorbat-peroksidaze nije bio značajan. U uvjetima kontrole Korana je imala najveću (3,004 μmol min^{-1} g^{-1} sv.t.) ukupnu aktivnost, a Tena najmanju. U odnosu na Koranu, značajno nižu aktivnost imale su slijedom Vita, Ika, Lucija i Tena, a navedeni kultivari se međusobno nisu značajno razlikovali. Zora se u kontroli nije značajno razlikovala od svih drugih kultivara. Pri tretmanu 10°C najmanju aktivnost je imala Zora koja se nije značajno razlikovala od Ike, Korane i Lucije, a najveću aktivnost je imala Vita koja se značajno razlikovala od ostalih kultivara. Pri tretmanu 30°C najmanju aktivnost je imala Lucija koja se nije značajno razlikovala od Korane, Ike i Zore, a najveću aktivnost je imala Tena. Vita se, pri navedenom tretmanu, nije značajno razlikovala od ostalih kultivara. Najveću aktivnost, pri tretmanu 50 mM NaCl-om, imala je Zora koja se nije značajno razlikovala

od Korane. Najmanju aktivnost u tom tretmanu je imala Tena koja se nije značajno razlikovala od Lucije, Vite i Ike. Zora je imala najvišu ukupnu aktivnost pri tretmanu 100 mM NaCl-om, a Ika najmanju. Od Ike se nisu značajno razlikovale Lucija, Ika, Tena, Korana i Vita, no Korana i Vita se nisu značajno razlikovale ni od Zore. Najveću aktivnost je imala Vita pri tretmanu 5% PEG-om, te Korana pri tretmanu 10% PEG-om. Najmanju ukupnu aktivnost je imala Zora pri tretmanu 5% PEG-om, a Tena pri tretmanu 10% PEG-om.

Tablica 5.11. Značajnost utjecaja kultivara i tretmana na ukupnu aktivnost enzima askorbat-peroksidaze (APXu) u tkivu hipokotila klijanaca soje (podaci su izraženi u μmol min^{-1} g^{-1} sv.t.; podaci su prosjek četiri ponavljanja; ANOVA, F test; prosjeci kultivara označenih istim slovom ne razlikuju se prema LSD testu (A,B,C: $P \leq 0,01$); prosjeci tretmana označenih istim slovom ne razlikuju se prema LSD testu (X,Y,Z,W,Q: $P \leq 0,01$)).

APXu (μmol min^{-1} g^{-1} sv.t.)	Kontrola	10°C	30°C	50 mM NaCl	100 mM NaCl	5% PEG	10% PEG	F test - tretman	*P*- tretman
LUCIJA	2,166 B / W	3,527 BC / Z	2,471 B / W	3,987 B / Z	6,539 B / X	5,097 / Y	5,934 / XY	44,18	<0,0001
KORANA	3,004 A / W	3,708 BC / ZW	2,551 B / W	5,368 A / Y	7,692 AB / X	4,643 / YZ	7,367 / X	37,69	<0,0001
VITA	2,207 B / W	5,074 A / Y	3,096 AB / ZW	3,667 B / Z	6,724 AB / X	5,202 / Y	6,518 / X	35,67	<0,0001
IKA	2,203 B / Z	3,276 C / Z	2,514 B / Z	3,188 B / Z	6,477 B / X	4,930 / Y	6,305 / XY	23,92	<0,0001
TENA	1,906 B / Q	4,184 B / ZW	4,069 A / ZW	3,168 B / W	6,552 B / X	5,006 / YZ	5,859 / XY	28,77	<0,0001
ZORA	2,435 AB / W	3,272 C / ZW	2,951 B / ZW	5,944 A / Y	8,017 A / X	3,989 / Z	6,838 / Y	55,86	<0,0001
F test - kultivar	6,18	16,51	6,32	17,59	4,42	2,03	1,25		
P- kultivar	0,0017	<0,0001	0,0015	<0,0001	0,0084	0,1235	0,3262		

Vrlo značajan utjecaj tretmana je utvrđen na ukupnu aktivnost askorbat-peroksidaze kod ispitivanih kultivara soje (*Tablica 5.11.*). Uspoređujući tretmane kod pojedinih kultivara, kultivari su pokazali najveću aktivnost pri tretmanu 100 mM NaCl-om. Kod Lucije, Korane, Vite, Ike i Tene nije bilo značajne razlike između tretmana 100 mM NaCl-om i 10% PEG-om. Uspoređujući kontrolu i primijenjene tretmane, svi kultivari osim Korane su imali najnižu aktivnost u kontroli. Korana je najnižu aktivnost imala pri temperaturnom tretmanu 30°C. Kod Vite i Lucije nije bilo značajne razlike između kontrole i tretmana 30°C, no u odnosu na kontrolu ostali tretmani su rezultirali sa

značajnim povećanjem APXu. Korana i Zora su pokazale značajno povećanje ukupne aktivnosti u odnosu na kontrolu pri svim tretmanima osim 10°C i 30°C. Tena je imala značajno povećanje aktivnosti u odnosu na kontrolu pri svim tretmanima, a Ika samo pri tretmanima 100 mM NaCl-om, 5% i 10% PEG-om. U odnosu na aktivnost enzima pri tretmanu 10°C, kod svih kultivara je utvrđeno smanjenje aktivnosti pri tretmanu 30°C, ali značajno smanjenje je bilo samo kod Lucije i Vite. Značajno povećanje aktivnosti bilo je kod svih kultivara pri tretmanu 100 mM NaCl-om u odnosu na tretman 50 mM NaCl-om. Svi kultivari su pokazali povećanje aktivnosti enzima pri tretmanu 10% PEG-om u odnosu na tretman 5% PEG-om, ali je značajno povećanje bilo kod Korane, Vite i Zore.

Najveću specifičnu aktivnost askorbat-peroksidaze u tkivu hipokotila klijanaca soje je imala Tena pri tretmanu 30°C (2,844 μmol min^{-1} mg^{-1} prot.), a najnižu aktivnost je imala Lucija u kontroli (1,059 μmol min^{-1} mg^{-1} prot.). Prema F testu, utvrđen je vrlo značajan utjecaj kultivara na specifičnu aktivnost askorbat-peroksidaze u kontroli i pri tretmanima 30°C, 50 mM i 100 mM NaCl-om, a značajan utjecaj utvrđen je pri tretmanima 10°C i 10% PEG-om (*Tablica 5.12.*). Pri tretmanu 5% PEG-om, nije utvrđen značajan utjecaj kultivara na APXs. U optimalnim uvjetima najveću specifičnu aktivnost enzima je imala Korana (1,710 μmol min^{-1} mg^{-1} prot.) koja se nije značajno razlikovala od Vite, a najmanju aktivnost imala je Lucija od koje se nisu značajno razlikovale Ika, Tena i Zora. Uspoređujući kultivare pri pojedinim tretmanima, najveću specifičnu aktivnost enzima pri tretmanima 10°C, 5% i 10% PEG-om je imala Vita, pri tretmanu 30°C Tena, pri tretmanu 50 mM NaCl-om Zora, a pri tretmanu 100 mM NaCl-om Korana. Najnižu specifičnu aktivnost askorbat-peroksidaze pri tretmanima 10°C, 100 mM NaCl-om i 5% PEG-om je imala Ika, pri tretmanu 30°C Vita, pri tretmanu 50 mM NaCl-om Tena, a pri tretmanu 10% PEG-om Lucija. Pri tretmanu 10°C aktivnost enzima kod Lucije, Tene i Zore je bila niža od aktivnosti kod Vite, no ne značajno niža, prema LSD testu pri $P \leq 0,05$. Pri istom tretmanu aktivnost enzima kod Ike, Korane i Zore nije bila značajno različita. Pri tretmanu 30°C aktivnost enzima kod Tene, koja je imala najveću aktivnost, nije se značajno razlikovala od Korane i Zore koje su imale nešto nižu aktivnost. Lucija i Ika se pri istom tretmanu nisu značajno razlikovale u aktivnosti enzima od Vite s najnižom aktivnosti. Pri tretmanu 50 mM NaCl-om, APXs kod Korane se nije značajno razlikovala od aktivnosti kod ostalih kultivara pa čak ni od najviše i najniže aktivnosti kod Zore i Tene. Ika, Vita, Lucija i

Tena, pri istom tretmanu, nisu se značajno razlikovale u aktivnosti enzima. Pri tretmanu 100 mM NaCl-om vrijednosti aktivnosti enzima kod Vite se nisu značajno razlikovale od ostalih kultivara. Pri istom tretmanu nije bilo značajne razlike između Korane i Zore, kao ni između Ike, Tene i Lucije. Prema LSD testu uz $P \leq 0,05$ pri tretmanu 10% PEG-om, Korana i Ika se nisu značajno razlikovale u aktivnosti enzima od ostalih kultivara. Pri istom tretmanu između Tene i Zore nije bilo značajne razlike, no Zora je imala značajno višu aktivnost od Lucije s najnižom aktivnošću, a Tena je imala značajno nižu aktivnost od Vite s najvišom aktivnošću.

Tablica 5.12. Značajnost utjecaja kultivara i tretmana na specifičnu aktivnost enzima askorbat-peroksidaze (APXs) u tkivu hipokotila klijanaca soje (podaci su izraženi u μmol min^{-1} mg^{-1} prot.; podaci su prosjek četiri ponavljanja; ANOVA, F test; prosjeci kultivara označenih istim slovom ne razlikuju se prema LSD testu (a,b,c: $P \leq 0,05$; A,B,C: $P \leq 0,01$); prosjeci tretmana označenih istim slovom ne razlikuju se prema LSD testu (X,Y,Z,W: $P \leq 0,01$)).

APXs (μmol min^{-1} mg^{-1} prot.)	Kontrola	10°C	30°C	50 mM NaCl	100 mM NaCl	5% PEG	10% PEG	F test - tretman	*P*- tretman
LUCIJA	1,059 C / Z	1,337 ab / YZ	1,842 C / X	1,442 B / Y	1,603 BC / XY	1,349 / YZ	1,089 c / Z	13,40	<0,0001
KORANA	1,710 A / Z	1,166 bc / W	2,521 AB / X	1,586 AB / Z	2,069 A / Y	1,530 / Z	1,182 abc / W	37,34	<0,0001
VITA	1,440 AB / XY	1,488 a / XY	1,797 C / X	1,354 B / Y	1,799 ABC / X	1,616 / XY	1,294 a / Y	4,13	0,0068
IKA	1,109 BC / Z	1,086 c / Z	2,114 BC / X	1,318 B / YZ	1,535 C / Y	1,181 / YZ	1,213 abc / YZ	13,41	<0,0001
TENA	1,235 BC / Z	1,405 ab / YZ	2,844 A / X	1,313 B / YZ	1,647 BC / Y	1,410 / YZ	1,113 bc / Z	40,67	<0,0001
ZORA	1,292 BC / Z	1,255 abc / Z	2,563 AB / X	1,815 A / Y	1,975 AB / Y	1,342 / Z	1,239 ab / Z	37,20	<0,0001
F test - kultivar	7,57	3,42	13,26	6,69	4,33	2,72	3,23		
P- kultivar	0,0006	0,0241	<0,0001	0,0011	0,0092	0,0530	0,0295		

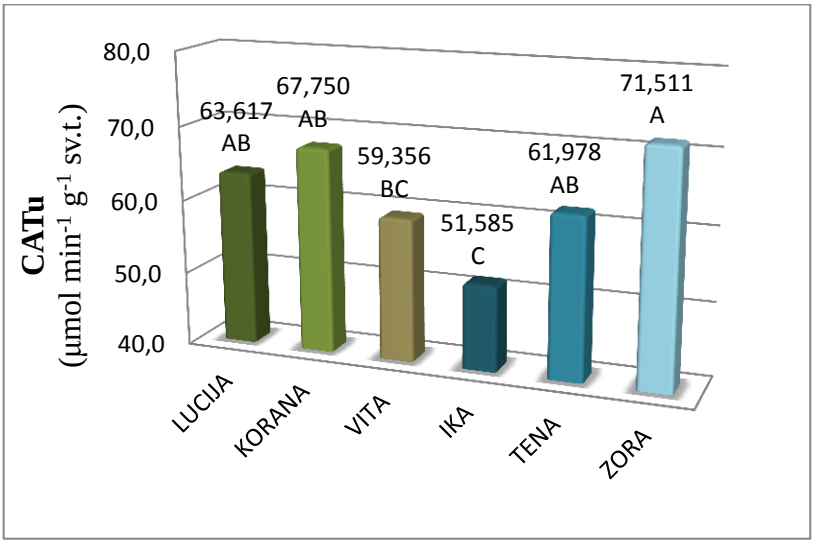
Utvrđen je vrlo značajan utjecaj tretmana na specifičnu aktivnost askorbat-peroksidaze kod ispitivanih kultivara soje (*Tablica 5.12.*). Uspoređujući tretmane primijenjene na pojedini kultivar, najveću specifičnu aktivnost askorbat-peroksidaze su imali svi kultivari osim Vite pri tretmanu 30°C. Vita je najveću aktivnost enzima imala pri tretmanu 100 mM NaCl-om, no kod Vite između tretmana 30°C i 100 mM NaCl-om nije bilo značajne razlike. Najmanju aktivnost enzima Lucija je imala u kontroli, Korana

i Ika pri tretmanu 10°C, a Vita, Tena i Zora pri tretmanu 10% PEG-om. Kod Lucije se u odnosu na kontrolu uočava značajno povećanje aktivnosti pri tretmanima 30°C, 50 mM i 100 mM NaCl-om. Kod Korane u odnosu na kontrolu, uočava se značajno smanjenje aktivnosti pri tretmanima 10°C i 10% PEG-om, a povećanje aktivnosti pri tretmanima 30°C i 100 mM NaCl-om. Kod Vite aktivnost enzima u kontroli nije bila značajno različita od ostalih tretmana. Specifična aktivnost enzima kod Ike, Tene i Zore je bila značajno veća pri tretmanu 30°C u odnosu na ostale tretmane i kontrolu. Kod istih je utvrđeno povećanje aktivnosti pri tretmanu 100 mM NaCl-om u odnosu na kontrolu, ali nije bilo značajne razlike između kontrole i tretmana 10°C, 5% i 10% PEG-om. Kod Zore je uočeno značajno povećanje aktivnosti pri tretmanu 50 mM NaCl-om u odnosu na aktivnost u kontroli. Svi kultivari osim Vite su imali značajno povećanje specifične aktivnosti pri tretmanu 30°C u odnosu na tretman 10°C. Povećanje aktivnosti je bilo utvrđeno kod svih kultivara pri tretmanu 100 mM NaCl-om u odnosu na tretman 50 mM NaCl-om, no značajno povećanje aktivnosti je bilo samo kod Korane i Vite. Smanjenje aktivnosti enzima pokazali su kultivari pri tretmanu 10% PEG-om u odnosu na tretman 5% PEG-om, no značajno smanjenje je dobiveno samo kod Korane.

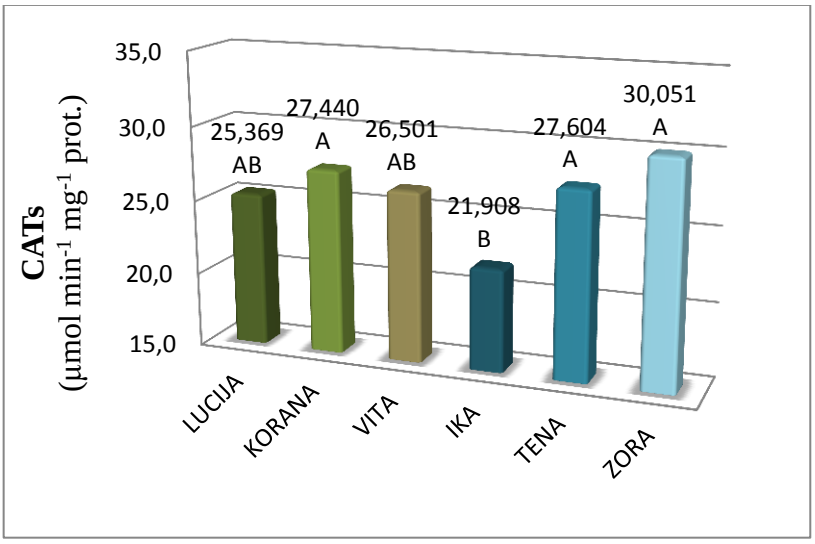
5.1.2.2.2. Aktivnost katalaze u tkivu hipokotila klijanaca soje

Analizirajući ukupnu i specifičnu aktivnost katalaze u tkivu hipokotila klijanaca, prema F testu kultivar je imao vrlo značajan utjecaj u prosjeku za sve tretmane (*Tablica 5.10.*). Najveću ukupnu aktivnost katalaze (CATu), u prosjeku za sve tretmane, imala je Zora (71,511 μmol min^{-1} g^{-1} sv.t.; *Slika 5.19.*). Nešto nižu aktivnost su imale Korana, Tena i Lucija, ali se nisu značajno razlikovale od Zore. Najnižu aktivnost je imala Ika (51,585 μmol min^{-1} g^{-1} sv.t.), dok je Vita imala veću aktivnost CATu, ali se značajno razlikovala samo od Zore.

Specifična aktivnost katalaze, u prosjeku za sve tretmane, bila je najveća kod Zore (30,051 μmol min^{-1} mg^{-1} prot.; *Slika 5.20.*). Tena, Korana, Vita i Lucija slijedom su imale niže vrijednosti od Zore, ali se od nje nisu značajno razlikovale. Vita i Lucija nisu se značajno razlikovale ni od Ike koja je imala najnižu aktivnost CATs (21,908 μmol min^{-1} mg^{-1} prot.).



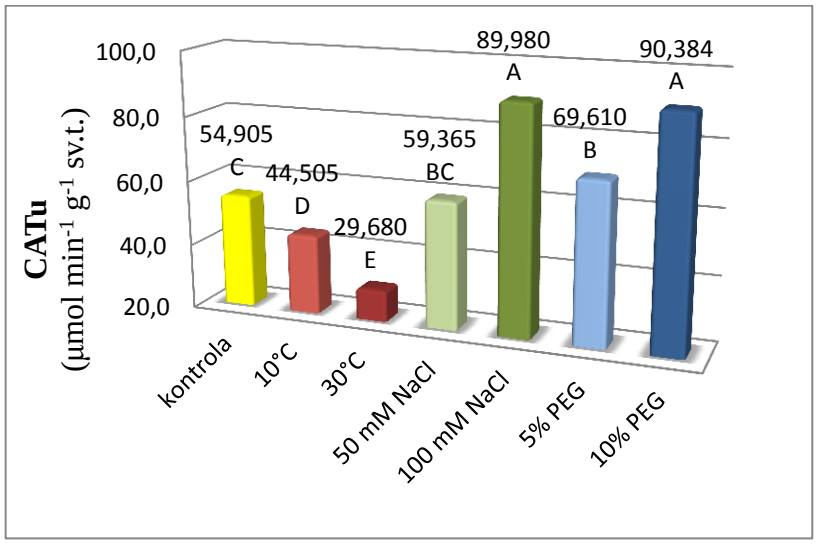
Slika 5.19. Prosječna ukupna aktivnost katalaze (CATu; µmol min^{-1} g^{-1} sv.t.), za sve tretmane, u tkivu hipokotila klijanaca šest kultivara soje. Značajne razlike između kultivara soje označene su različitim slovima prema LSD testu (A,B,C: $P \leq 0,01$).



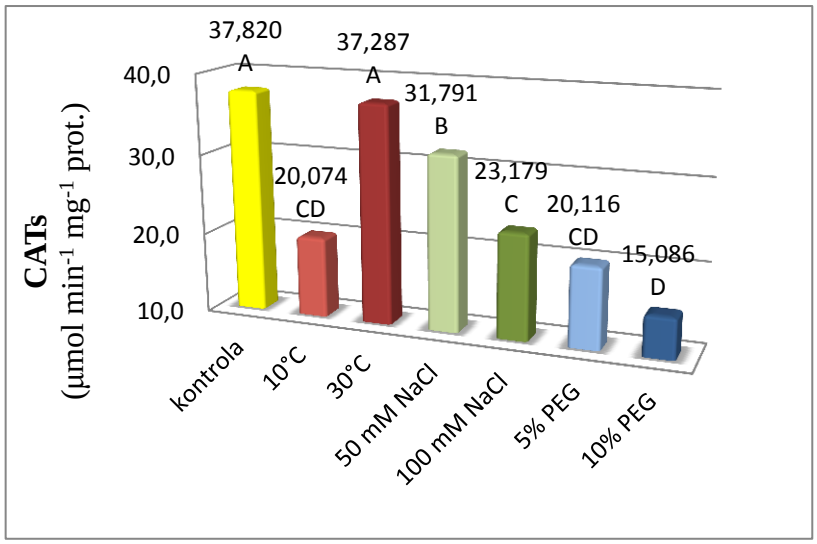
Slika 5.20. Prosječna specifična aktivnost katalaze (CATs; µmol min^{-1} mg^{-1} prot.), za sve tretmane, u tkivu hipokotila klijanaca šest kultivara soje. Značajne razlike između kultivara soje označene su različitim slovima prema LSD testu (A,B: $P \leq 0,01$).

Prema F testu, tretman je vrlo značajno utjecao na ukupnu i specifičnu aktivnost katalaze (*Tablica 5.10.*). Najveća CATu, u prosjeku za sve kultivare, bila je pri tretmanu 10% PEG-om (90,384 µmol min^{-1} g^{-1} sv.t.; *Slika 5.21.*). Aktivnost pri tretmanu 100 mM NaCl-om bila je nešto niža, ali se nije značajno razlikovala od tretmana s najvećom aktivnosti. U odnosu na navedene tretmane značajno nižu aktivnost imali su klijanci

soje pri tretmanima niže razine solnog stresa (50 mM NaCl) i niže razine osmotskog stresa (5% PEG), no između njih nije bilo značajne razlike. Još manju, značajno nižu aktivnost su imale biljke u kontroli, zatim značajno nižu pri tretmanu 10°C i zatim pri tretmanu 30°C. Prosječno, kultivari soje su imali najmanju aktivnost CATu pri tretmanu 30°C (29,680 µmol min^{-1} g^{-1} sv.t.).



Slika 5.21. Prosječna ukupna aktivnost katalaze u tkivu hipokotila klijanaca (CATu; µmol min^{-1} g^{-1} sv.t.), za sve kultivare, po primijenjenim tretmanima. Značajne razlike između tretmana označene su različitim slovima prema LSD testu (A,B,C,D: $P \leq 0,01$).



Slika 5.22. Prosječna specifična aktivnost katalaze u tkivu hipokotila klijanaca (CATs; µmol min^{-1} mg^{-1} prot.), za sve kultivare, po primijenjenim tretmanima. Značajne razlike između tretmana označene su različitim slovima prema LSD testu (A,B,C,D: $P \leq 0,01$).

Specifična aktivnost katalaze (CATs) je bila najveća u kontroli (37,820 μmol min^{-1} mg^{-1} prot.) i nešto manja, ali ne značajno, pri tretmanu 30°C (*Slika 5.22.*). Hipokotili soje su imali značajno smanjenje aktivnosti CATs pri tretmanu 50 mM NaCl-om u odnosu na kontrolu i tretman 30°C. Pri tretmanima 100 mM NaCl-om, 5% PEG-om i 10°C utvrđena je značajno niža aktivnost od kontrole i prethodno navedenih tretmana, ali bez međusobne statistički značajne razlike. Pri tretmanu 10% PEG-om ispitivani kultivari su imali najmanju prosječnu aktivnost CATs (15,086 μmol min^{-1} mg^{-1} prot.), no ona se nije značajno razlikovala od tretmana 5% PEG-om i 10°C.

Najveću ukupnu aktivnost katalaze imala je Korana pri tretmanu 10% PEG-om (112,96 μmol min^{-1} g^{-1} sv.t.), a najmanju aktivnost imala je Ika pri tretmanu 30°C (19,506 μmol min^{-1} g^{-1} sv.t.). Vrlo značajan utjecaj kultivara je utvrđen na ukupnu aktivnost katalaze u kontroli i tretmanima 10°C, 30°C i 100 mM NaCl-om, a značajan utjecaj pri tretmanu 50 mM NaCl-om (*Tablica 5.13.*). Pri tretmanima više i niže razine osmotskog stresa nije utvrđen značajan utjecaj kultivara na ukupnu aktivnost katalaze. U optimalnim uvjetima klijanja, značajno najveću ukupnu aktivnost imala je Zora (95,108 μmol min^{-1} g^{-1} sv.t.), a najmanju Ika (29,989 μmol min^{-1} g^{-1} sv.t.), koja se nije značajno razlikovala od Tene i Lucije. Uspoređujući kultivare pri pojedinom tretmanu, pri tretmanima 10°C, 30°C, 50 mM NaCl-om i 10% PEG-om najmanju aktivnost je imala Ika, pri tretmanu 100 mM NaCl-om Tena, a pri tretmanu 5% PEG-om Zora. Najveću je aktivnost pri tretmanima 10°C i 50 mM NaCl-om imala Zora, pri 30°C Tena, pri tretmanima 100 mM NaCl-om i 5% PEG-om Lucija, a pri 10% PEG-om Korana. Pri tretmanu 10°C Tena i Korana se nisu značajno razlikovale od Zore, a Lucija, Vita i Korana od Ike. Pri tretmanu 30°C od Tene se nisu značajno razlikovale Lucija i Vita, a od Ike se nisu značajno razlikovale Korana i Zora. Prema LSD testu uz $P \leq 0,05$, pri tretmanu 50 mM NaCl-om Zora se nije značajno razlikovala od Lucije i Korane, a Ika se nije značajno razlikovala od Lucije, Vite i Tene. Pri tretmanu 100 mM NaCl-om, Lucija se nije značajno razlikovala od Korane, Vite i Ike, dok se Tena nije značajno razlikovala od Korane i Zore.

Tablica 5.13. Značajnost utjecaja kultivara i tretmana na ukupnu aktivnost enzima katalaze (CATu) u tkivu hipokotila klijanaca soje (podaci su izraženi u μmol min^{-1} g^{-1} sv.t.; podaci su prosjek četiri ponavljanja; ANOVA, F test; prosjeci kultivara označenih istim slovom ne razlikuju se prema LSD testu (a,b,c: $P \leq 0,05$; A,B,C: $P \leq 0,01$); prosjeci tretmana označenih istim slovom ne razlikuju se prema LSD testu (X,Y,Z,W,Q: $P \leq 0,01$)).

CATu (μmol min^{-1} g^{-1} sv.t.)	Kontrola	10°C	30°C	50 mM NaCl	100 mM NaCl	5% PEG	10% PEG	F test - tretman	*P*- tretman
LUCIJA	46,025 BC / WQ	25,55 C / Q	36,860 AB / Q	62,33 abc / ZW	106,350 A / X	80,889 / YZ	87,31 / XY	26,28	<0,0001
KORANA	63,471 B / YZ	50,70 ABC / ZW	20,146 C / W	67,06 ab / YZ	92,214 ABC / XY	67,709 / YZ	112,96 / X	9,36	<0,0001
VITA	47,882 B / ZW	34,39 BC / W	36,308 AB / ZW	52,08 bc / Z	97,071 AB / X	71,104 / Y	76,66 / Y	28,60	<0,0001
IKA	29,989 C / Y	23,69 C / Y	19,506 C / Y	39,97 c / Y	97,728 AB / X	74,857 / X	75,35 / X	20,29	<0,0001
TENA	46,954 BC / Y	57,00 AB / Y	42,504 A / Y	53,55 bc / Y	69,998 C / Y	65,794 / Y	98,04 / X	7,21	0,0003
ZORA	95,108 A / X	75,70 A / XY	22,757 BC / Z	81,19 a / XY	76,522 BC / XY	57,308 / Y	91,99 / X	13,52	<0,0001
F test - kultivar	26,13	8,16	6,68	3,12	6,07	2,46	1,60		
P- kultivar	<0,0001	0,0004	0,0011	0,0337	0,0018	0,0723	0,2094		

Vrlo značajan utjecaj tretmana je utvrđen na ukupnu aktivnost katalaze kod svih ispitivanih kultivara soje (*Tablica 5.13.*). Uspoređujući tretmane kod pojedinog kultivara, najveću ukupnu aktivnost katalaze su imale Lucija, Vita i Ika pri tretmanu 100 mM NaCl-om. Najmanju ukupnu aktivnost Lucija i Vita su imale pri tretmanu 10°C, a Ika pri tretmanu 30°C. Korana, Tena i Zora imale su najmanju ukupnu aktivnost katalaze pri tretmanu 30°C, dok su najveću aktivnost imale Tena i Korana pri tretmanu 10% PEG-om, a Zora u kontroli. Lucija, Vita i Ika su imale značajno povećanje aktivnosti u odnosu na kontrolu kod tretmana 100 mM NaCl-om, 5% i 10% PEG-om, dok ostali tretmani nisu rezultirali značajnim razlikama u odnosu na kontrolu. Korana je pokazala značajno smanjenje aktivnosti enzima u odnosu na kontrolu pri tretmanu 30°C, a povećanje pri tretmanu 10% PEG-om. Tena je imala značajno povećanje aktivnosti pri tretmanu 10% PEG-om u odnosu na kontrolu i ostale tretmane. Značajno smanjenje aktivnosti pri tretmanima 30°C i 5% PEG-om u odnosu na kontrolu zabilježeno je kod Zore, dok između kontrole i ostalih tretmana nije bilo značajne razlike. Između tretmana 10°C i 30°C nije bilo značajne razlike kod Lucije, Korane, Vite, Ike i Tene. Kod Zore pri tretmanu 30°C utvrđeno je značajno smanjenje aktivnosti

u odnosu na aktivnost enzima pri tretmanu 10°C. Kod Lucije, Vite i Ike pri tretmanu 100 mM NaCl-om, izmjereno je statistički značajno povećanje aktivnosti enzima u odnosu na tretman 50 mM NaCl-om. Kod Zore, Korane i Tene nije bilo statistički značajne razlike između tretmana 50 mM i 100 mM NaCl-om. Povećanje aktivnosti enzima uočeno je pri tretmanu 10% PEG-om u odnosu na tretman 5% PEG-om kod svih kultivara, ali su samo Korana, Tena i Zora pokazale značajno povećanje CATu.

Najveća specifična aktivnost katalaze u hipokotilima klijanaca je utvrđena kod Zore u kontroli (53,622 μmol min^{-1} mg^{-1} prot.), a najmanja kod Ike pri tretmanu 10% PEG-om (10,599 μmol min^{-1} mg^{-1} prot.). Utvrđen je vrlo značajan utjecaj kultivara na specifičnu aktivnost katalaze pri tretmanima 10°C, 100 mM NaCl-om i 10% PEG-om, a značajan utjecaj u kontroli (*Tablica 5.14.*). Pri tretmanima 30°C, 50 mM NaCl-om i 5% PEG-om nije utvrđen značajan utjecaj kultivara. Uspoređujući kultivare u pojedinim tretmanima, najveću aktivnost enzima pri tretmanu 30°C je imala Vita, pri tretmanu 50 mM NaCl-om Tena, a pri tretmanu 5% PEG-om Lucija. Najmanju specifičnu aktivnost pri tretmanima 30°C, 50 mM NaCl-om i 5% PEG-om je imala Ika. U kontroli je najveću specifičnu aktivnost enzima imala Zora, a najmanju Ika. Značajno nižu aktivnost od Zore u kontroli su imale Lucija, Korana i Ika, prema LSD testu uz $P \leq 0,05$. Uspoređujući kultivare pri tretmanu 10°C, Zora je imala najveću specifičnu aktivnost enzima, ali se nije značajno razlikovala od Korane i Tene koje su pokazale nešto nižu aktivnost. Najnižu aktivnost pri tom tretmanu je imala Vita, koja se nije značajno razlikovala od Lucije i Ike. Pri tretmanu 100 mM NaCl-om, Tena s najnižom aktivnošću enzima se značajno razlikovala od Ike, Vite, Lucije i Korane, dok se Zora nije značajno razlikovala od nijednog kultivara. Pri navedenom tretmanu je najveću aktivnost enzima imala Korana. Pri tretmanu 10% PEG-om, najveću aktivnost je imala Tena koja se nije značajno razlikovala od Korane i Zore. Zora se nije značajno razlikovala od ostalih kultivara. Ika je imala najmanju aktivnost enzima i nije se značajno se razlikovala od Lucije, Vite i Zore.

Tablica 5.14. Značajnost utjecaja kultivara i tretmana na specifičnu aktivnost enzima katalaze (CATs) u tkivu hipokotila klijanaca soje (podaci su izraženi u μmol min^{-1} mg^{-1} prot.; podaci su prosjek četiri ponavljanja; ANOVA, F test; prosjeci kultivara označenih istim slovom ne razlikuju se prema LSD testu (a,b: $P \leq 0,05$; A,B,C: $P \leq 0,01$); prosjeci tretmana označenih istim slovom ne razlikuju se prema LSD testu (x,y,z,w: $P \leq 0,05$; X,Y,Z,W: $P \leq 0,01$)).

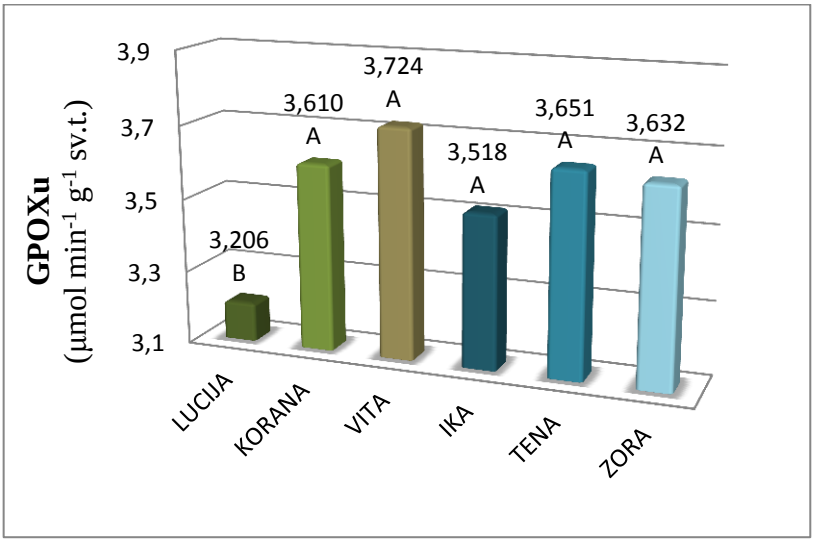
CATs (μmol min^{-1} mg^{-1} prot.)	Kontrola	10°C	30°C	50 mM NaCl	100 mM NaCl	5% PEG	10% PEG	F test - tretman	*P*- tretman
LUCIJA	34,279 b / XY	14,605 BC / ZW	36,607 / X	32,536 / XY	25,367 A / XYZ	21,682 / YZW	12,506 BC / W	9,18	<0,0001
KORANA	31,837 b / XY	24,648 A / YZ	36,822 / X	32,567 / XY	26,073 A / YZ	21,333 / Z	18,802 AB / Z	6,42	0,0006
VITA	40,820 ab / X	11,765 C / W	41,046 / X	31,676 / XY	25,320 A / YZ	21,590 / YZW	13,287 BC / ZW	14,56	<0,0001
IKA	25,810 b / xyz	13,723 BC / zw	32,921 / x	27,519 / xy	24,564 A / xyz	18,221 / yzw	10,599 C / w	3,70	0,0115
TENA	40,549 ab / X	23,430 AB / YZ	38,140 / X	34,649 / XY	17,224 B / Z	18,677 / Z	20,560 A / Z	7,88	0,0002
ZORA	53,622 a / X	32,273 A / YZ	38,183 / XY	31,800 / YZW	20,527 AB / ZW	19,192 / ZW	14,762 ABC / W	9,44	<0,0001
F test - kultivar	3,16	11,04	0,18	0,70	5,23	1,70	6,09		
P- kultivar	0,0319	<0,0001	0,9652	0,6297	0,0039	0,1845	0,0018		

F testom je utvrđen vrlo značajan utjecaj tretmana na specifičnu aktivnost katalaze kod Lucije, Korane, Vite, Tene i Zore, a značajan kod Ike (*Tablica 5.14.*). Uspoređujući tretmane kod pojedinih kultivara, Lucija, Korana, Vita i Ika su pokazale najveću CATs pri tretmanu 30°C, dok su Tena i Zora imale najveću aktivnost u kontroli. Najnižu specifičnu aktivnost navedenog enzima su imale Lucija, Korana, Ika i Zora pri tretmanu 10% PEG-om, Tena pri tretmanu 100 mM NaCl-om, a Vita pri tretmanu 10°C. U odnosu na kontrolu kod Lucije je utvrđeno značajno smanjenje aktivnosti enzima pri tretmanima 10°C i 10% PEG-om, kod Korane pri tretmanima 5% i 10% PEG-om, kod Zore pri tretmanima 10°C, 50 mM i 100 mM NaCl-om, 5% i 10% PEG-om, dok se ostali tretmani kod navedenih kultivara nisu značajno razlikovali od kontrole. Vita i Tena su imale značajno smanjenje aktivnosti enzima u odnosu na kontrolu pri tretmanima 10°C, 100 mM NaCl-om, 5% i 10% PEG-om. Ika je imala značajno smanjenje aktivnosti pri tretmanu 10% PEG-om u odnosu na kontrolu prema LSD testu, pri $P \leq 0,05$. Između tretmana 50 mM i 100 mM NaCl-om nije bilo značajne razlike u aktivnosti enzima kod svih kultivara osim Tene, gdje je utvrđeno značajno smanjenje aktivnosti pri tretmanu 100 mM NaCl-om. Aktivnost enzima se nije značajno razlikovala između tretmana 5% i 10% PEG-om kod svih kultivara. Kod tretmana 10°C

i 30°C je utvrđeno značajno povećanje aktivnosti enzima pri tretmanu 30°C kod svih kultivara osim Zore kod koje nije utvrđena značajna razlika između navedenih tretmana.

5.1.2.2.3. Aktivnost gvajakol-peroksidaze u tkivu hipokotila klijanaca soje

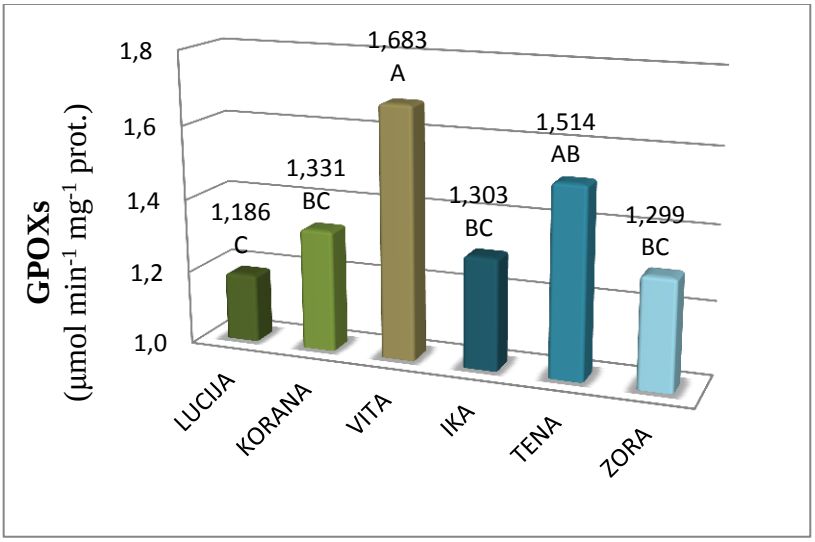
Analizirajući ukupnu i specifičnu aktivnost gvajakol-peroksidaze u tkivu hipokotila klijanaca, kultivar je imao vrlo značajan utjecaj (*Tablica 5.10.*). U prosjeku za sve tretmane najveću ukupnu aktivnost gvajakol-peroksidaze (GPOXu) imala je Vita (3,724 μmol min^{-1} g^{-1} sv.t.; *Slika 5.23.*). Niže aktivnosti imale su slijedom: Tena, Zora, Korana i Ika. Između Vite, Tene, Zore, Korane i Ike nije bilo značajne razlike. Najnižu aktivnost GPOXu imala je Lucija (3,206 μmol min^{-1} g^{-1} sv.t.) i ona je imala vrlo značajno nižu aktivnost u odnosu na ostale kultivare.



Slika 5.23. Prosječna ukupna aktivnost gvajakol-peroksidaze (GPOXu; μmol min^{-1} g^{-1} sv.t.), za sve tretmane, u tkivu hipokotila klijanaca šest kultivara soje. Značajne razlike između kultivara soje označene su različitim slovima prema LSD testu (A,B; $P \leq 0,01$).

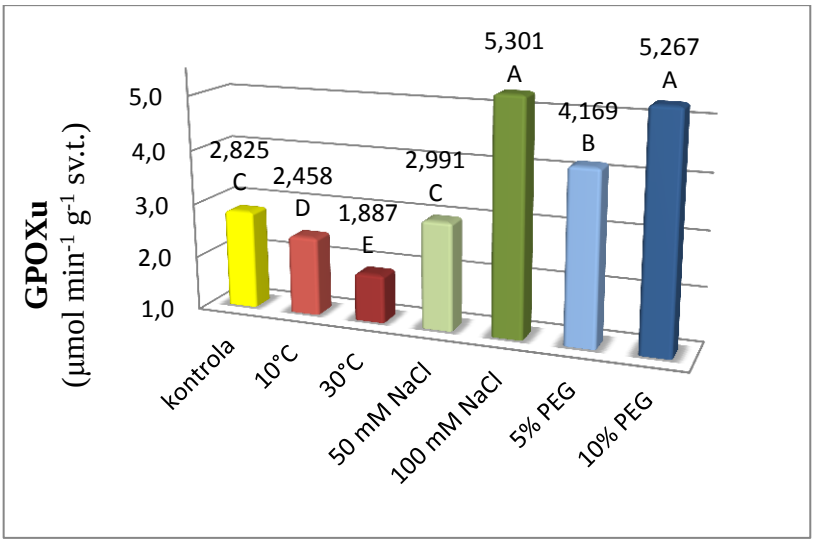
Najvišu specifičnu aktivnost gvajakol-peroksidaze (GPOXs), prosječno za sve tretmane, imala je Vita (1,683 μmol min^{-1} mg^{-1} prot.), a nešto nižu Tena (*Slika 5.24.*). Između njih nije bilo značajne razlike. Značajno nižu aktivnost GPOXs u odnosu na Vitu su imale Korana, Ika i Zora, no one se nisu značajno razlikovale od Tene. Najnižu aktivnost

imala je Lucija (1,186 µmol min^{-1} mg^{-1} prot.), čija je GPOXs bila značajno niža samo od Vite i Tene.

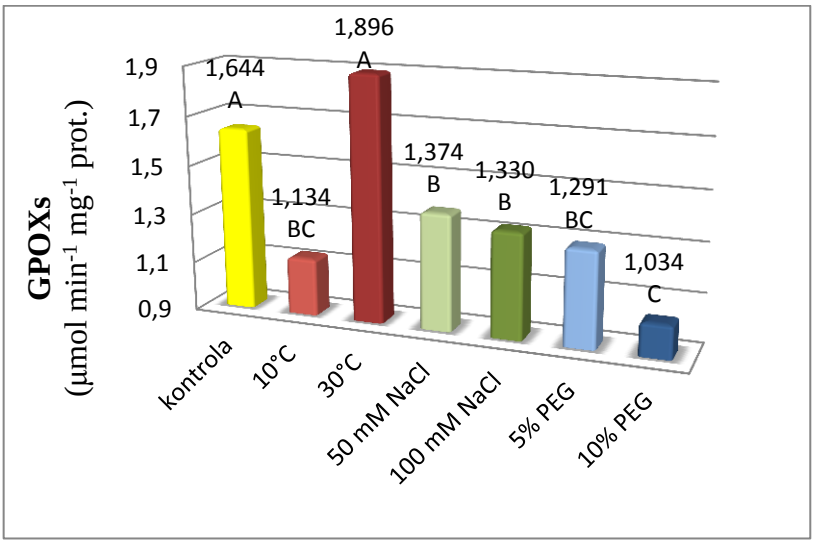


Slika 5.24. Prosječna specifična aktivnost gvajakol-peroksidaze (GPOXs; µmol min^{-1} mg^{-1} prot.), za sve tretmane, u tkivu hipokotila klijanaca šest kultivara soje. Značajne razlike između kultivara soje označene su različitim slovima prema LSD testu (A,B,C: $P \leq 0,01$).

Prema F testu, tretman je vrlo značajno utjecao na ukupnu i specifičnu aktivnost gvajakol-peroksidaze (*Tablica 5.10.*). Prosječno za sve kultivare, tretman 30°C je rezultirao sa značajno najnižom GPOXu (1,887 µmol min^{-1} g^{-1} sv.t.; *Slika 5.25.*). U odnosu na kontrolu (2,825 µmol min^{-1} g^{-1} sv.t.), hipokotili soje su imali značajno nižu aktivnost enzima pri temperaturnim tretmanima, a značajno viša aktivnost je utvrđena pri višoj i nižoj razini osmotskog stresa, te pri višoj razini solnog stresa. Prema ukupnoj aktivnosti ovog enzima tretman 50 mM NaCl-om se nije značajno razlikovao od kontrole. Ispitivani kultivari pri tretmanu 5% PEG-om su imali značajno nižu aktivnost u odnosu na tretmane s 10% PEG-om i 100 mM NaCl-om, dok između navedena dva tretmana nije bilo značajne razlike. U prosjeku, ispitivani kultivari su pokazali najvišu aktivnost GPOXu (5,301 µmol min^{-1} g^{-1} sv.t.) pri tretmanu 100 mM NaCl-om.



Slika 5.25. Prosječna ukupna aktivnost gvajakol-peroksidaze u tkivu hipokotila klijanaca (GPOXu; µmol min^{-1} g^{-1} sv.t.), za sve kultivare, po tretmanima. Značajne razlike između tretmana označene su različitim slovima prema LSD testu (A,B,C,D,E: $P \leq 0{,}01$).



Slika 5.26. Prosječna specifična aktivnost gvajakol-peroksidaze u tkivu hipokotila klijanaca (GPOXs; µmol min^{-1} mg^{-1} prot.), za sve kultivare, po tretmanima. Značajne razlike između tretmana označene su različitim slovima prema LSD testu (A,B,C: $P \leq 0{,}01$).

Najveću specifičnu aktivnost gvajakol-peroksidaze, u prosjeku, kultivari su imali pri tretmanu 30°C (1,896 µmol min^{-1} mg^{-1} prot.; *Slika 5.26.*). U kontroli (1,644 µmol min^{-1} mg^{-1} prot.) je utvrđena niža aktivnost u odnosu na tretman 30°C, ali ne i značajno različita. Specifična aktivnost gvajakol-peroksidaze pri ostalim tretmanima bila je značajno niža. Kultivari se pri tretmanima 50 mM i 100 mM NaCl-om, zatim 5% PEG-om, te 10°C nisu značajno razlikovali u specifičnoj aktivnosti

GPOX. Najnižu aktivnost ispitivani kultivari su imali pri tretmanu 10% PEG-om (1,034 μmol min^{-1} mg^{-1} prot.), ali bez značajne razlike u odnosu na tretmane 10°C i 5% PEG-om. U odnosu na kontrolu aktivnost pri nižoj temperaturi je značajno niža, dok između kontrole i tretmana pri višoj razini temperaturnog stresa nije bilo značajne razlike. Aktivnost GPOXs pri nižoj i višoj razini solnog stresa je bila značajno niža u odnosu na kontrolu, kao i aktivnost pri nižoj i višoj razini osmotskog stresa.

Najveću ukupnu aktivnost gvajakol-peroksidaze je imala Ika pri tretmanu 10% PEG-om (5,840 μmol min^{-1} g^{-1} sv.t.), a najmanju aktivnost je pokazao isti kultivar pri tretmanu 10°C (1,513 μmol min^{-1} g^{-1} sv.t.). Kultivar je imao vrlo značajan utjecaj u kontroli i pri tretmanima 10°C, 50 mM NaCl-om i 10% PEG-om, a značajan utjecaj kultivara je utvrđen u tretmanima 100 mM NaCl-om i 5% PEG-om (*Tablica 5.15.*). Pri tretmanu 30°C nije bilo značajnog utjecaja kultivara. U kontroli, najnižu ukupnu aktivnost je imala Ika koja se nije značajno razlikovala od Lucije i Zore, a najveću aktivnost je imala Korana koja se nije značajno razlikovala od Zore, Vite i Tene. Između Zore i ostalih kultivara nije bilo značajne razlike u kontroli. Uspoređujući kultivare u pojedinom tretmanu, najveću ukupnu aktivnost pri tretmanu 10°C je imala Korana, pri tretmanu 30°C Tena, pri tretmanu 50 mM NaCl-om Zora, a pri tretmanima 100 mM NaCl-om, 5% i 10% PEG-om Ika. Najmanju ukupnu aktivnost pri tretmanu 10°C je imala Ika, pri tretmanu 30°C Korana, pri tretmanu 100 mM NaCl-om Vita, pri tretmanu 5% PEG-om Zora, a u tretmanima 50 mM NaCl-om i 10% PEG-om Lucija. Pri tretmanu 10°C Ika i Lucija se nisu međusobno značajno razlikovale te su bile značajno najniže po aktivnosti GPOXu od ispitivanih kultivara. Pri istom tretmanu, Korana se nije značajno razlikovala od Tene, a Vita od Zore. Pri tretmanu 50 mM NaCl-om aktivnost enzima kod Zore se nije značajno razlikovala od nešto nižih aktivnosti enzima kod Korane, Vite i Tene. Aktivnost enzima kod Tene nije se značajno razlikovala od aktivnosti kod drugih kultivara. Pri istom tretmanu Lucija se nije značajno razlikovala, uz Tenu niti od Ike. Prema LSD testu pri, $P \leq 0,05$, Ika se nije značajno razlikovala od Zore u aktivnosti enzima, dok se Vita nije značajno razlikovala od Lucije, Korane i Tene pri tretmanu 100 mM NaCl-om. Pri tretmanu 5% PEG-om Ika se značajno razlikovala od Zore u ukupnoj aktivnosti enzima prema LSD testu, pri $P \leq 0,05$. Pri istom tretmanu Korana i Tena se nisu značajno razlikovale od ostalih kultivara. Pri tretmanu 10% PEG-om Ika se u ukupnoj aktivnosti enzima nije značajno razlikovala od Vite, Zore i Tene, a Lucija od Korane i Tene.

Tablica 5.15. Značajnost utjecaja kultivara i tretmana na ukupnu aktivnost enzima gvajakol-peroksidaze (GPOXu) u tkivu hipokotila klijanaca soje (podaci su izraženi u μmol min^{-1} g^{-1} sv.t.; podaci su prosjek četiri ponavljanja; ANOVA, F test; prosjeci kultivara označenih istim slovom ne razlikuju se prema LSD testu (a,b,c: $P \leq 0,05$; A,B,C: $P \leq 0,01$); prosjeci tretmana označenih istim slovom ne razlikuju se prema LSD testu (X,Y,Z,W,Q: $P \leq 0,01$)).

GPOXu (μmol min^{-1} g^{-1} sv.t.)	Kontrola	10°C	30°C	50 mM NaCl	100 mM NaCl	5% PEG	10% PEG	F test - tretman	*P*- tretman
LUCIJA	2,328 B / Z	1,757 C / W	1,815 / W	2,569 C / Z	5,109 c / X	4,277 a / Y	4,585 C / Y	122,27	<0,0001
KORANA	3,277 A / Z	3,344 A / Z	1,752 / W	3,145 AB / Z	4,983 c / X	3,995 ab / Y	4,774 BC / X	58,58	<0,0001
VITA	3,275 A / Z	2,421 B / W	2,021 / W	3,243 A / Z	4,956 c / XY	4,527 a / Y	5,624 AB / X	58,48	<0,0001
IKA	2,318 B / ZW	1,513 C / Q	1,895 / WQ	2,699 BC / Z	5,815 a / X	4,544 a / Y	5,840 A / X	115,45	<0,0001
TENA	2,991 A / Z	3,299 A / Z	2,034 / W	2,942 ABC / Z	5,195 bc / X	4,010 ab / Y	5,087 ABC / X	43,58	<0,0001
ZORA	2,761 AB / Z	2,411 B / Z	1,806 / W	3,347 A / Y	5,747 ab / X	3,659 b / Y	5,694 A / X	120,30	<0,0001
F test - kultivar	11,35	37,66	2,19	6,11	3,99	3,38	5,79		
P- kultivar	<0,0001	<0,0001	0,1007	0,0018	0,0130	0,0250	0,0023		

Prema F testu, utjecaj tretmana na ukupnu aktivnost gvajakol-peroksidaze, kod svih šest kultivara soje je bio vrlo značajan (*Tablica 5.15.*). Uspoređujući tretmane primijenjene kod pojedinih kultivara, Lucija i Ika su pri tretmanu 10°C imale najmanju ukupnu aktivnost gvajakol-peroksidaze, dok su Korana, Vita, Tena i Zora najmanju aktivnost imale pri tretmanu 30°C. Lucija, Korana, Tena i Zora su najveću ukupnu aktivnost imale pri tretmanu 100 mM NaCl-om, a Vita i Ika pri tretmanu 10% PEG-om. Svi kultivari osim Lucije, između tretmana 100 mM NaCl-om i 10% PEG-om nisu pokazali značajnu razliku u GPOXu. Svih šest kultivara je u odnosu na kontrolu pokazalo značajno povećanje ukupne aktivnosti gvajakol-peroksidaze pri tretmanima 100 mM NaCl-om, 5% i 10% PEG-om. Između kontrole i tretmana 50 mM NaCl-om nije bilo značajne razlike kod svih kultivara osim Zore, gdje je utvrđeno značajno povećanje aktivnosti enzima pri navedenom tretmanu. U odnosu na kontrolu, Korana, Tena i Zora su imale značajno smanjenje aktivnosti pri tretmanu 30°C, Ika je imala značajno smanjenje pri tretmanu 10°C, dok su Lucija i Vita pokazale značajno smanjenje aktivnosti pri oba tretmana. Između tretmana 10°C i 30°C nije bilo značajne razlike u aktivnosti enzima kod Lucije, Vite i Ike, dok je kod Korane, Tene i Zore uočena

značajno manja aktivnost pri tretmanu 30°C. U odnosu na tretman 50 mM NaCl-om, svi kultivari su imali značajno veću aktivnost pri tretmanu 100 mM NaCl-om. Kod Lucije nije bilo značajne razlike između tretmana 5% i 10% PEG-om, no kod Korane, Vite, Ike, Tene i Zore je GPOXu bila značajno veća pri tretmanu 10% PEG-om.

Najveću specifičnu aktivnost gvajakol-peroksidaze je imala Vita pri tretmanu 50 mM NaCl-om (2,490 μmol min^{-1} mg^{-1} prot.), a najmanju aktivnost Ika pri tretmanu 10°C (0,723 μmol min^{-1} mg^{-1} prot.). F testom je utvrđen vrlo značajan utjecaj kultivara na specifičnu aktivnost gvajakol-peroksidaze u kontroli i pri tretmanima 10°C i 10% PEG-om, a značajan pri tretmanu 5% PEG-om (*Tablica 5.16.*). Pri tretmanima 30°C, 50 mM i 100 mM NaCl-om nije bilo značajnog utjecaja kultivara. Najveću specifičnu aktivnost enzima u kontroli, imala je Vita (2,250 μmol min^{-1} mg^{-1} prot.), a najmanju Ika (1,1365 μmol min^{-1} mg^{-1} prot.). Ika, Zora, Korana i Lucija nisu bile značajno različite u aktivnosti enzima i imale su značajno nižu aktivnost od Vite, dok se Tena nije značajno razlikovala od nijednog kultivara. Pri tretmanu 10°C najveću specifičnu aktivnost gvajakol-peroksidaze imala je Vita, dok su nešto manju aktivnost imale Tena i Korana, koje se nisu značajno razlikovale od Vite. Najmanju aktivnost pri navedenom tretmanu je imala Ika, koja se nije značajno razlikovala od Lucije i Zore. Ika je imala najmanju aktivnost pri tretmanu 5% PEG-om i nije se značajno razlikovala od Lucije i Tene prema LSD testu, pri $P \leq 0,05$. Pri istom tretmanu značajno veću aktivnost u odnosu na Iku su imale Zora, Korana i Vita, no između Zore, Tene, Korane i Lucije nije bilo značajne razlike. Pri tretmanu 10% PEG-om najveću specifičnu aktivnost je imala Ika koja se nije značajno razlikovala od Vite, dok je najmanju aktivnost imala Korana koja se značajno razlikovala od ostalih kultivara.

Utjecaj tretmana je bio vrlo značajan na specifičnu aktivnost gvajakol-peroksidaze kod Lucije, Korane, Ike, Tene i Zore (*Tablica 5.16.*). Kod Vite nije bilo značajnog utjecaja tretmana na specifičnu aktivnost navedenog enzima. Uspoređujući tretmane kod pojedinih kultivara, Lucija, Korana, Ika, Tena i Zora su imale najveću specifičnu aktivnost enzima pri tretmanu 30°C, a Vita pri tretmanu 50 mM NaCl-om. Najmanju specifičnu aktivnost enzima su imale Lucija, Ika i Zora pri tretmanu 10°C, a Korana, Vita i Tena pri tretmanu 10% PEG-om. Kod Lucije između kontrole i svih tretmana osim 10°C nije bilo značajne razlike, a pri tretmanu 10°C utvrđeno je značajno smanjenje specifične aktivnosti gvajakol-peroksidaze u usporedbi s kontrolom i 30°C. Kod Korane je utvrđeno značajno povećanje aktivnosti pri tretmanu 30°C, te smanjenje

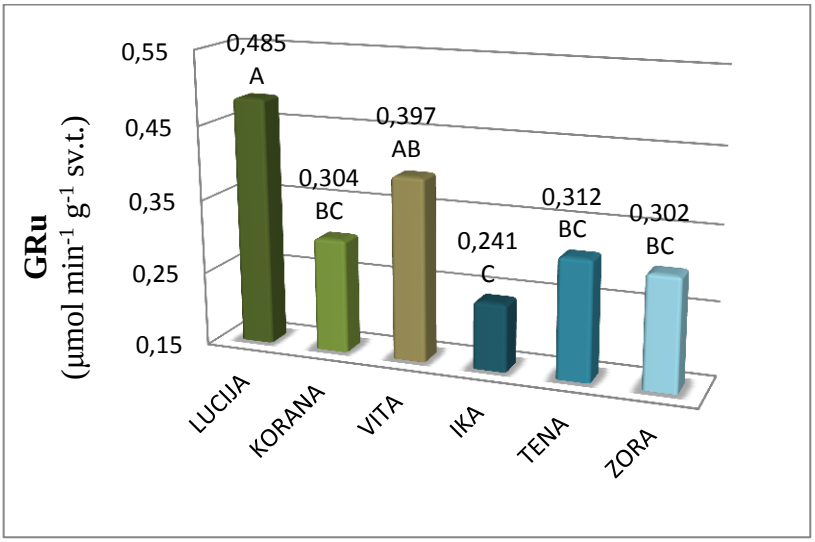
pri tretmanu 10% PEG-om u odnosu na kontrolu i ostale tretmane. U odnosu na kontrolu kod Ike je bilo značajno smanjenje aktivnosti enzima pri tretmanu 10°C i povećanje pri tretmanu 30°C. Tena je imala značajno smanjenje aktivnosti enzima u odnosu na kontrolu pri svim tretmanima osim u tretmanima 10°C i 30°C. Između tretmana pri kojima je izmjerena manja aktivnost enzima u odnosu na kontrolu kod Tene nije bilo značajne razlike. Zora je u odnosu na kontrolu imala značajno manju aktivnost enzima pri tretmanima 10°C, 50 mM NaCl-om i 10% PEG-om, pri čemu aktivnost između tih tretmana nije bila značajno različita. U odnosu na tretman 10°C utvrđeno je značajno povećanje aktivnosti enzima pri tretmanu 30°C kod Lucije, Korane, Ike, Tene i Zore. Kod navedenih kultivara soje nije bilo značajne razlike između tretmana 50 mM i 100 mM NaCl-om. Kod Korane je dobiveno značajno smanjenje specifične aktivnosti enzima pri tretmanu 10% PEG-om u odnosu na tretman 5% PEG-om. Kod Lucije, Ike, Tene i Zore nije bilo značajne razlike u aktivnosti navedenog enzima između tretmana 5% i 10% PEG-om.

Tablica 5.16. Značajnost utjecaja kultivara i tretmana na specifičnu aktivnost enzima gvajakol-peroksidaze (GPOXs) u tkivu hipokotila klijanaca soje (podaci su izraženi u μmol min^{-1} mg^{-1} prot.; podaci su prosjek četiri ponavljanja; ANOVA, F test; prosjeci kultivara označenih istim slovom ne razlikuju se prema LSD testu (a,b,c: $P \leq 0,05$; A,B,C,D,E: $P \leq 0,01$); prosjeci tretmana označenih istim slovom ne razlikuju se prema LSD testu (X,Y,Z,W,Q: $P \leq 0,01$)).

GPOXs (μmol min^{-1} mg^{-1} prot.)	Kontrola	10°C	30°C	50 mM NaCl	100 mM NaCl	5% PEG	10% PEG	F test - tretman	*P*- tretman
LUCIJA	1,398 B / XY	0,852 C / Z	1,763 / X	0,911 / YZ	1,246 / YZ	1,229 bc / YZ	0,902 D / YZ	6,80	0,0004
KORANA	1,391 B / Y	1,366 AB / Y	2,030 / X	1,150 / Y	1,285 / Y	1,353 ab / Y	0,742 E / Z	21,35	<0,0001
VITA	2,250 A /	1,505 A /	1,563 /	2,490 /	1,288 /	1,501 a /	1,186 AB /	1,85	0,1370
IKA	1,365 B / Y	0,723 C / Z	2,128 / X	1,208 / Y	1,363 / Y	1,086 c / YZ	1,247 A / Y	19,03	<0,0001
TENA	1,911 AB / XY	1,475 A / YZ	2,150 / X	1,385 / Z	1,333 / Z	1,241 bc / Z	1,106 BC / Z	10,69	<0,0001
ZORA	1,548 B / XY	0,881 BC / Q	1,745 / X	1,102 / ZWQ	1,461 / XYZ	1,335 ab / YZW	1,022 C / WQ	9,26	<0,0001
F test - kultivar	5,97	7,82	1,91	2,30	2,20	3,16	41,06		
P- kultivar	0,0020	0,0005	0,1430	0,0884	0,0994	0,0319	<0,0001		

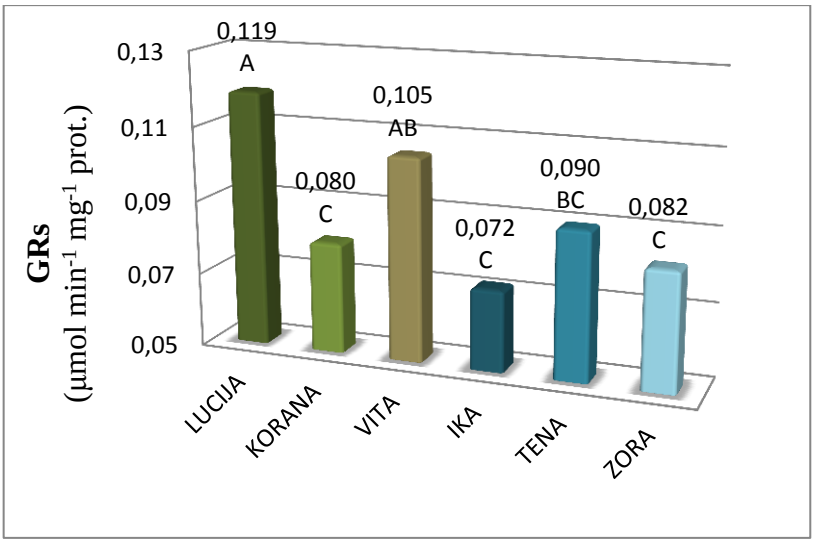
5.1.2.2.4. Aktivnost glutation-reduktaze u tkivu hipokotila klijanaca soje

Analizirajući ukupnu i specifičnu aktivnost glutation-reduktaze u tkivu hipokotila klijanaca, kultivar je imao vrlo značajan utjecaj (*Tablica 5.10.*). U prosjeku za sve tretmane Lucija je imala najveću ukupnu aktivnost glutation-reduktaze (GRu; 0,485 μmol min^{-1} g^{-1} sv.t.; *Slika 5.27.*). Nižu, ali ne značajno različitu aktivnost, imala je Vita. Korana, Tena i Zora nisu imale značajno nižu ukupnu aktivnost od Vite, ali niti od Ike koja je imala najnižu aktivnost (0,241 μmol min^{-1} g^{-1} sv.t.). Ika je imala značajno nižu aktivnost od Lucije i Vite.



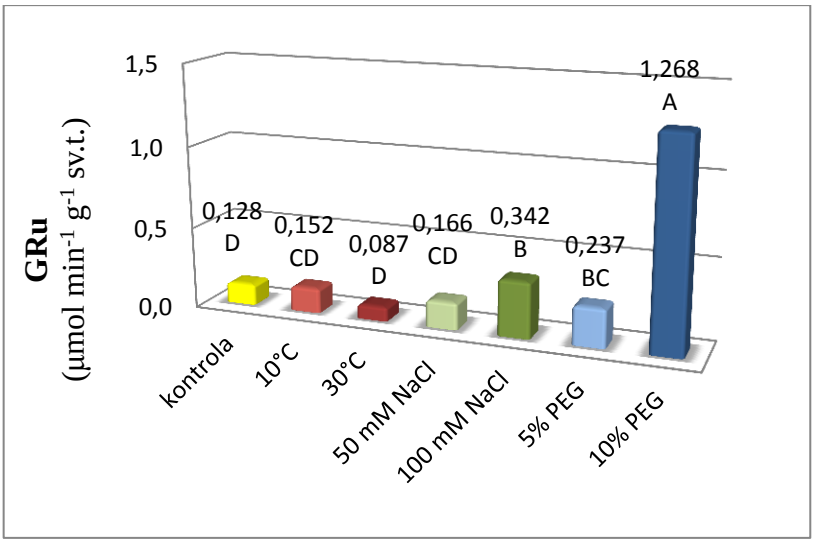
Slika 5.27. Prosječna ukupna aktivnost glutation-reduktaze (GRu; μmol min^{-1} g^{-1} sv.t.), za sve tretmane, u tkivu hipokotila šest kultivara soje. Značajne razlike između kultivara soje označene su različitim slovima prema LSD testu (A,B,C: $P \leq 0,01$).

Lucija je imala najveću specifičnu aktivnost glutation-reduktaze (0,119 μmol min^{-1} mg^{-1} prot.), dok je Vita imala nižu specifičnu aktivnost, ali ne značajno različitu (*Slika 5.28.*). Specifična aktivnost glutation-reduktaze kod Tene je bila niža od aktivnosti kod Vite, a viša od aktivnosti kod Zore, Korane i Ike. Tena se nije značajno razlikovala u specifičnoj aktivnosti od Vite, Zore, Korane i Ike. Najnižu aktivnost imala je Ika (0,072 μmol min^{-1} mg^{-1} prot.).

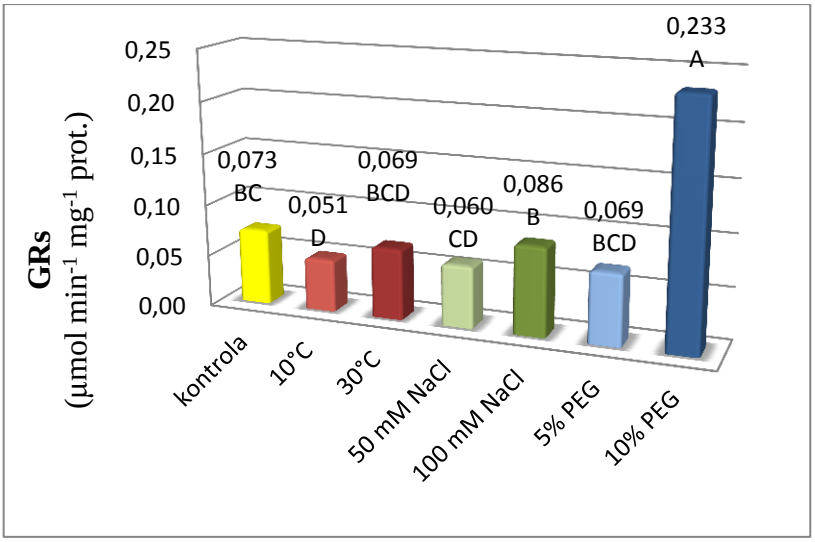


Slika 5.28. Prosječna specifična aktivnost glutation-reduktaze (GRs; µmol min^{-1} mg^{-1} prot.), za sve tretmane, u tkivu hipokotila šest kultivara soje. Značajne razlike između kultivara soje označene su različitim slovima prema LSD testu (A,B,C: $P \leq 0,01$).

Prema F testu, tretman je vrlo značajno utjecao na ukupnu i specifičnu aktivnost glutation-reduktaze u tkivu hipokotila klijanaca (*Tablica 5.10.*). U prosjeku za sve kultivare utvrđena je najveća ukupna aktivnost glutation-reduktaze pri tretmanu 10% PEG-om (1,268 µmol min^{-1} g^{-1} sv.t.; *Slika 5.29.*). Najniža aktivnost bila je pri tretmanu 30°C, ali se nije značajno razlikovala od nešto veće aktivnosti u kontroli (0,128 µmol min^{-1} g^{-1} sv.t.), kao ni od tretmana 10°C i 50 mM NaCl-om. Aktivnost pri tretmanima 10°C i 50 mM NaCl-om nije se značajno razlikovala od aktivnosti pri tretmanu 5% PEG-om, ali je bila značajno manja od aktivnosti pri tretmanu 100 mM NaCl-om. Ukupna aktivnost glutation-reduktaze između tretmana 5% PEG-om i 100 mM NaCl-om se nije značajno razlikovala. Aktivnost GRu pri tretmanima nižeg i višeg osmotskog stresa bila je značajno veća u odnosu na kontrolu. Aktivnost u optimalnim uvjetima nije se značajno razlikovala od aktivnosti pri tretmanu 50 mM NaCl-om, no obje su bile značajno niže od aktivnosti pri tretmanu 100 mM NaCl-om. Temperaturni tretmani se nisu značajno razlikovali od kontrole u ukupnoj aktivnosti GR.



Slika 5.29. Prosječna ukupna aktivnost glutation-reduktaze u tkivu hipokotila klijanaca (GRu; μmol min^{-1} g^{-1} sv.t.), za sve kultivare, po tretmanima. Značajne razlike između tretmana označene su različitim slovima prema LSD testu (A,B,C,D: $P \leq 0,01$).



Slika 5.30. Prosječna specifična aktivnost glutation-reduktaze u tkivu hipokotila klijanaca (GRs; μmol min^{-1} mg^{-1} prot.), za sve kultivare, po tretmanima. Značajne razlike između tretmana označene su različitim slovima prema LSD testu (A,B,C,D: $P \leq 0,01$).

U prosjeku za sve kultivare specifična aktivnost glutation-reduktaze je bila najveća pri tretmanu 10% PEG-om (GRs; 0,233 μmol min^{-1} mg^{-1} prot.; *Slika 5.30.*). Aktivnosti ovog enzima u kontroli i pri tretmanima 100 mM NaCl-om, 30°C, i 5% PEG-om su bile značajno niže u odnosu na aktivnost pri višoj razini osmotskog stresa, ali se međusobno nisu značajno razlikovale. Najnižu specifičnu aktivnost glutation-reduktaze kultivari su, u prosjeku, imali pri tretmanu 10°C (0,051 μmol min^{-1} mg^{-1} prot.), ali se ona nije

značajno razlikovala od aktivnosti pri tretmanima 30°C, 50 mM NaCl-om i 5% PEG-om. Prema specifičnoj aktivnosti GR kontrola se nije značajno razlikovala od tretmana pri 30°C, 50 mM NaCl-om, 100 mM NaCl-om, te 5% PEG-om. Aktivnost pri tretmanu 10°C bila je značajno niža u odnosu na kontrolu, a pri 10% PEG-om značajno veća.

Najveću ukupnu aktivnost glutation-reduktaze je imala Lucija pri tretmanu 10% PEG-om (1,953 μmol min^{-1} g^{-1} sv.t.), a najmanju Korana pri tretmanu 30°C (0,0721 μmol min^{-1} g^{-1} sv.t.). Kultivar je vrlo značajno utjecao na ukupnu aktivnost glutation-reduktaze pri tretmanima 10°C, 100 mM NaCl-om i 10% PEG-om, a značajno pri tretmanima 50 mM NaCl-om i 5% PEG-om (*Tablica 5.17.*). U kontroli i tretmanu 30°C nije bilo značajnog utjecaja kultivara na ukupnu aktivnost glutation-reduktaze. Uspoređujući kultivare u pojedinim tretmanima, najveću aktivnost pri 10°C je imala Vita, pri 30°C Tena, pri tretmanu 50 mM NaCl-om Korana, a pri tretmanima 100 mM NaCl-om, 5% i 10% PEG-om Lucija. Najmanju ukupnu aktivnost glutation-reduktaze pri tretmanu 10°C je imala Zora, pri tretmanu 30°C Korana, pri tretmanu 50 mM NaCl-om Tena, pri tretmanu 100 mM NaCl-om Korana, pri tretmanu 5% PEG-om Zora, a pri tretmanu 10% PEG-om Ika. Između Vite, Korane, Ike i Tene pri tretmanu 10°C nije bilo značajne razlike, a Zora se nije značajno razlikovala od Lucije i Ike. Kod niže razine solnog stresa između Korane, Lucije, Ike i Zore nije bilo značajne razlike, a Tena se nije značajno razlikovala od Vite i Lucije prema LSD testu pri $P \leq 0,05$. Lucija je, pri tretmanu 100 mM NaCl-om, imala značajno višu aktivnost enzima u odnosu na ostale kultivare, koji se međusobno nisu značajno razlikovali. Pri tretmanu 5% PEG-om, prema LSD testu pri $P \leq 0,05$, Lucija se nije značajno razlikovala od Ike, a Zora se nije značajno razlikovala od Korane, Vite i Tene. Između Lucije i Vite pri tretmanu 10% PEG-om nije bilo značajne razlike, kao ni između Ike, Tene, Zore i Korane.

F testom je utvrđen vrlo značajan utjecaj tretmana na ukupnu aktivnost glutation-reduktaze kod svih šest kultivara soje (*Tablica 5.17.*). Uspoređujući tretmane primijenjene kod pojedinog kultivara, svi kultivari su imali najmanju ukupnu aktivnost navedenog enzima pri tretmanu 30°C, a značajno najveću aktivnost pri tretmanu 10% PEG-om. Korana, Vita, Ika, Tena i Zora nisu pokazale značajnu razliku u aktivnosti enzima pri tretmanima više i niže razine temperaturnog i solnog stresa, te na nižoj razini osmotskog stresa, u odnosu na kontrolu. Navedeni kultivari su pokazali značajno veću aktivnost pri tretmanu 10% PEG-om u odnosu na kontrolu. Lucija je imala značajno

povećanje ukupne aktivnosti glutation-reduktaze, u odnosu na kontrolu, pri tretmanima 100 mM NaCl-om, 5% i 10% PEG-om. U odnosu na tretman 10°C, svi kultivari su pokazali smanjenje aktivnosti enzima pri tretmanu 30°C, ali ne značajno. Povećanje aktivnosti pri tretmanu 100 mM NaCl-om u odnosu na tretman 50 mM NaCl-om utvrđeno je kod svih kultivara, ali je bilo značajno jedino kod Lucije. Značajno povećanje aktivnosti enzima pri tretmanu 10% PEG-om u odnosu na tretman 5% PEG-om dobiveno je kod svih kultivara.

Tablica 5.17. Značajnost utjecaja kultivara i tretmana na ukupnu aktivnost enzima glutation-reduktaze (GRu) u tkivu hipokotila klijanaca soje (podaci su izraženi u μmol min^{-1} g^{-1} sv.t.; podaci su prosjek četiri ponavljanja; ANOVA, F test; prosjeci kultivara označenih istim slovom ne razlikuju se prema LSD testu (a,b,c: $P \leq 0,05$; A,B,C: $P \leq 0,01$); prosjeci tretmana označenih istim slovom ne razlikuju se prema LSD testu (X,Y,Z,W: $P \leq 0,01$)).

GRu (μmol min^{-1} g^{-1} sv.t.)	Kontrola	10°C	30°C	50 mM NaCl	100 mM NaCl	5% PEG	10% PEG	F test - tretman	*P*- tretman
LUCIJA	0,129 / W	0,136 BC / W	0,0917 / W	0,164 abc / ZW	0,629 A / Y	0,294 a / Z	1,953 A / X	343,31	<0,0001
KORANA	0,113 / Y	0,166 AB / Y	0,0721 / Y	0,183 a / Y	0,265 B / Y	0,216 bc / Y	1,113 BC / X	19,67	<0,0001
VITA	0,128 / YZ	0,178 A / YZ	0,0911 / Z	0,158 bc / YZ	0,315 B / Y	0,236 bc / YZ	1,673 AB / X	110,66	<0,0001
IKA	0,132 / Y	0,144 ABC / Y	0,0902 / Y	0,173 ab / Y	0,295 B / XY	0,249 ab / Y	0,604 C / X	4,88	0,0029
TENA	0,140 / Y	0,165 AB / Y	0,0976 / Y	0,144 c / Y	0,280 B / Y	0,230 bc / Y	1,124 BC / X	30,50	<0,0001
ZORA	0,128 / Y	0,122 C / Y	0,0815 / Y	0,173 ab / Y	0,267 B / Y	0,198 c / Y	1,144 BC / X	15,58	<0,0001
F test - kultivar	1,96	5,23	2,02	3,43	7,50	3,89	7,00		
P- kultivar	0,1345	0,0039	0,1250	0,0236	0,0006	0,0144	0,0009		

Najveću specifičnu aktivnost glutation-reduktaze je imala Lucija pri tretmanu 10% PEG-om (0,360 μmol min^{-1} mg^{-1} prot.), a najmanju aktivnost Zora pri tretmanu 10°C (0,0470 μmol min^{-1} mg^{-1} prot.). Utvrđen je vrlo značajan utjecaj kultivara na specifičnu aktivnost glutation-reduktaze pri tretmanima 100 mM NaCl-om i 10% PEG-om, a značajan utjecaj u kontroli (*Tablica 5.18.*). Pri tretmanima 10°C, 30°C, 50 mM NaCl-om i 5% PEG-om nije bilo značajnog utjecaja kultivara na GRs. U kontroli,

najmanju specifičnu aktivnost je imala Lucija (0,0650 μmol min^{-1} mg^{-1} prot.), a najveću Tena (0,0911 μmol min^{-1} mg^{-1} prot.). Prema LSD testu pri $P \leq 0,05$, od Lucije se nisu značajno razlikovale Korana, Ika i Zora, dok se Vita nije značajno razlikovala od nijednog kultivara. Uspoređujući kultivare u pojedinim tretmanima, najveću specifičnu aktivnost pri tretmanu 10°C je imala Tena, pri tretmanima 30°C i 50 mM NaCl-om je imala Ika, a pri tretmanima 100 mM NaCl-om, 5% i 10% PEG-om najveću aktivnost je pokazala Lucija. Najmanju specifičnu aktivnost glutation-reduktaze pri tretmanima 10°C, 50 mM i 100 mM NaCl-om je imala Zora, pri tretmanu 30°C je imala Vita, a pri tretmanima 5% i 10% PEG-om je imala Ika. Pri tretmanu 100 mM NaCl-om, u odnosu na Luciju, svi ostali kultivari su imali značajno manju aktivnost te se međusobno nisu razlikovali. Pri tretmanu 10% PEG-om, Zora, Tena, Ika i Korana se nisu značajno razlikovale i imale su značajno nižu specifičnu aktivnost u odnosu na Vitu i Luciju, koje su imale najveću aktivnost.

Tablica 5.18. Značajnost utjecaja kultivara i tretmana na specifičnu aktivnost enzima glutation-reduktaze (GRs) u tkivu hipokotila klijanaca soje (podaci su izraženi u μmol min^{-1} mg^{-1} prot.; podaci su prosjek četiri ponavljanja; ANOVA, F test; prosjeci kultivara označenih istim slovom ne razlikuju se prema LSD testu (a,b: $P \leq 0,05$; A,B: $P \leq 0,01$); prosjeci tretmana označenih istim slovom ne razlikuju se prema LSD testu (X,Y,Z: $P \leq 0,01$)).

GRs (μmol min^{-1} mg^{-1} prot.)	Kontrola	10°C	30°C	50 mM NaCl	100 mM NaCl	5% PEG	10% PEG	F test - tretman	*P*-tretman
LUCIJA	0,0650 b / Z	0,0513 / Z	0,0690 / Z	0,0596 / Z	0,1537 A / Y	0,0778 / Z	0,360 A / X	140,32	<0,0001
KORANA	0,0653 b / Y	0,0519 / Y	0,0716 / Y	0,0546 / Y	0,0711 B / Y	0,0713 / Y	0,205 B / X	17,20	<0,0001
VITA	0,0831 ab / Y	0,0522 / Y	0,0528 / Y	0,0591 / Y	0,0837 B / Y	0,0734 / Y	0,332 A / X	72,89	<0,0001
IKA	0,0672 b /	0,0472 /	0,0773 /	0,0742 /	0,0687 B /	0,0597 /	0,113 B /	2,06	0,1020
TENA	0,0911 a / Y	0,0564 / Y	0,0693 / Y	0,0600 / Y	0,0701 B / Y	0,0653 / Y	0,214 B / X	19,76	<0,0001
ZORA	0,0684 b / Y	0,0470 / Y	0,0710 / Y	0,0526 / Y	0,0659 B / Y	0,0667 / Y	0,176 B / X	13,40	<0,0001
F test - kultivar	2,96	0,73	1,88	2,15	6,83	1,53	11,79		
P-kultivar	0,0402	0,6086	0,1487	0,1064	0,0010	0,2302	<0,0001		

Vrlo značajan utjecaj tretmana na specifičnu aktivnost glutation-reduktaze je utvrđen kod pet kultivara soje (Lucija, Korana, Vita, Tena i Zora; *Tablica 5.18.*). Kod Ike nije utvrđen značajan utjecaj tretmana na specifičnu aktivnost glutation-reduktaze. Uspoređujući tretmane kod pojedinog kultivara, svi kultivari su imali najmanju aktivnost pri tretmanu 10°C, a najveću pri tretmanu 10% PEG-om. Korana, Vita, Tena i Zora su u odnosu na kontrolu imale značajno povećanje specifične aktivnosti enzima pri tretmanu 10% PEG-om, dok je Lucija imala značajno povećanje pri tretmanu 100 mM NaCl-om i 10% PEG-om. Svi ostali tretmani kod navedenih kultivara se nisu značajno razlikovali od kontrole. Također, između tretmana 10°C i 30°C nije bilo značajne razlike. Kod Lucije je utvrđeno značajno povećanje aktivnosti enzima pri tretmanu 100 mM NaCl-om u odnosu na tretman 50 mM NaCl-om. Aktivnost GRs kod Lucije, Korane, Vite, Tene i Zore se značajno povećala pri tretmanu 10% PEG-om, u odnosu na tretman 5% PEG-om.

5.2. FENOLOŠKA FAZA: PUNA CVATNJA

5.2.1. Morfološka svojstva

Analizom dobivenih rezultata ocijenjen je utjecaj kultivara, tretmana i njihove interakcije na morfološka svojstva soje u fenofazi pune cvatnje (R_2). Prema vrijednostima F testa kultivar i tretman su imali vrlo značajan utjecaj na masu listova po biljci i masu troliske (*Tablica 5.19.*).

Tablica 5.19. Značajnost utjecaja kultivara i tretmana na pokazatelje morfoloških svojstava soje u fazi pune cvatnje (prikazani podaci su izračunate razine značajnosti (P) prema F testu).

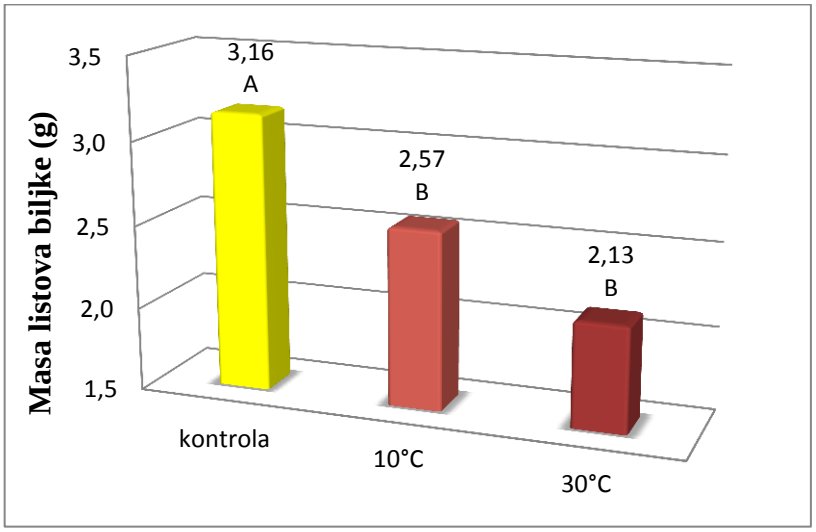
		Masa listova po biljci	Masa troliske	Broj troliski po biljci
KULTIVAR (A)	F test	8,99	9,58	5,71
	P	0,0077	0,0062	0,0280
TRETMAN (B)	F test	16,74	8,84	21,87
	P	<0,0001	0,0021	<0,0001
INTERAKCIJA (AxB)	F test	0,44	1,72	4,48
	P	0,6511	0,2081	0,0263

Interakcija kultivar x tretman nije imala značajan utjecaj na navedena morfološka svojstva. Na broj troliski po biljci tretman je imao vrlo značajan utjecaj, a kultivar i interakcija kultivar x tretman su imali značajan utjecaj.

5.2.1.1. Masa listova po biljci

Analizirajući masu listova biljke, u prosjeku za sve tretmane kod pojedinih kultivara, prema F testu, kultivar je vrlo značajno utjecao na masu listova (*Tablica 5.19.*). Između Tene i Zore, u prosjeku za sve tretmane, bila je značajna razlika u masi listova biljke gdje je Tena imala veću masu (2,84 g) od Zore (2,40 g).

Analizirajući masu listova biljke, u prosjeku za sve kultivare po primijenjenim tretmanima, F testom je utvrđen vrlo značajan utjecaj tretmana na masu listova (*Tablica 5.19.*). Značajno najveća masa listova biljke, u prosjeku za sve kultivare, bila je u kontroli (*Slika 5.31.*). Najmanja masa listova biljke je bila pri tretmanu 30°C, no nije bilo značajne razlike u masi između tretmana pri 30°C i 10°C.



Slika 5.31. Prosječna masa listova biljke (g), u prosjeku za dva kultivara soje, po tretmanima. Značajne razlike između tretmana označene su različitim slovima prema LSD testu (A,B: $P \leq 0{,}01$).

Najveću masu listova po biljci u fazi pune cvatnje je imala Tena u kontroli (3,475 g), a najmanju masu listova biljke je imala Zora pri tretmanu 30°C (1,937 g). Kultivar je vrlo značajno utjecao na masu listova biljke pri tretmanu 30°C (*Tablica 5.20.*). Kultivar nije

značajno utjecao na masu listova biljke u kontroli i pri tretmanu 10°C. Pri tretmanu 30°C Zora je imala značajno manju lisnu masu po biljci od Tene.

Tablica 5.20. Značajnost utjecaja kultivara i tretmana na masu listova po biljci i masu troliske (podaci su izraženi u g; podaci su prosjek četiri ponavljanja; ANOVA, F test; prosjeci kultivara označenih istim slovom, ne razlikuju se prema LSD testu (a,b: $P \leq 0,05$; A,B: $P \leq 0,01$); prosjeci tretmana označenih istim slovom ne razlikuju se prema LSD testu (X,Y,Z: $P \leq 0,01$)).

	Kontrola	10°C	30°C	F test - tretman	*P*-tretman
	Masa listova biljke (g)				
TENA	3,475 / x	2,720 / xy	2,325 A / y	6,07	0,0214
ZORA	2,850 / X	2,419 / Y	1,937 B / Z	26,76	0,0002
F test - kultivar	4,12	1,00	24,96		
P-kultivar	0,0888	0,3570	0,0025		
	Masa troliske (g)				
TENA	0,580 /	0,547 /	0,534 A /	0,90	0,4417
ZORA	0,568 / X	0,495 / Y	0,449 B / Y	21,44	0,0004
F test - kultivar	0,14	2,48	42,36		
P-kultivar	0,7198	0,1660	0,0006		
	Broj troliski po biljci				
TENA	5,966 a / X	4,934 / Y	4,348 / Y	14,08	0,0017
ZORA	5,019 b / X	4,881 / X	4,323 / Y	10,01	0,0052
F test - kultivar	10,78	0,04	0,03		
P-kultivar	0,0167	0,8554	0,8727		

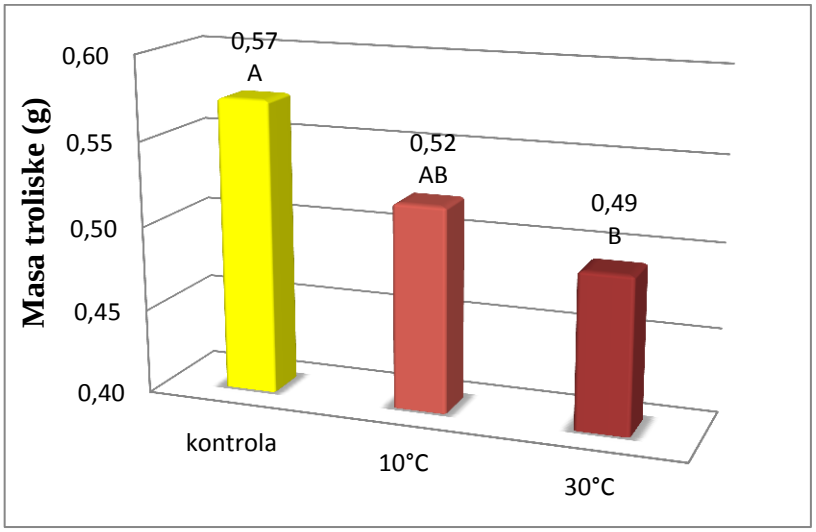
Tretman je imao vrlo značajan utjecaj na masu listova biljke kod Zore, te značajan utjecaj kod Tene (*Tablica 5.20.*). Masa listova biljke kod Tene u kontroli je bila najveća i značajno se razlikovala od najmanje mase listova pri tretmanu 30°C, prema LSD testu pri $P \leq 0,05$. Masa listova pri tretmanu 10°C se nije značajno razlikovala od mase listova u kontroli i pri tretmanu 30°C. Zora je imala najveću masu listova biljke u kontroli, a najmanju pri tretmanu 30°C. Masa listova biljke u kontroli značajno se

razlikovala od nešto nižih vrijednosti mase listova pri tretmanu 10°C i još nižih vrijednosti pri tretmanu 30°C. Masa listova kod Zore pri tretmanu 10°C i 30°C je bila značajno različita.

5.2.1.2. Masa troliske

Analizirajući rezultate u prosjeku za sve tretmane, kultivar je vrlo značajno utjecao na masu troliske (*Tablica 5.19.*). Tena je imala najveću masu troliske (0,55 g) i značajno se razlikovala od Zore (0,50 g).

Prema F testu, analizirajući masu troliske kod primijenjenih tretmana u prosjeku za sve kultivare tretman je imao vrlo značajan utjecaj na masu troliske (*Tablica 5.19.*). U prosjeku za sve kultivare masa troliske je bila najveća u kontroli, no nije se značajno razlikovala od tretmana pri 10°C (*Slika 5.32.*). Najmanja masa troliske u prosjeku za sve kultivare je bila pri tretmanu 30°C. Masa troliske pri 30°C značajno se razlikovala od mase troliske u kontroli, no nije se razlikovala od mase troliske pri tretmanu 10°C.



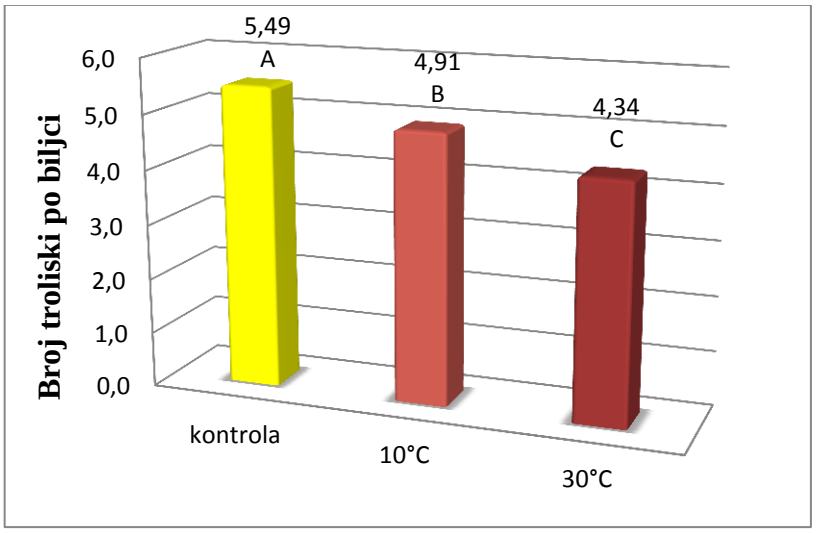
Slika 5.32. Prosječna masa troliske (g), u prosjeku za dva kultivara soje, po tretmanima. Značajne razlike između tretmana označene su različitim slovima prema LSD testu (A,B: $P \leq 0{,}01$).

Najveću masu troliske je imala Tena u kontroli (0,580 g), a najmanju Zora pri tretmanu 30°C (0,449 g). Prema F testu, kultivar je imao vrlo značajan utjecaj na masu troliske pri tretmanu 30°C, no nije imao značajan utjecaj na masu u kontroli i pri tretmanu 10°C

(*Tablica 5.20.*). Tena je pri svim primijenjenim tretmanima imala veću prosječnu masu troliske, no samo je pri tretmanu 30°C imala statistički značajno veću masu od Zore.
Tretman nije imao značajan utjecaj na masu troliske kod Tene, dok je kod Zore imao vrlo značajan utjecaj (*Tablica 5.20.*). Zora je imala najveću masu troliske u kontroli a najmanju pri tretmanu 30°C. Kod Zore masa troliske pri tretmanu 10°C i 30°C nije se značajno razlikovala, no masa troliske kod navedenih tretmana bila je značajno niža u odnosu na masu u kontroli.

5.2.1.3. Broj troliski po biljci

Analizirajući broj troliski po biljci u prosjeku za sve tretmane kod pojedinog kultivara, prema F testu, kultivar je značajno utjecao na broj troliski po biljci (*Tablica 5.19.*). Tena je imala značajno više troliski po biljci (5,08) od Zore (4,74), prema LSD testu pri $P \leq 0,05$.
Analizirajući broj troliski u prosjeku za sve kultivare, po primijenjenim tretmanima je utvrđen vrlo značajan utjecaj tretmana na broj troliski po biljci (*Tablica 5.19.*). Najviše troliski u prosjeku za sve kultivare je bilo u kontrolnim uvjetima, a najmanje pri tretmanu 30°C (*Slika 5.33.*). Kultivari u kontroli i pri svim primijenjenim tretmanima međusobno su se statistički značajno razlikovali u broju troliski po biljci.



Slika 5.33. Prosječan broj troliski po biljci, u prosjeku za dva kultivara soje, po tretmanima. Značajne razlike između tretmana označene su različitim slovima prema LSD testu (A,B,C: $P \leq 0,01$).

Najviše troliski po biljci imala je Tena u kontroli (5,966), a najmanje Zora pri tretmanu 30°C (4,323). Kultivar nije imao značajan utjecaj na broj troliski po biljci pri tretmanima 10°C i 30°C, dok je u kontroli imao značajan utjecaj (*Tablica 5.20.*). U kontroli Tena je imala značajno više troliski po biljci od Zore, prema LSD testu pri $P \leq 0{,}05$.

Prema F testu, tretman je imao vrlo značajan utjecaj na broj troliski po biljci kod Zore i Tene (*Tablica 5.20.*). Tena je u kontroli imala najveći broj troliski po biljci, a pri tretmanu 30°C najmanji broj troliski. Pri tretmanima 10°C i 30°C broj troliski nije se značajno razlikovao, no na navedenim tretmanima broj troliski bio je značajno manji u odnosu na kontrolu. Zora je najveći broj troliski po biljci imala u kontroli koja se po broju troliski statistički značajno nije razlikovala od tretmana pri 10°C. Najmanji broj troliski po biljci Zora je imala pri tretmanu 30°C te se vrijednošću značajno razlikovala od ostalih tretmana.

5.2.2. Pokazatelji fotosintetske aktivnosti

Utjecaj kultivara, tretmana i njihove interakcije na pokazatelje fotosintetske aktivnosti soje u fenofazi pune cvatnje (R_2) bio je različit. Prema vrijednostima F testa kultivar nije imao značajan utjecaj na sadržaj klorofila i karotenoida, te omjer klorofil a+b/karotenoidi u listovima soje (*Tablica 5.21.*). Kultivar je imao vrlo značajan utjecaj na omjer klorofila a/b. Tretman je imao vrlo značajan utjecaj na sadržaj i omjere fotosintetskih pigmenata. Interakcija kultivar x tretman nije imala značajan utjecaj na sadržaj klorofila a, b i a+b, te omjere klorofila a/b i klorofila a+b/karotenoidi. Na sadržaj karotenoida u listovima interakcija kultivar x tretman je imala značajan utjecaj.

Tablica 5.21. Značajnost utjecaja kultivara i tretmana na sadržaj i omjere fotosintetskih pigmenata u listovima soje u fazi pune cvatnje (prikazani podaci su izračunate razine značajnosti (P) prema F testu).

		Klorofil a	Klorofil b	Klorofil a+b	Karotenoidi	Klorofil a/b	Klorofil a+b/Karotenoidi
KULTIVAR (A)	F test	0,02	3,47	0,20	0,17	10,20	0,03
	P	0,8810	0,0788	0,6564	0,6830	0,0050	0,8582
TRETMAN (B)	F test	52,54	21,96	46,76	59,12	18,35	6,59
	P	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0071
INTERAKCIJA (AxB)	F test	2,26	0,67	1,82	4,17	1,70	0,80
	P	0,1336	0,5243	0,1903	0,0325	0,2114	0,4645

Tablica 5.22. Značajnost utjecaja kultivara i tretmana na pokazatelje fotosintetske aktivnosti PS II u intaktnim listovima soje u fazi pune cvatnje (prikazani podaci su izračunate razine značajnosti (P) prema F testu; minimalna razina fluorescencije (F_0), maksimalna fluorescencija (Fm), varijabilna fluorescencija (Fv), poluvrijeme porasta (t½), maksimalni kvantni prinos PS II (Fv/Fm), omjer varijabilne i početne fluorescencije (Fv/F_0))

		F_0	Fm	Fv	t ½	Fv/Fm	Fv/F_0
KULTIVAR (A)		2,21	1,31	1,33	8,35	3,53	0,82
	P	0,1543	0,2670	0,2647	0,0097	0,0766	0,3779
TRETMAN (B)	F test	78,55	20,89	12,25	12,26	287,99	355,15
	P	<0,0001	<0,0001	0,0004	0,0004	<0,0001	<0,0001
INTERAKCIJA (AxB)	F test	1,62	2,25	2,27	3,91	2,41	1,87
	P	0,2260	0,1345	0,1318	0,0388	0,1182	0,1823

Utjecaj kultivara, tretmana i njihova interakcija na pokazatelje fotosintetske aktivnosti fotosustava II (PS II) u intaktnim listovima soje u fazi pune cvatnje su ocijenjeni na temelju rezultata dobivenih mjerenjem fluorescencije. Kultivar nije imao značajan utjecaj na minimalnu razinu fluorescencije (F_0), maksimalnu razinu fluorescencije (Fm), varijabilnu fluorescenciju (Fv), maksimalni kvantni prinos PS II (Fv/Fm) te omjer varijabilne i početne fluorescencije (Fv/F_0; *Tablica 5.22.*). Kultivar je imao vrlo

značajan utjecaj na poluvrijeme porasta (t½) od F_0 do Fm. Tretman je imao vrlo značajan utjecaj na sve pokazatelje fotosintetske aktivnosti prikupljene mjerenjem fluorescencije (F_0, Fm, Fv, t½, Fv/Fm, Fv/F_0). Interakcija kultivar x tretman nije imala značajan utjecaj na minimalnu i maksimalnu razinu fluorescencije, varijabilnu fluorescenciju, maksimalni kvantni prinos PS II te omjer varijabilne i početne fluorescencije. Na poluvrijeme porasta (t½) interakcija kultivar x tretman je imala značajan utjecaj.

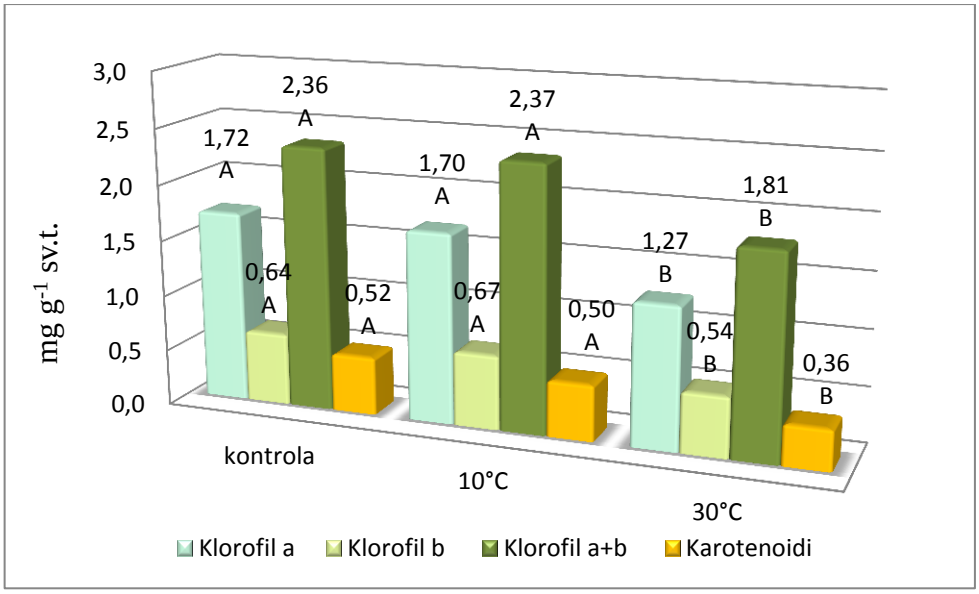
5.2.2.1. Sadržaj i omjeri fotosintetskih pigmenata

Analizirajući sadržaj fotosintetskih pigmenata lista biljke u prosjeku za sve tretmane kod pojedinog kultivara, prema F testu, kultivar nije značajno utjecao na sadržaj klorofila a, b, a+b i karotenoide (*Tablica 5.21.*). U prosjeku za sve tretmane Tena je imala veći sadržaj klorofila a (1,57 mg g^{-1} sv.t.) od Zore (1,56 mg g^{-1} sv.t.). Zora je imala veći sadržaj klorofila b (0,63 mg g^{-1} sv.t.), a+b (2,19 mg g^{-1} sv.t.) i karotenoida (0,47 mg g^{-1} sv.t.) od Tene (slijedom 0,6 mg g^{-1} sv.t.; 2,17 mg g^{-1} sv.t.; 0,46 mg g^{-1} sv.t.).

Kod pojedinog kultivara u prosjeku za sve tretmane, kultivar je vrlo značajno utjecao na omjer klorofila a/b ali nije značajno utjecao na omjer klorofila a+b/karotenoidi u tkivu lista soje (*Tablica 5.21.*). U prosjeku za sve tretmane Tena je imala značajno veći sadržaj pigmenata u omjeru klorofila a/b (2,59) u odnosu na Zoru (2,46). Omjer pigmenata klorofil a+b/karotenoidi je bio veći, u prosjeku za sve tretmane, kod Zore (4,76) u odnosu na Tenu (4,74).

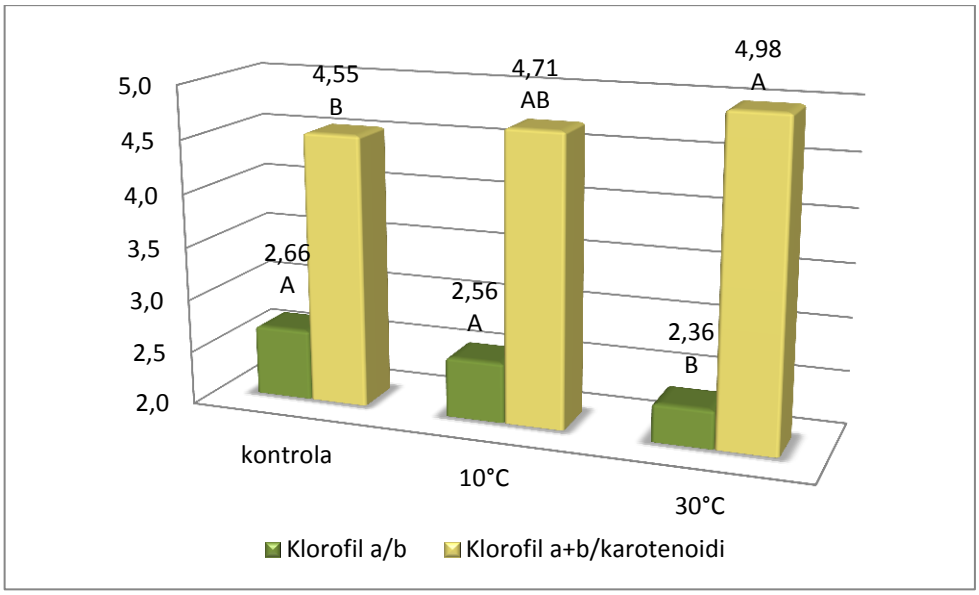
Tretman je u prosjeku za sve kultivare imao vrlo značajan utjecaj na sadržaj svih mjerenih pigmenata i njihove omjere (*Tablica 5.21.*). U kontroli sadržaj klorofila a je bio najveći u prosjeku za sve kultivare (1,72 mg g^{-1} sv.t.), ali se nije značajno razlikovao od nešto nižih vrijednosti pri tretmanu 10°C (*Slika 5.34.*). Statistički značajno manji sadržaj klorofila a je bio pri tretmanu 30°C (1,27 mg g^{-1} sv.t.). Najveći sadržaj klorofila b je bio pri tretmanu 10°C (0,67 mg g^{-1} sv.t.) i nije se značajno razlikovao od nešto nižih vrijednosti u kontroli, ali se značajno razlikovao od najnižih vrijednosti pri tretmanu

30°C (0,54 mg g^{-1} sv.t.). U prosjeku za sve kultivare sadržaj klorofila a+b je bio najveći pri tretmanu 10°C (2,37 mg g^{-1} sv.t.), a najniži pri tretmanu 30°C (1,81 mg g^{-1} sv.t.). Sadržaji klorofila a+b u kontroli i pri tretmanu 10°C su bili značajno veći u odnosu na sadržaj pri tretmanu 30°C. Sadržaj karotenoida je bio najveći u kontroli (0,52 mg g^{-1} sv.t.), nešto niži pri tretmanu 10°C, a najniži pri tretmanu 30°C (0,36 mg g^{-1} sv.t.). Pri tretmanu 30°C sadržaj karotenoida u prosjeku za sve kultivare je bio značajno niži u odnosu na sadržaj karotenoida u kontroli i pri tretmanu 10°C.



Slika 5.34. Prosječan sadržaj klorofila a, klorofila b, klorofila a+b i karotenoida (mg g^{-1} sv.t.), u prosjeku za dva kultivara soje, po tretmanima. Značajne razlike između tretmana označene su različitim slovima prema LSD testu (A,B: $P \leq 0{,}01$).

Omjer klorofila a/b je bio najveći u kontroli (2,66), a najniži pri tretmanu 30°C (2,36), dok je za omjer klorofil a+b/karotenoidi bilo obrnuto (kontrola - 4,55; tretman 30°C - 4,98; *Slika 5.35.*). Omjeri klorofila a/b u kontroli i pri tretmanu 10°C međusobno se nisu značajno razlikovali, ali su se značajno razlikovali od tretmana pri 30°C. Omjeri klorofila a+b/karotenoidi u kontroli i pri tretmanu 30°C značajno su se razlikovali, dok se navedeni omjer pri tretmanu 10°C nije značajno razlikovao od ostalih tretmana.



Slika 5.35. Omjer klorofila a/b i klorofila a+b/karotenoida, u prosjeku za dva kultivara soje, po tretmanima. Značajne razlike između tretmana označene su različitim slovima prema LSD testu (A,B: $P \leq 0{,}01$).

Najveći sadržaj **klorofila a** u fazi pune cvatnje je imala Zora u kontroli (1,771 mg g^{-1} sv.t.), a najmanji sadržaj je imala Zora pri tretmanu 30°C (1,251 mg g^{-1} sv.t.). Prema F testu kultivar nije značajno utjecao na sadržaj klorofila a niti pri jednom tretmanu (*Tablica 5.23.*).

Tretman je imao vrlo značajan utjecaj na sadržaj klorofila a kod oba kultivara (*Tablica 5.23.*). Tena je imala najveći sadržaj klorofila a pri tretmanu 10°C, nešto niži sadržaj je imala u kontroli, a najniži pri 30°C. Sadržaj klorofila a pri tretmanu 30°C bio je značajno niži u odnosu na sadržaj u kontroli i pri tretmanu 10°C, no nije bilo značajne razlike između vrijednosti sadržaja u kontroli i pri tretmanu 10°C.

Sadržaj **klorofila b** bio je najveći kod Zore u kontroli (0,669 mg g^{-1} sv.t.), a najmanji kod Tene pri 30°C (0,523 mg g^{-1} sv.t.). Prema F testu kultivar nije značajno utjecao na sadržaj klorofila b pri nijednom tretmanu (*Tablica 5.23.*).

Prema F testu, tretman je imao vrlo značajan utjecaj na sadržaj klorofila b kod oba kultivara (*Tablica 5.23.*). Tena je imala najveći sadržaj klorofila b pri tretmanu 10°C koji se nije značajno razlikovao od nešto nižih vrijednosti u kontroli. Značajno različitu i najnižu vrijednost Tena je imala pri tretmanu 30°C. Zora u kontroli je imala najveći sadržaj klorofila b a pri tretmanu 30°C najmanji. Kod Zore između kontrole i tretmana

10°C nije bilo značajne razlike u vrijednostima sadržaja klorofila b, dok se sadržaj klorofila b pri tretmanu 30°C značajno razlikovao u odnosu na druge tretmane.

Zora je u kontroli imala najveći sadržaj **klorofila a+b** (2,440 mg g^{-1} sv.t.). Najmanji sadržaj klorofila a+b imale su Tena i Zora s jednakom vrijednošću pri tretmanu 30°C (1,811 mg g^{-1} sv.t.). Kultivar nije imao značajan utjecaj na ukupni sadržaj klorofila a+b pri nijednom tretmanu (*Tablica 5.23.*).
Tretman je imao vrlo značajan utjecaj na ukupni sadržaj klorofila a+b kod oba kultivara (*Tablica 5.23.*). Najniži sadržaj klorofila a+b Tena je imala pri tretmanu 30°C koji se značajno razlikovao od nešto većeg sadržaja u kontroli i najvećeg pri tretmanu pri 10°C. Između kontrole i tretmana pri 10°C nije bilo značajne razlike u ukupnom sadržaju klorofila a+b. Zora je najveći sadržaj klorofila a+b imala u kontroli, a najmanji pri tretmanu 30°C. Između kontrole i tretmana pri 10°C nije bilo značajne razlike, ali je sadržaj klorofila a+b pri tretmanu 30°C bio značajno najniži.

Najveći sadržaj **karotenoida** je imala Zora u kontroli (0,546 mg g^{-1} sv.t.), a najmanji Tena pri tretmanu 30°C (0,363 mg g^{-1} sv.t.). Kultivar nije imao značajan utjecaj na sadržaj karotenoida pri nijednom tretmanu (*Tablica 5.23.*).
Tretman je imao vrlo značajan utjecaj na sadržaj karotenoida kod oba kultivara (*Tablica 5.23.*). Tena je najveći sadržaj karotenoida imala pri tretmanu 10°C koji se nije značajno razlikovao od nešto nižih vrijednosti sadržaja karotenoida u kontroli, dok su se vrijednosti u kontroli i pri 10°C značajno razlikovale od najniže vrijednosti karotenoida pri tretmanu 30°C. Zora je imala najniži sadržaj karotenoida pri tretmanu 30°C, a najviši u kontroli. Navedeni sadržaji karotenoida međusobno se značajno razlikuju. Sadržaj karotenoida pri tretmanu 10°C značajno se razlikuje od sadržaja pri tretmanu 30°C, ali ne i od sadržaja u kontroli.

Omjer **klorofila a/b** najveći je bio kod Tene u kontroli (2,678), a najmanji kod Zore pri tretmanu 30°C (2,247). Prema F testu kultivar nije imao značajan utjecaj pri nijednom tretmanu (*Tablica 5.23.*).
Tretman je imao vrlo značajan utjecaj kod oba kultivara (*Tablica 5.23.*). Oba kultivara su najveći omjer klorofila a/b imali u kontroli, a najmanji pri tretmanu 30°C te su se vrijednostima omjeri pri navedenim tretmanima značajno razlikovali. Omjer klorofila a/b pri tretmanu 10°C nije se značajno razlikovao od ostalih tretmana kod oba kultivara.

Tablica 5.23. Značajnost utjecaja kultivara i tretmana na sadržaj klorofila a, b i a+b, sadržaj karotenoida te omjer klorofila a/b i klorofila a+b/karotenoida u listovima soje (sadržaj klorofila a, b, a+b i karotenoida su izraženi u mg g^{-1} sv.t.; podaci su prosjek četiri ponavljanja; ANOVA, F test; prosjeci kultivara označenih istim slovom ne razlikuju se prema LSD testu (a,b: $P \leq 0,05$); prosjeci tretmana označenih istim slovom ne razlikuju se prema LSD testu (X,Y: $P \leq 0,01$)).

	Kontrola	10°C	30°C	F test - tretman	*P*-tretman	Kontrola	10°C	30°C	F test - tretman	*P*-tretman
	Klorofil a (mg g^{-1} sv.t.)					**Karotenoidi (mg g^{-1} sv.t.)**				
TENA	1,660 / X	1,750 / X	1,288 / Y	16,55	0,0010	0,494 / X	0,522 / X	0,363 / Y	34,16	<0,0001
ZORA	1,771 / X	1,658 / X	1,251 / Y	57,75	<0,0001	0,546 / X	0,484 / X	0,365 / Y	29,80	0,0001
F test - kultivar	1,36	1,83	1,40			3,24	3,88	0,01		
P-kultivar	0,2879	0,2246	0,2814			0,1221	0,0965	0,9324		
	Klorofil b (mg g^{-1} sv.t.)					**Klorofil a/b**				
TENA	0,619 / X	0,663 / X	0,523 / Y	14,77	0,0014	2,678 / X	2,639 / XY	2,465 / Y	8,95	0,0072
ZORA	0,669 / X	0,668 / X	0,560 / Y	8,67	0,0080	2,647 / X	2,485 / XY	2,247 / Y	10,42	0,0045
F test - kultivar	3,48	0,02	1,95			0,50	5,06	5,12		
P-kultivar	0,1113	0,8842	0,2123			0,5072	0,0655	0,0643		
	Klorofil a+b (mg g^{-1} sv.t.)					**Klorofil a+b/Karotenoidi**				
TENA	2,278 / X	2,414 / X	1,811 / Y	16,59	0,0010	4,611 / Y	4,622 b / Y	4,987 / X	10,91	0,0039
ZORA	2,440 / X	2,326 / X	1,811 / Y	41,39	<0,0001	4,493 /	4,803 a /	4,977 /	2,46	0,1406
F test - kultivar	1,75	0,83	0,00			0,23	10,33	0,00		
P-kultivar	0,2339	0,3963	0,9934			0,6492	0,0183	0,9506		

Omjer **klorofila a+b/karotenoidi** najveći je bio kod Tene pri 30°C (4,987), a najmanji kod Zore u kontroli (4,493). Kultivar je imao značajan utjecaj na omjer klorofil a+b/karotenoidi pri tretmanu 10°C, dok na kontroli i pri tretmanu 30°C nije imao značajan utjecaj (*Tablica 5.23.*). Pri tretmanu 10°C Zora je imala značajno veći omjer klorofila a+b/karotenoidi od Tene, prema LSD testu pri $P \leq 0,05$.

Tretman je imao vrlo značajan utjecaj na omjer klorofil a+b/karotenoidi kod Tene, a kod Zore nije imao značajan utjecaj (*Tablica 5.23.*). Tena je pri tretmanu 30°C imala najveći omjer klorofil a+b/karotenoidi i značajno različit od ostalih tretmana. U kontroli Tena je imala najmanji navedeni omjer. Vrijednosti omjera, kod Tene, u kontroli i pri

tretmanu 10°C nisu se značajno razlikovale. Zora je najveći omjer imala pri tretmanu 30°C, a najmanji u kontroli.

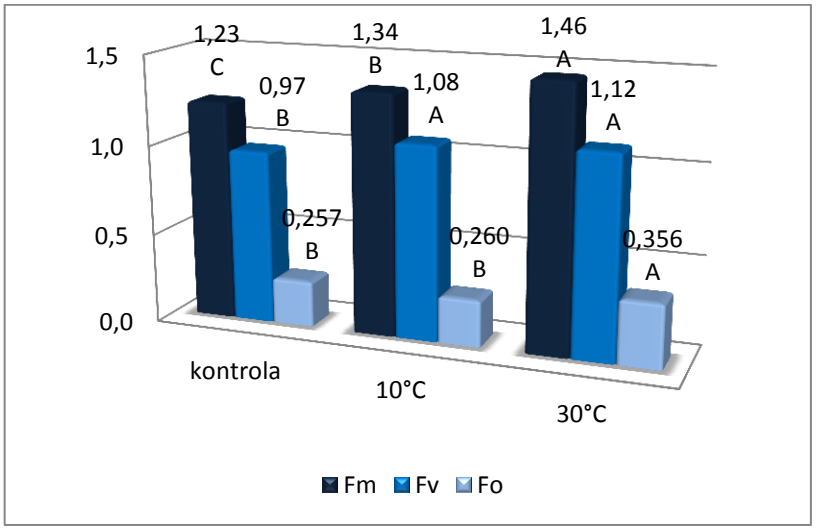
5.2.2.2. Fotosintetska učinkovitost

Analizirajući fotokemijske pokazatelje fotosustava II (PS II), u prosjeku za sve tretmane, kultivar nije značajno utjecao na minimalnu razinu fluorescencije (F_0), maksimalnu razinu fluorescencije (Fm), varijabilnu fluorescenciju (Fv), maksimalni kvantni prinos PS II (Fv/Fm) te omjer varijabilne i početne fluorescencije (Fv/F_0; *Tablica 5.22.*). Kultivar je u prosjeku za sve tretmane imao značajan utjecaj na poluvrijeme porasta (t½) od F_0 do Fm. U prosjeku za sve tretmane Zora je imala veće vrijednosti F_0 (0,3), Fm (1,36) te Fv (1,07) od Tene (slijedom: F_0 - 0,29; Fm - 1,33; Fv - 1,04). Maksimalni kvantni prinos PS II (0,786) te omjer varijabilne i početne fluorescencije (3,696) je bio veći kod Tene u odnosu na Zoru (Fv/Fm - 0,782; Fv/F_0 - 3,668). Značajno veće poluvrijeme porasta od F_0 do Fm je imala Tena (73,44) u odnosu na Zoru (68,48).

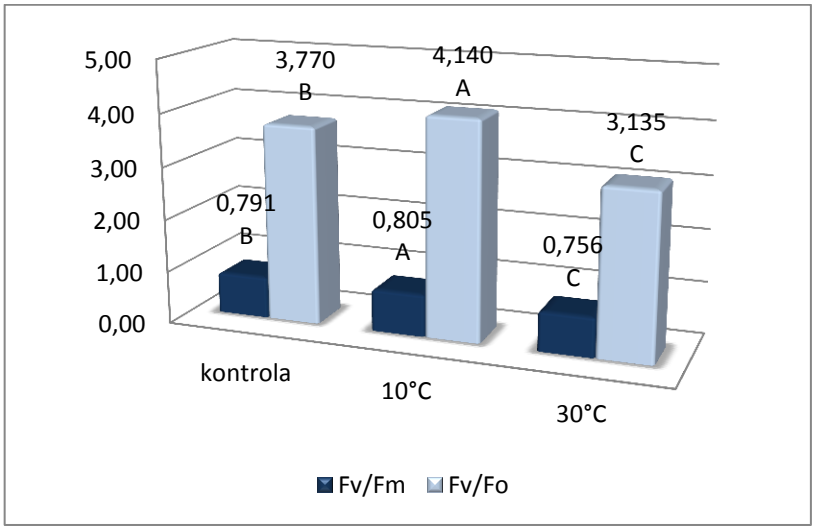
Prema F testu, u prosjeku za sve kultivare, tretman je vrlo značajno utjecao na sve mjerene pokazatelje fotosintetske učinkovitosti PS II (*Tablica 5.22.*). Minimalna razina fluorescencije (F_0), u prosjeku za oba kultivara, bila je najveća na 30°C i značajno različita od međusobno približno jednakih vrijednosti pri tretmanu 10°C i u kontroli (*Slika 5.36.*). Maksimalna razina fluorescencije (Fm), u prosjeku za oba kultivara, bila je najveća pri tretmanu 30°C a najmanja u kontroli. Vrijednosti Fm u kontroli i pri tretmanima 10°C i 30°C se međusobno značajno razlikuju. Varijabilna fluorescencija (Fv) pri tretmanu 30°C je bila najveća, ali se nije značajno razlikovala od nešto nižih vrijednosti pri tretmanu 10°C. Obje su se značajno razlikovale od još nižih vrijednosti u kontroli.

Maksimalni kvantni prinos PS II (Fv/Fm), u prosjeku za oba kultivara soje, bio je najveći i značajno različit u odnosu na ostale tretmane pri tretmanu 10°C (*Slika 5.37.*). Nešto niže vrijednosti Fv/Fm bile su u kontroli, a najniže pri tretmanu 30°C. Vrijednosti u kontroli i pri tretmanu 30°C značajno su se razlikovale. Omjer varijabilne i početne fluorescencije (Fv/F_0) najveći je bio pri tretmanu 10°C te se značajno razlikovao od

nešto nižih vrijednosti u kontroli, a oboje su se značajno razlikovali od najnižih vrijednosti pri tretmanu 30°C.

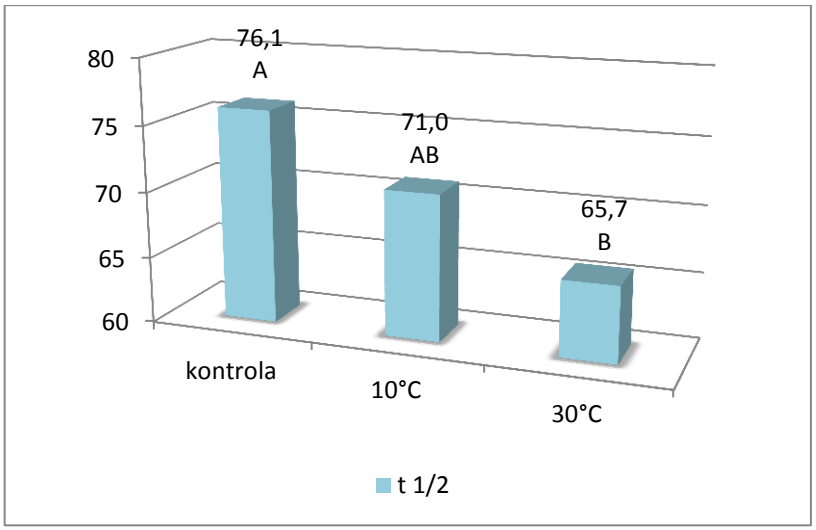


Slika 5.36. Fotokemijski pokazatelji fotosustava II (Fm, Fv, F_0) u intaktnim listovima soje, u prosjeku za dva kultivara soje, po tretmanima. Značajne razlike između tretmana označene su različitim slovima prema LSD testu (A,B,C: $P \leq 0{,}01$).



Slika 5.37. Fotokemijski pokazatelji fotosustava II (Fv/Fm, Fv/F_0) u intaktnim listovima soje, u prosjeku za dva kultivara soje, po tretmanima. Značajne razlike između tretmana označene su različitim slovima prema LSD testu (A,B,C: $P \leq 0{,}01$).

Poluvrijeme porasta (t½) od F_0 do Fm najveće je bilo u kontroli, a najmanje pri tretmanu 30°C te se međusobno značajno razlikovalo (*Slika 5.38.*). t½ pri tretmanu 10°C nije se značajno razlikovao od t½ u kontroli i pri tretmanu 30°C.



Slika 5.38. Fotokemijski pokazatelj fotosustava II (t½), u prosjeku za dva kultivara soje, po tretmanima. Razlika između kultivara soje označene su različitim slovima prema LSD testu (A,B: $P \leq 0{,}01$).

Najveću vrijednost **minimalne razine fluorescencije** (F_0) imala je Zora pri tretmanu 30°C (0,368), a najmanju Tena pri tretmanu 10°C (0,253). Prema F testu kultivar nije značajno utjecao na F_0 pri nijednom tretmanu (*Tablica 5.24.*).

Tretman je vrlo značajno utjecao na F_0 kod oba kultivara soje. Tena i Zora imale su najveću F_0 pri tretmanu 30°C koja se značajno razlikovala od vrijednosti pri ostalim tretmanima. Tena je imala najmanji F_0 pri tretmanu 10°C koja se nije značajno razlikovala od vrijednosti u kontroli. Zora je najmanju vrijednost F_0 imala u kontroli, no ta vrijednost nije se značajno razlikovala od one pri tretmanu 10°C.

Najveću vrijednost **maksimalne razine fluorescencije** (Fm) imala je Zora pri tretmanu 30°C (1,492) a najmanju Zora u kontroli (1,200). Kultivar nije značajno utjecao na Fm pri nijednom tretmanu (*Tablica 5.24.*).

Tretman je imao vrlo značajan utjecaj na Fm kod kultivara Tena i Zora. Oba kultivara imali su najveći Fm pri tretmanu 30°C, a najmanji u kontroli. Kod Tene nije bilo značajne razlike između kontrole i tretmana pri 10°C. Kod Zore Fm je bio značajno različit između tretmana pri 30°C i u kontroli, no vrijednosti pri tretmanu 10°C nisu se značajno razlikovale od kontrole i tretmana pri 30°C.

Najveću **varijabilnu fluorescenciju** (Fv) imala je Zora pri tretmanu 30°C (1,142), a najmanju Zora u kontroli (0,946). Prema F testu kultivar nije imao značajan utjecaj na varijabilnu fluorescenciju pri nijednom tretmanu (*Tablica 5.24.*).

Tretman je imao značajan utjecaj na Fv kod oba kultivara. Fv pri tretmanu 10°C, kod Tene, nije se značajno razlikovala od najveće Fv pri tretmanu 30°C i od najmanje Fv u kontroli, prema LSD testu pri $P \leq 0,05$. Fv pri tretmanu 30°C i u kontroli značajno su se razlikovale. Kod Zore najveća Fv bila je pri tretmanu 30°C, a najmanja u kontroli, te je između njih bilo značajne razlike, prema LSD testu pri $P \leq 0,05$. Fv pri tretmanu 10°C, kod Zore, nije se značajno razlikovala od Fv pri tretmanu 30°C, ali se značajno razlikovala od Fv u kontroli.

Tablica 5.24. Značajnost utjecaja kultivara i tretmana na minimalnu razinu fluorescencije (F_0), maksimalnu razinu fluorescencije (Fm), varijabilnu fluorescenciju (Fv), poluvrijeme porasta ($t_{½}$), maksimalni kvantni prinos PS II (Fv/Fm), omjer varijabilne i početne fluorescencije (Fv/F_0) u intaktnim listovima soje (podaci su prosjek četiri ponavljanja; ANOVA, F test; prosjeci kultivara označenih istim slovom ne razlikuju se prema LSD testu (a,b: $P \leq 0,05$); prosjeci tretmana označenih istim slovom ne razlikuju se prema LSD testu (X,Y,Z: $P \leq 0,01$)).

	Kontrola	10°C	30°C	F test - tretman	*P*-tretman	Kontrola	10°C	30°C	F test - tretman	*P*-tretman
		F_0					**$t_{½}$**			
TENA	0,261 / Y	0,253 / Y	0,344 / X	73,02	<0,0001	77,542 / X	76,825 a / X	65,967 / Y	9,76	0,0056
ZORA	0,254 / Y	0,268 / Y	0,368 / X	30,92	<0,0001	74,750 / x	65,199 b / y	65,491 / y	6,50	0,0179
F test - kultivar	1,67	3,46	1,53			2,07	9,94	0,02		
P-kultivar	0,2444	0,1124	0,2628			0,2000	0,0197	0,8804		
		Fm					**Fv/Fm**			
TENA	1,253 / Y	1,292 / Y	1,430 / X	15,30	0,0013	0,793 / Y	0,804 / X	0,759 / Z	101,29	<0,0001
ZORA	1,200 / Y	1,386 / XY	1,492 / X	10,55	0,0044	0,788 / Y	0,806 / X	0,752 / Z	211,25	<0,0001
F test - kultivar	2,95	4,06	0,79			1,73	2,07	3,77		
P-kultivar	0,1366	0,0904	0,4082			0,2361	0,2000	0,1001		
		Fv					**Fv/F_0**			
TENA	0,992 / y	1,040 / xy	1,089 / x	6,51	0,0178	3,807 / Y	4,112 / X	3,169 / Z	100,43	<0,0001
ZORA	0,946 / y	1,118 / x	1,142 / x	7,44	0,0124	3,732 / Y	4,169 / X	3,102 / Z	477,56	<0,0001
F test - kultivar	2,74	4,30	0,82			1,01	2,86	2,14		
P-kultivar	0,1490	0,0835	0,4003			0,3527	0,1416	0,1941		

Najveće **poluvrijeme porasta** (t½) imala je Tena u kontroli (77,542), a najmanje Zora pri tretmanu 10°C (65,199). Kultivar nije imao značajan utjecaj na t½ u kontroli i pri tretmanu 30°C, a imao je značajan utjecaj pri tretmanu 10°C (*Tablica 5.24.*). U kontroli i pri tretmanu 30°C Tena je imala veće t½ od Zore. Pri tretmanu 10°C Tena je imala značajno veće t½ od Zore prema LSD testu pri $P \leq 0,05$.

Tretman je imao vrlo značajan utjecaj na t½ kod Tene, a značajan kod Zore. Tena je imala najveće t½ u kontroli, a najmanje pri tretmanu 30°C. Između kontrole i tretmana pri 10°C nije bilo značajne razlike, no oboje su se značajno razlikovali od tretmana pri 30°C. Zora je imala najveće t½ u kontroli, a najmanje u pri tretmanu 10°C. Poluvrijeme porasta u kontroli značajno se razlikovalo od tretmana 10°C i 30°C, no tretmani pri 10°C i 30°C se nisu međusobno razlikovali pri LSD testu pri $P \leq 0,05$.

Najveći **maksimalni kvantni prinos** (Fv/Fm) imala je Zora pri tretmanu 10°C (0,806), a najmanji Zora pri tretmanu 30°C (0,752). Kultivar, prema F testu, nije imao značajan utjecaj na Fv/Fm pri svim primijenjenim tretmanima (*Tablica 5.24.*).

Tretman je imao vrlo značajan utjecaj na Fv/Fm kod oba kultivara soje. Oba kultivara su najveći Fv/Fm imali pri tretmanu 10°C koji se značajno razlikovao od nešto nižih vrijednosti u kontroli, a obje vrijednosti su se značajno razlikovale od najnižeg Fv/Fm pri tretmanu 30°C.

Najviši **omjer varijabilne i početne fluorescencije** (Fv/F_0) imala je Zora pri tretmanu 10°C (4,169), a najniži također Zora pri tretmanu 30°C (3,102). Kultivar nije imao značajan utjecaj na Fv/F_0 pri nijednom tretmanu (*Tablica 5.24.*).

Tretman je imao vrlo značajan utjecaj na Fv/F_0 kod oba kultivara. Tena i Zora su najveći Fv/F_0 imale pri tretmanu 10°C koji se značajno razlikovao od nešto nižih vrijednosti u kontroli, a obje vrijednosti su se značajno razlikovale od najnižeg Fv/F_0 pri tretmanu 30°C.

5.2.3. Neenzimski pokazatelji stresa kod soje u fenološkoj fazi pune cvatnje

Analizom dobivenih rezultata ocijenjen je utjecaj kultivara, tretmana i njihove interakcije na fiziološka svojstva soje u fenofazi pune cvatnje (R_2).

Tablica 5.25. Značajnost utjecaja kultivara i tretmana na pokazatelje fizioloških svojstava (H_2O_2 = sadržaj vodikovog peroksida; LP = intenzitet lipidne peroksidacije; Prolin = sadržaj slobodnog prolina; Fenoli = sadržaj ukupnih fenola) u tkivu lista soje (prikazani podaci su izračunate razine značajnosti (*P*) prema F testu).

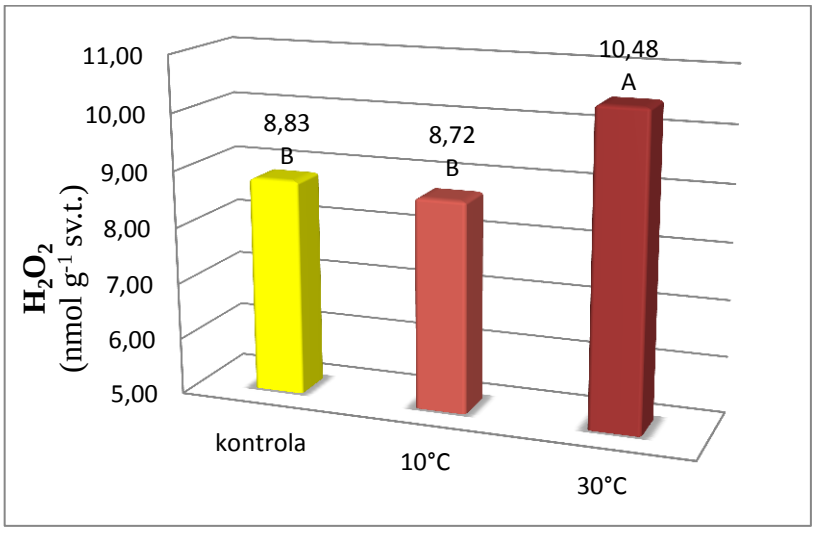
		H_2O_2	LP	Prolin	Fenoli
KULTIVAR (A)	F test	8,27	3,12	0,00	0,02
	P	0,0101	0,0944	0,9936	0,8801
TRETMAN (B)	F test	8,14	29,85	64,37	3,95
	P	0,0030	<0,0001	<0,0001	0,0378
INTERAKCIJA (AxB)	F test	1,38	2,34	0,47	0,87
	P	0,2758	0,1253	0,6331	0,4342

Prema vrijednostima F testa, kultivar je imao vrlo značajan utjecaj na sadržaj vodikovog peroksida (H_2O_2), dok na intenzitet lipidne peroksidacije (LP), sadržaj slobodnog prolina (Prolin) i sadržaj ukupnih fenola (Fenoli) nije imao značajan utjecaj (*Tablica 5.25.*). Tretman je imao vrlo značajan utjecaj na sadržaj H_2O_2, intenzitet LP i sadržaj slobodnog prolina, te značajan utjecaj na sadržaj ukupnih fenola. Interakcija kultivar x tretman nije bila značajna za navedene neenzimske pokazatelje stresa.

5.2.3.1. Sadržaj vodikovog peroksida u tkivu lista soje

Analizirajući sadržaj vodikovog peroksida (H_2O_2) u prosjeku za sve tretmane kod pojedinog kultivara, prema F testu, kultivar je značajno utjecao na sadržaj H_2O_2 u tkivu lista soje (*Tablica 5.25.*). Prema LSD testu pri $P \leq 0,05$ Tena je u prosjeku za sve tretmane imala značajno veći sadržaj vodikovog peroksida (9,92 nmol g^{-1} sv.t.) od Zore (8,77 nmol g^{-1} sv.t.).

Analizirajući sadržaj vodikovog peroksida u prosjeku za sve kultivare kod pojedinih tretmana utvrđeno je kako je tretman imao vrlo značajan utjecaj na sadržaj H_2O_2 u tkivu lista soje (*Tablica 5.25.*). U prosjeku za sve kultivare značajno najveći sadržaj H_2O_2 izmjeren je pri tretmanu 30°C (*Slika 5.39.*). Nešto manji sadržaj H_2O_2 izmjeren je u kontroli i pri tretmanu 10°C, no između njih nije bilo značajne razlike.



Slika 5.39. Prosječan sadržaj vodikovog peroksida (H_2O_2; nmol g^{-1} sv.t.), u prosjeku za dva kultivara soje, po tretmanima. Značajne razlike između tretmana označene su različitim slovima prema LSD testu (A,B: $P \leq 0{,}01$).

Pri tretmanu 30°C Tena je imala najveći sadržaj vodikovog peroksida (11,122 nmol g^{-1} sv.t.), a najmanji sadržaj H_2O_2 imala je Zora u kontroli (7,884 nmol g^{-1} sv.t.). Utjecaj kultivara nije bio značajan na sadržaj H_2O_2 u tkivu lista soje pri kontrolnim uvjetima i primijenjenim tretmanima (*Tablica 5.26.*).

Tretman nije imao značajan utjecaj na sadržaj H_2O_2 kod Tene, dok je kod Zore imao vrlo značajan utjecaj (*Tablica 5.26.*). Najniži sadržaj H_2O_2 kod Tene izmjeren je pri tretmanu 10°C, a najviši sadržaj izmjeren je pri tretmanu 30°C. Zora je imala najviši sadržaj H_2O_2 pri tretmanu 30°C, a najniži u kontrolnim uvjetima. Sadržaj H_2O_2 kod Zore u kontroli značajno je niži od sadržaja pri tretmanu 30°C, dok se izmjereni sadržaj H_2O_2 pri tretmanu 10°C nije značajno razlikovao od sadržaja u kontroli i pri tretmanu 30°C.

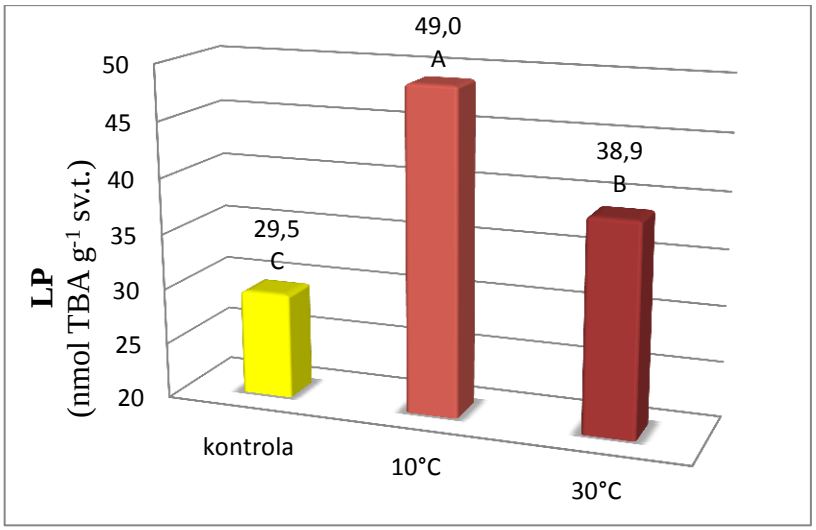
Tablica 5.26. Značajnost utjecaja kultivara i tretmana na sadržaj vodikovog peroksida (H_2O_2; nmol g^{-1} sv.t.), intenzitet lipidne peroksidacije (LP; nmol TBA g^{-1} sv.t.), sadržaj slobodnog prolina (prolin; µmol g^{-1} sv.t.) i sadržaj ukupnih fenola (fenoli; mg GA g^{-1} sv.t.) u tkivu listova soje (podaci su prosjek četiri ponavljanja; ANOVA, F test; prosjeci kultivara označenih istim slovom ne razlikuju se prema LSD testu (a,b: $P \leq 0,05$); prosjeci tretmana označenih istim slovom ne razlikuju se prema LSD testu (X,Y: $P \leq 0,01$)).

	Kontrola	10°C	30°C	F test - tretman	*P*-tretman	Kontrola	10°C	30°C	F test - tretman	*P*-tretman
	H_2O_2 (nmol g^{-1} sv.t.)					**Prolin (µmol g^{-1} sv.t.)**				
TENA	9,770 /	8,862 /	11,122 /	3,59	0,0714	0,446 / Y	0,490 / Y	1,158 / X	28,72	0,0001
ZORA	7,884 / Y	8,586 / XY	9,841 / X	8,36	0,0089	0,513 / Y	0,421 / Y	1,159 / X	37,14	<0,0001
F test - kultivar	4,61	0,31	3,91			2,53	3,07	0,00		
P-kultivar	0,0753	0,5955	0,0954			0,1625	0,1303	0,9965		
	LP (nmol TBA g^{-1} sv.t.)					**Fenoli (mg GA g^{-1} sv.t.)**				
TENA	28,828 / Y	50,390 / X	43,668 a / X	19,75	0,0005	2,694 /	2,894 /	3,084 /	2,99	0,1010
ZORA	30,162 / Y	47,613 / X	34,190 b / Y	12,67	0,0024	2,827 /	2,913 /	2,967 /	0,98	0,4124
F test - kultivar	0,15	0,58	6,98			0,70	0,09	0,56		
P-kultivar	0,7151	0,4742	0,0384			0,4347	0,7700	0,4830		

5.2.3.2. Intenzitet lipidne peroksidacije u tkivu lista soje

Analizirajući intenzitet lipidne peroksidacije (LP) u prosjeku za sve tretmane, kultivar nije značajno utjecao na intenzitet LP u tkivu lista soje (*Tablica 5.25.*). U prosjeku za sve tretmane Tena je imala nešto veći intenzitet LP (40,96 nmol TBA g^{-1} sv.t.) u odnosu na Zoru (37,32 nmol TBA g^{-1} sv.t.), no to nije bilo statistički značajno.

Analizirajući intenzitet LP u prosjeku za sve kultivare tretman je imao vrlo značajan utjecaj na intenzitet LP u tkivu lista soje (*Tablica 5.25.*). U kontroli je izmjeren značajno najmanji intenzitet LP u prosjeku za sve kultivare (*Slika 5.40.*). Nešto veći intenzitet LP imali su prosječno kultivari soje pri tretmanu 30°C, čije vrijednosti su se značajno razlikovale od kontrole i tretmana pri 10°C. Najveći i značajno različit intenzitet LP su imali kultivari soje pri tretmanu 10°C.



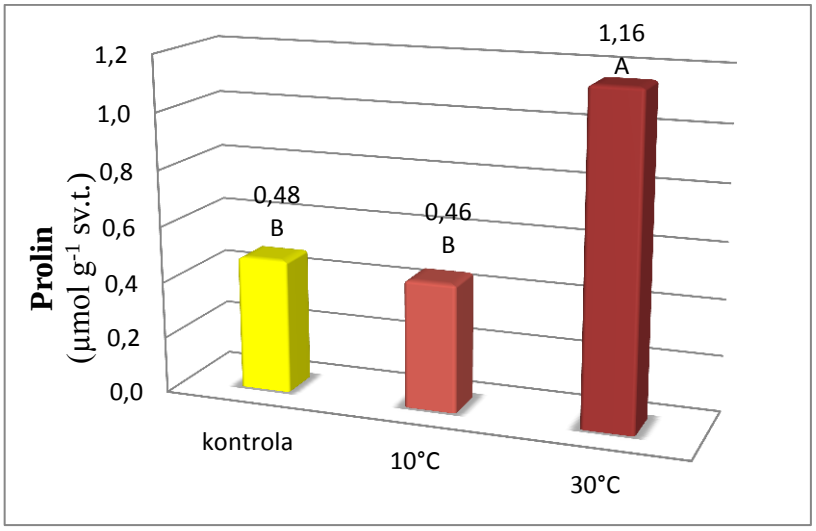
Slika 5.40. Prosječne vrijednosti intenziteta lipidne peroksidacije (LP; nmol TBA g^{-1} sv.t.), u prosjeku za dva kultivara soje, po tretmanima. Značajne razlike između tretmana označene su različitim slovima prema LSD testu (A,B,C: $P \leq 0{,}01$).

Najveći intenzitet lipidne peroksidacije (LP) u tkivu lista soje izmjeren je kod Tene pri tretmanu 10°C (50,390 nmol TBA g^{-1} sv.t.), a najmanji kod Tene u kontroli (28,828 nmol TBA g^{-1} sv.t.). Kultivar nije značajno utjecao na intenzitet LP u kontroli i pri tretmanu 10°C, dok je pri tretmanu 30°C značajno utjecao (*Tablica 5.26.*). Pri tretmanu 30°C Zora je imala značajno manji intenzitet LP od Tene, prema LSD testu pri $P \leq 0{,}05$.

Tretman je imao vrlo značajan utjecaj na intenzitet LP u tkivu lista soje kod oba kultivara (*Tablica 5.26.*). Tena je imala najveći intenzitet LP pri tretmanu 10°C, a najmanji u kontroli. Između tretmana pri 10°C i 30°C nije bilo značajne razlike, no u kontroli je izmjeren značajno manji intenzitet LP u odnosu na navedene tretmane. Najveći intenzitet LP kod Zore je izmjeren pri tretmanu 10°C i on se značajno razlikovao od kontrole i tretmana pri 30°C. Najmanji izmjereni intenzitet LP, kod Zore, je bio u kontroli i on se nije značajno razlikovao od tretmana pri 30°C.

5.2.3.3. Sadržaj slobodnog prolina u tkivu lista soje

Analizirajući rezultate prosječno za sve tretmane, kultivar nije značajno utjecao na sadržaj slobodnog prolina u tkivu lista soje (*Tablica 5.25.*). Tena i Zora su u prosjeku za sve tretmane imala jednake vrijednosti za sadržaj slobodnog prolina (0,698 μmol g^{-1} sv.t.) u tkivu lista soje.



Slika 5.41. Prosječan sadržaj slobodnog prolina (μmol g^{-1} sv.t.), u prosjeku za dva kultivara soje, po tretmanima. Značajne razlike između tretmana označene su različitim slovima prema LSD testu (A,B: $P \leq 0{,}01$).

U prosjeku za sve kultivare tretman je vrlo značajno utjecao na sadržaj slobodnog prolina u tkivu lista soje (*Tablica 5.25.*). Najniži sadržaj prolina je izmjeren, u prosjeku za sve kultivare, pri tretmanu 10°C (*Slika 5.41.*). U kontroli izmjeren je sadržaj slobodnog prolina koji nije bio značajno viši od sadržaja prolina pri tretmanu 10°C, no bio je značajno niži od sadržaja prolina pri tretmanu 30°C. U prosjeku za sve tretmane, sadržaj prolina pri tretmanu 30°C bio je značajno najveći u odnosu na kontrolu i tretman pri 10°C.

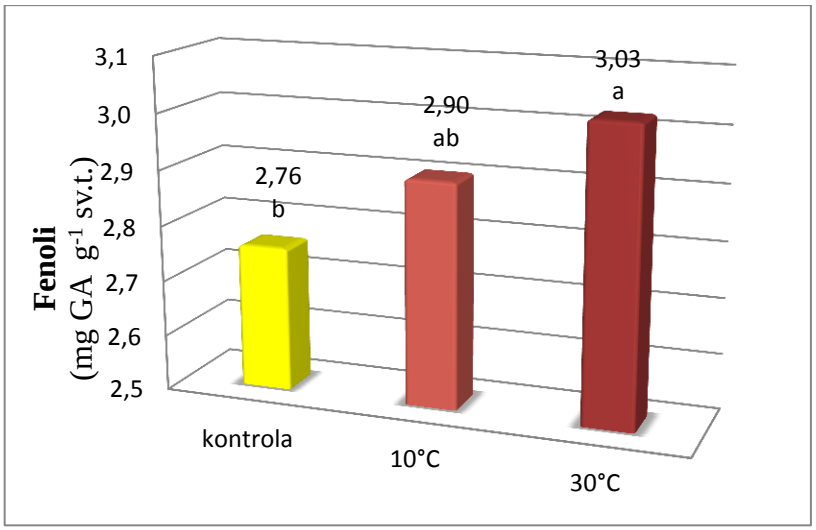
Najveći sadržaj slobodnog prolina je izmjeren kod Zore pri tretmanu 30°C (1,159 μmol g^{-1} sv.t.), a najmanji kod Zore pri tretmanu 10°C (0,421 μmol g^{-1} sv.t.). Utjecaj kultivara na sadržaj slobodnog prolina u tkivu lista soje nije bio značajan pri nijednim primijenjenom tretmanu (*Tablica 5.26.*).

Tretman je imao vrlo značajan utjecaj na sadržaj slobodnog prolina u tkivu lista soje kod oba kultivara (*Tablica 5.26.*). Kod Tene, najveći sadržaj slobodnog prolina je izmjeren pri tretmanu 30°C, dok je značajno manji sadržaj prolina izmjeren pri tretmanu 10°C i još manje vrijednosti u kontroli. Između kontrole i tretmana pri 10°C nije bilo značajne razlike. Najveći sadržaj slobodnog prolina kod Zore izmjeren je pri tretmanu 30°C, a najmanji pri tretmanu 10°C. Između kontrole i tretmana pri 10°C u sadržaju prolina nije bilo značajne razlike. Zora je pri temperaturnom tretmanu 30°C imala značajno veći sadržaj prolina, nego u kontrolnim uvjetima i temperaturnom režimu pri 10°C.

5.2.3.4. Sadržaj ukupnih fenola u tkivu lista soje

Analizirajući rezultate u prosjeku za sve tretmane, kultivar nije značajno utjecao na sadržaj ukupnih fenola u tkivu lista soje (*Tablica 5.25.*). Tena je u prosjeku za sve tretmane imala nešto niže vrijednosti za sadržaj ukupnih fenola (2,89 mg GA g^{-1} sv.t.) u odnosu na Zoru (2,90 mg GA g^{-1} sv.t.), no one nisu bile statistički značajne.
Tretman, u prosjeku za sve kultivare prema pojedinim tretmanima, je značajno utjecao na sadržaj ukupnih fenola u tkivu lista soje (*Tablica 5.25.*). U prosjeku za sve kultivare sadržaj ukupnih fenola u kontroli bio je najniži, a najviši pri tretmanu 30°C (*Slika 5.42.*). Sadržaj ukupnih fenola u tkivu u kontroli se značajno razlikovao od sadržaja fenola pri tretmanu 30°C, no nije se razlikovao od tretmana pri 10°C, prema LSD testu pri $P \leq 0{,}05$. Između tretmana 30°C i 10°C nije bilo statistički značajne razlike u sadržaju fenola.

Najveći sadržaj ukupnih fenola izmjeren je kod Tene pri tretmanu 30°C (3,084 mg GA g^{-1} sv.t.), a najmanji kod Tene u kontroli (2,694 mg GA g^{-1} sv.t.). Kultivar nije imao značajan utjecaj na sadržaj ukupnih fenola u kontroli i pri primijenjenim tretmanima (*Tablica 5.26.*).
Tretman nije imao značajan utjecaj na sadržaj ukupnih fenola u tkivu lista soje kod oba kultivara (*Tablica 5.26.*).



Slika 5.42. Prosječan sadržaj ukupnih fenola (mg GA g^{-1} sv.t.), u prosjeku za dva kultivara soje, po tretmanima. Značajne razlike između tretmana označene su različitim slovima prema LSD testu (a,b: $P \leq 0,05$).

5.2.4. Enzimski pokazatelji stresa kod soje u fenološkoj fazi pune cvatnje

Analizom dobivenih rezultata mjerenja ukupne i specifične aktivnosti antioksidativnih enzima u tkivu lista soje ocijenjen je utjecaj kultivara, tretmana i njihove interakcije na enzimske pokazatelje stresa soje u fenološkoj fazi pune cvatnje (R_2). Prema vrijednostima F testa kultivar je imao vrlo značajan utjecaj na ukupnu (u) aktivnost askorbat-peroksidaze (APX) i značajan na specifičnu (s) aktivnost askorbat-peroksidaze (*Tablica 5.27.*). Kultivar nije imao značajan utjecaj na ukupnu i specifičnu aktivnost ostalih enzima. Tretman je imao vrlo značajan utjecaj na ukupnu i specifičnu aktivnost askorbat-peroksidaze i gvajakol-peroksidaze (GPOX), te značajan utjecaj na ukupnu i specifičnu aktivnost katalaze (CAT) i specifičnu aktivnost glutation-reduktaze (GR). Na ukupnu aktivnost GR, prema F testu, tretman nije imao značajan utjecaj. Interakcija kultivar x tretman je imala vrlo značajan utjecaj na specifičnu aktivnost CAT i GPOX, te značajan utjecaj na ukupnu aktivnost APX i GPOX. Na ukupnu aktivnost CAT i GR, te na specifičnu aktivnost APX i GR interakcija kultivar x tretman nije imala značajan utjecaj.

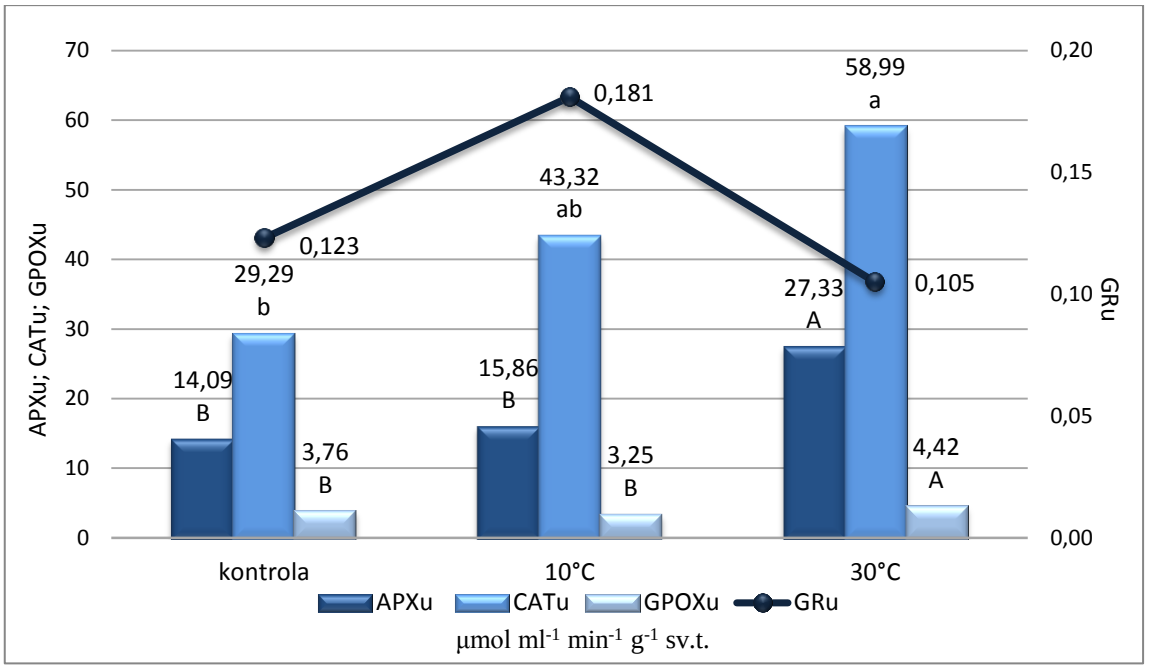
Tablica 5.27. Značajnost utjecaja kultivara i tretmana na ukupnu (u) i specifičnu (s) aktivnost enzima askorbat-peroksidaze (APX), katalaze (CAT), gvajakol-peroksidaze (GPOX) i glutation-reduktaze (GR) u fazi pune cvatnje (prikazani podaci su izračunate razine značajnosti (*P*) prema F testu).

		APXu	CATu	GPOXu	GRu	APXs	CATs	GPOXs	GRs
KULTIVAR (A)	F test	8,37	0,29	4,05	1,46	6,23	0,31	3,52	3,98
	P	0,0097	0,5959	0,0593	0,2422	0,0225	0,5824	0,0769	0,0613
TRETMAN (B)	F test	66,58	3,83	16,81	2,83	84,01	5,08	14,33	4,81
	P	<0,0001	0,0410	<0,0001	0,0856	<0,0001	0,0178	0,0002	0,0212
INTERAKCIJA (AxB)	F test	4,33	2,94	4,95	0,29	2,46	6,18	11,83	0,19
	P	0,0292	0,0785	0,0193	0,7535	0,1138	0,0090	0,0005	0,8320

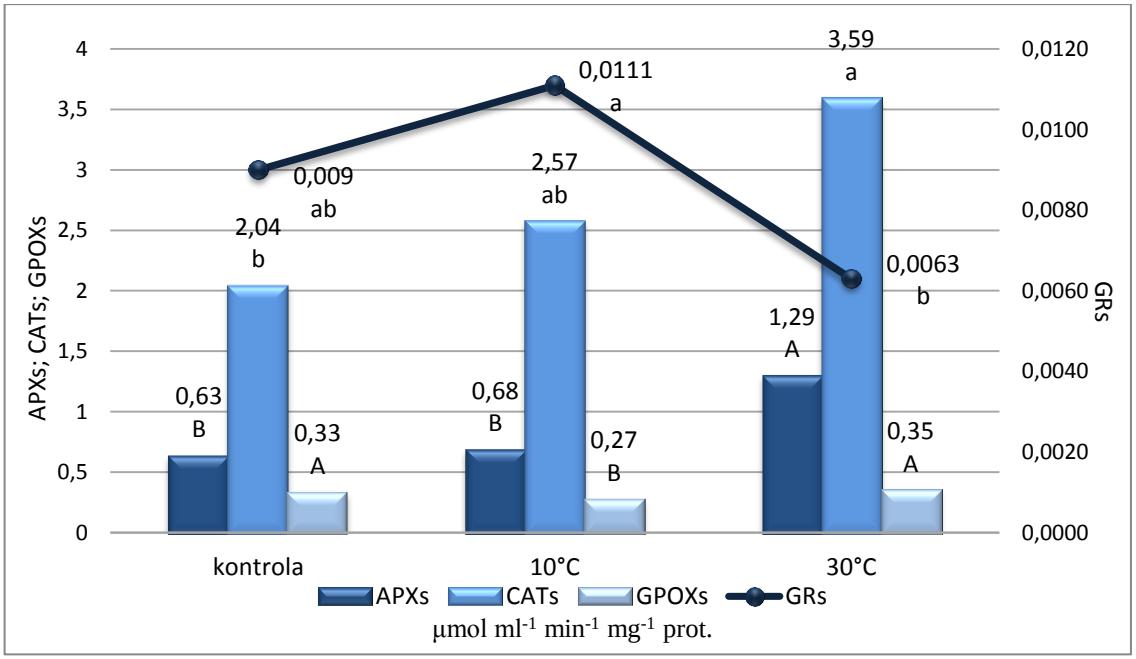
5.2.4.1. Aktivnost askorbat-peroksidaze u tkivu lista soje

Analizirajući ukupnu i specifičnu aktivnost enzima askorbat-peroksidaze (APXu; APXs) u prosjeku za sve tretmane, kultivar je vrlo značajno utjecao na ukupnu i značajno na specifičnu aktivnost APX u tkivu lista soje (*Tablica 5.27.*). Tena je, u prosjeku za sve tretmane, imala vrlo značajno nižu aktivnost APXu (17,62 μmol min^{-1} g^{-1} sv.t.) u odnosu na Zoru (20,56 μmol min^{-1} g^{-1} sv.t.). Tena je u prosjeku za sve tretmane, imala značajno manju specifičnu aktivnost APX (0,81 μmol min^{-1} mg^{-1} prot.) od Zore (0,93 μmol min^{-1} mg^{-1} prot.), prema LSD testu pri $P \leq 0,05$.

Prema F testu, u prosjeku za sve tretman je vrlo značajno utjecao na ukupnu i specifičnu aktivnost enzima askorbat-peroksidaze (APX) u tkivu lista soje (*Tablica 5.27.*). U prosjeku za sve kultivare ukupna aktivnost APX bila je najveća (27,33 μmol min^{-1} g^{-1} sv.t.) i značajno različita pri tretmanu 30°C u odnosu na aktivnost u kontroli i pri tretmanu 10°C (*Slika 5.43.*). Najniža aktivnost APXu (14,09 μmol min^{-1} g^{-1} sv.t.), u prosjeku za sve kultivare, bila je u kontroli, ali nije bila značajno različita od aktivnosti pri tretmanu 10°C. Specifična aktivnost APX pri tretmanu 30°C je bila najveća (1,29 μmol min^{-1} mg^{-1} prot.) i značajno različita u odnosu na aktivnost u kontroli i pri 10°C (*Slika 5.44.*). Najniža aktivnost APXs bila je u kontroli (0,63 μmol min^{-1} mg^{-1} prot.), no nije se značajno razlikovala u odnosu na aktivnost pri tretmanu 10°C.



Slika 5.43. Prosječna ukupna aktivnost enzima askorbat-peroksidaze (APXu), katalaze (CATu), gvajakol-peroksidaze (GPOXu) i glutation-reduktaze (GRu) u listovima dva kultivara soje (µmol min^{-1} g^{-1} sv.t.), po tretmanima. Značajne razlike između tretmana označene su različitim slovima prema LSD testu (A,B: $P \leq 0,01$; a,b: $P \leq 0,05$).



Slika 5.44. Prosječna specifična aktivnost enzima askorbat-peroksidaze (APXs), katalaze (CATs), gvajakol-peroksidaze (GPOXs) i glutation-reduktaze (GRs) u listovima dva kultivara soje (µmol min^{-1} mg^{-1} prot.), po tretmanima. Značajne razlike između tretmana označene su različitim slovima prema LSD testu (A,B: $P \leq 0,01$; a,b: $P \leq 0,05$).

Tablica 5.28. Značajnost utjecaja kultivara i tretmana na ukupnu (u) i specifičnu (s) aktivnost enzima askorbat-peroksidaze (APX), katalaze (CAT), gvajakol-peroksidaze (GPOX) i glutation-reduktaze (GR) u listovima soje (podaci su izraženi u **u**: µmol min^{-1} g^{-1} sv.t.; **s**: µmola min^{-1} mg^{-1} prot.; podaci su prosjek četiri ponavljanja; ANOVA, F test; prosjeci kultivara označenih istim slovom ne razlikuju se prema LSD testu (A,B: $P \leq 0,01$; a,b: $P \leq 0,05$); prosjeci tretmana označenih istim slovom ne razlikuju se prema LSD testu (X,Y: $P \leq 0,01$).

	Kontrola	10°C	30°C	F test - tretman	*P*-tretman	Kontrola	10°C	30°C	F test - tretman	*P*-tretman
	APXu (µmola min^{-1} g^{-1} sv.t.)					**APXs (µmola min^{-1} mg^{-1} prot.)**				
TENA	13,647 / Y	15,471 / Y	23,744 b / X	18,88	0,0006	0,624 / Y	0,646 / Y	1,162 / X	24,12	0,0002
ZORA	14,535 / Y	16,238 / Y	30,921 a / X	51,63	<0,0001	0,642 / Y	0,717 / Y	1,419 / X	72,11	<0,0001
F test - kultivar	0,37	0,48	8,61			0,08	3,00	4,90		
P-kultivar	0,5632	0,5155	0,0261			0,7879	0,1338	0,0688		
	CATu (µmola min^{-1} g^{-1} sv.t.)					**CATs (µmola min^{-1} mg^{-1} prot.)**				
TENA	20,71 / Y	32,21 / Y	71,579 a / X	10,97	0,0039	1,580 / Y	1,818 / Y	4,463 a / X	15,68	0,0012
ZORA	37,87 /	54,42 /	46,405 b /	0,41	0,6730	2,497 /	3,328 /	2,714 b /	0,57	0,5830
F test - kultivar	1,74	1,06	11,23			2,89	2,45	12,75		
P-kultivar	0,2347	0,3431	0,0154			0,1399	0,1688	0,0118		
	GPOXu (µmola min^{-1} g^{-1} sv.t.)					**GPOXs (µmola min^{-1} mg^{-1} prot.)**				
TENA	3,531 /	3,427 a /	3,969 B /	3,40	0,0796	0,317 /	0,295 /	0,299 B /	0,64	0,5504
ZORA	3,990 / XY	3,070 b / Y	4,862 A / X	14,07	0,0017	0,337 / Y	0,247 / Y	0,396 A / X	25,85	0,0002
F test - kultivar	1,07	9,89	23,88			0,70	4,38	36,89		
P-kultivar	0,3414	0,0199	0,0027			0,4349	0,0813	0,0009		
	GRu (µmola min^{-1} g^{-1} sv.t.)					**GRs (µmola min^{-1} mg^{-1} prot.)**				
TENA	0,126 /	0,208 /	0,124 A /	2,01	0,1903	0,0097 /	0,0127 /	0,0077 A /	3,15	0,0920
ZORA	0,121 /	0,153 /	0,086 B /	1,07	0,3845	0,0082 /	0,0094 /	0,0050 B /	1,99	0,1923
F test - kultivar	0,02	0,66	37,93			0,31	1,64	28,97		
P-kultivar	0,9039	0,4489	0,0008			0,5988	0,2477	0,0017		

Najveću ukupnu aktivnost askorbat-peroksidaze (APXu) je imala Zora pri tretmanu 30°C (30,921 µmol min^{-1} g^{-1} sv.t.), a najnižu je imala Tena u kontroli (13,647 µmol min^{-1} g^{-1} sv.t.). Kultivar nije imao značajan utjecaj na ukupnu aktivnost

askorbat-peroksidaze u kontroli i pri tretmanu 10°C, dok je pri tretmanu 30°C imao značajan utjecaj (*Tablica 5.28.*). Zora je imala u kontroli i pri tretmanima 10°C i 30°C veću aktivnost APXu od Tene. Pri tretmanu 30°C Tena je imala značajno manju ukupnu aktivnost APX od Zore, prema LSD testu pri $P \leq 0,05$.

Tretman je imao vrlo značajan utjecaj na ukupnu aktivnost askorbat-peroksidaze kod oba kultivara soje (*Tablica 5.28.*). Tena i Zora najveću aktivnost APXu imale su pri tretmanu 30°C, a najmanju u kontroli. Kod oba kultivar ukupna aktivnost APX pri tretmanu 30°C bila ja značajno veća u odnosu na aktivnost u kontroli i pri tretmanu 10°C. Između vrijednosti ukupne aktivnosti APX u kontroli i pri tretmanu 10°C nije bilo značajne razlike.

Najnižu specifičnu aktivnost askorbat-peroksidaze (APXs) u tkivu lista soje je imala Tena u kontroli (0,624 μmol min^{-1} mg^{-1} prot.), a najvišu Zora pri tretmanu 30°C (1,419 μmol min^{-1} mg^{-1} prot.). Kultivar nije imao značajan utjecaj na APXs u kontroli i pri primijenjenim tretmanima (*Tablica 5.28.*). Specifična aktivnost askorbat-peroksidaze je bila viša kod Zore u odnosu na Tenu pri svim primijenjenim tretmanima.

Tretman je imao vrlo značajan utjecaj na APXs u tkivu lista soje kod oba kultivara (*Tablica 5.28.*). Tena i Zora su imale najveću aktivnost APXs pri tretmanu 30°C, a najnižu u kontroli. Pri tretmanu 30°C oba kultivara su imala značajno veću aktivnost APXs u odnosu na kontrolu i tretman pri 10°C. Između kontrole i tretmana pri 10°C, kod oba kultivara, nije bilo značajne razlike.

5.2.4.2. Aktivnost katalaze u tkivu lista soje

Analizirajući ukupnu i specifičnu aktivnost enzima katalaze (CAT) u prosjeku za sve tretmane kultivar nije imao značajan utjecaj na aktivnost CATu i CATs u tkivu lista soje (*Tablica 5.27.*). U prosjeku za sve tretmane Tena je imala nižu aktivnost CATu (41,50 μmol min^{-1} g^{-1} sv.t.) od Zore (46,23 μmol min^{-1} g^{-1} sv.t.). Tena je u prosjeku za sve tretmane imala nižu specifičnu aktivnost enzima CAT (2,62 μmol min^{-1} mg^{-1} prot.) u odnosu na Zoru (2,85 μmol min^{-1} mg^{-1} prot.).

Tretman je u prosjeku za sve kultivare pri pojedinim tretmanima značajno utjecao na ukupnu i specifičnu aktivnost enzima katalaze (CAT) u tkivu lista soje (*Tablica 5.27.*). Najniža ukupna aktivnost CAT (29,29 μmol min^{-1} g^{-1} sv.t.), u prosjeku za sve kultivare, bila je u kontroli i nije se značajno razlikovala od nešto veće aktivnosti pri tretmanu 10°C, prema LSD testu pri $P \leq 0,05$ (*Slika 5.43.*). Najveća aktivnost CATu bila je pri tretmanu 30°C (58,99 μmol min^{-1} g^{-1} sv.t.) te se značajno razlikovala od aktivnosti u kontroli, ali nije bilo značajne razlike od aktivnosti pri tretmanu 10°C. Specifična aktivnost enzima katalaze, u prosjeku za sve kultivare, bila je najniža u kontroli (2,04 μmol min^{-1} mg^{-1} prot.), a najveća pri tretmanu 30°C (3,59 μmol min^{-1} mg^{-1} prot.; *Slika 5.44.*). U prosjeku za sve kultivare, aktivnost CATs pri tretmanu 30°C bila je značajno veća u odnosu na aktivnost u kontroli, ali ne i u odnosu na aktivnost pri tretmanu 10°C, prema LSD testu pri $P \leq 0,05$. Između aktivnosti CATs u kontroli i pri tretmanu 10°C nije bilo značajne razlike.

Najveću ukupnu aktivnost katalaze (CATu) je imala Tena pri tretmanu 30°C (71,579 μmol min^{-1} g^{-1} sv.t.), a najnižu je imala Tena u kontroli (20,71 μmol min^{-1} g^{-1} sv.t.). Kultivar nije imao značajan utjecaj na CATu u kontroli i pri tretmanu 10°C, ali je imao značajan utjecaj pri tretmanu 30°C (*Tablica 5.28.*). U kontroli i pri tretmanu 10°C Zora je imala veću ukupnu aktivnost CAT od Tene. Pri tretmanu 30°C Tena je imala značajno veću aktivnost CATu od Zore, prema LSD testu pri $P \leq 0,05$.

Tretman je imao vrlo značajan utjecaj na aktivnost CATu kod Tene, dok kod Zore nije imao značajan utjecaj (*Tablica 5.28.*). Tena je imala značajno najveću aktivnost CATu pri tretmanu 30°C, dok se najniža aktivnost u kontroli i nešto veća aktivnost pri tretmanu 10°C nisu međusobno značajno razlikovale. Zora je najveću aktivnost CATu imala pri tretmanu 30°C, a najmanju u kontroli.

Specifična aktivnost katalaze (CATs) najveća je izmjerena kod Tene pri tretmanu 30°C (4,463 μmol min^{-1} mg^{-1} prot.), a najniža kod Tene u kontroli (1,580 μmol min^{-1} mg^{-1} prot.). Kultivar nije imao značajan utjecaj na aktivnost CATs u kontroli i pri tretmanu 10°C, dok je pri tretmanu 30°C imao značajan utjecaj (*Tablica 5.28.*). U kontroli i pri tretmanu 10°C Zora je imala veću aktivnost od Tene. Pri tretmanu 30°C Zora je imala značajno nižu aktivnost od Tene, prema LSD testu pri $P \leq 0,05$.

Prema F testu, tretman je imao vrlo značajan utjecaj na aktivnost CATs kod Tene, no kod Zore nije imao značajnu aktivnost (*Tablica 5.28.*). Tena je imala značajno najveću aktivnost pri tretmanu 30°C. Najniža aktivnost CATs kod Tene je izmjerena u kontroli i nije se značajno razlikovala od nešto veće vrijednosti aktivnosti CATs pri tretmanu 10°C.

5.2.4.3. Aktivnost gvajakol-peroksidaze u tkivu lista soje

Analizirajući ukupnu i specifičnu aktivnost enzima gvajakol-peroksidaze (GPOX) u prosjeku za sve tretmane kultivar nije imao značajan utjecaj na aktivnost enzima u tkivu lista soje (*Tablica 5.27.*). U prosjeku za sve tretmane, Tena je imala nižu ukupnu aktivnost GPOX (3,64 μmol min^{-1} g^{-1} sv.t.) u odnosu na Zoru (3,97 μmol min^{-1} g^{-1} sv.t.). Tena je u prosjeku za sve tretmane imala nižu specifičnu aktivnost GPOX (0,30 μmol min^{-1} mg^{-1} prot.) u odnosu na Zoru (0,33 μmol min^{-1} mg^{-1} prot.).

Analizirajući rezultate svih kultivara pri pojedinim tretmanima, prema F testu, tretman je vrlo značajno utjecao na ukupnu i specifičnu aktivnost gvajakol-peroksidaze (GPOX) u tkivu lista soje (*Tablica 5.27.*). U prosjeku za sve kultivare, najniža aktivnost GPOXu bila je pri tretmanu 10°C (3,25 μmol min^{-1} g^{-1} sv.t.), a najveća aktivnost bila je pri tretmanu 30°C (4,42 μmol min^{-1} g^{-1} sv.t.; *Slika 5.43.*). Ukupna aktivnost GPOX pri tretmanu 10°C nije se vrlo značajno razlikovala od aktivnosti u kontroli, dok se aktivnost enzima pri 30°C značajno razlikovala od aktivnosti ostalih tretmana. Specifična aktivnost enzima GPOX, u prosjeku za sve kultivare, najniža je bila pri tretmanu 10°C (0,27 μmol min^{-1} mg^{-1} prot.), a najveća pri tretmanu 30°C (0,35 μmol min^{-1} mg^{-1} prot.; *Slika 5.44.*). Između aktivnosti u kontroli i pri tretmanu 30°C nije bilo značajnih razlika, dok se aktivnost pri 10°C značajno razlikovala od ostalih tretmana.

Najveća ukupna aktivnost gvajakol-peroksidaze (GPOXu) izmjerena je kod Zore pri tretmanu 30°C (4,862 μmol min^{-1} g^{-1} sv.t.), a najniža kod Zore pri tretmanu 10°C (3,070 μmol min^{-1} g^{-1} sv.t.). Kultivar u kontroli nije značajno utjecao na aktivnost GPOXu, pri tretmanu 10°C je značajno utjecao, a pri tretmanu 30°C je vrlo značajno utjecao (*Tablica 5.28.*). Pri tretmanu 10°C Tena je imala značajno veću aktivnost od

Zore, prema LSD testu pri $P \leq 0,05$. Pri tretmanu 30°C Tena je imala vrlo značajno nižu aktivnost GPOXu od Zore.

Tretman nije imao vrlo značajan utjecaj na ukupnu aktivnost GPOX kod Tene, ali je kod Zore imao vrlo značajan utjecaj (*Tablica 5.28.*). Tena je imala najveću aktivnost GPOXu pri tretmanu 30°C, a pri tretmanu 10°C najnižu. Zora je najveću aktivnost GPOXu imala pri tretmanu 30°C, a najnižu pri tretmanu 10°C. Izmjerene aktivnosti GPOXu, kod Zore, pri tretmanu 30°C i 10°C su se značajno razlikovale. Aktivnost u kontroli se nije značajno razlikovala od onih pri ostalim tretmanima.

Najveća specifična aktivnost gvajakol-peroksidaze (GPOXs) izmjerena je kod Zore pri tretmanu 30°C (0,396 μmol min^{-1} mg^{-1} prot.), a najniža kod Zore pri tretmanu 10°C (0,247 μmol min^{-1} mg^{-1} prot.). Kultivar nije imao značajan utjecaj na aktivnost GPOXs u kontroli i pri tretmanu 10°C, no imao je vrlo značajan utjecaj pri tretmanu 30°C (*Tablica 5.28.*). Pri tretmanu 30°C Tena je u odnosu na Zoru imala značajno manju aktivnost GPOXs.

Tretman nije imao značajan utjecaj na aktivnost GPOXs kod Tene, dok je kod Zore imao vrlo značajan utjecaj (*Tablica 5.28.*). Kod Zore značajno najveća aktivnost izmjerena je pri tretmanu 30°C, dok je najniža aktivnost izmjerena pri tretmanu 10°C. Nije bilo značajne razlike između aktivnosti u kontroli i pri tretmanu 10°C kod Zore.

5.2.4.4. Aktivnost glutation-reduktaze u tkivu lista soje

Analizirajući rezultate svih tretmana za pojedini kultivar, prema F testu, kultivar nije značajno utjecao na ukupnu i specifičnu aktivnost glutation-reduktaze (GR) u tkivu lista soje (*Tablica 5.27.*). U prosjeku za sve tretmane Tena je imala veću ukupnu aktivnost GR (0,153 μmol min^{-1} g^{-1} sv.t.) od Zore (0,120 μmol min^{-1} g^{-1} sv.t.). Zora je imala najmanju specifičnu aktivnost GPOX (0,0075 μmol min^{-1} mg^{-1} prot.), u prosjeku za sve tretmane, u odnosu na Tenu (0,01 μmol min^{-1} mg^{-1} prot.).

U prosjeku za sve kultivare tretman je značajno utjecao na specifičnu aktivnost enzima glutation-reduktaze (GR) u tkivu lista soje, dok na ukupnu aktivnost nije značajno utjecao (*Tablica 5.27.*). U prosjeku za sve kultivare najveća ukupna aktivnost enzima GR bila je pri tretmanu 10°C (0,181 μmol min^{-1} g^{-1} sv.t.), a najmanja pri tretmanu 30°C

(0,105 μmol min^{-1} g^{-1} sv.t.; *Slika 5.43.*). Najveća specifična aktivnost enzima GR, u prosjeku za sve kultivare, bila je pri tretmanu 10°C (0,0111 μmol min^{-1} mg^{-1} prot.) i značajno se razlikovala od tretmana pri 30°C, dok se od kontrole nije značajno razlikovala, prema LSD testu pri $P \leq 0,05$ (*Slika 5.44.*). Najmanja aktivnost GRs bila je pri tretmanu 30°C (0,0063 μmol min^{-1} mg^{-1} prot.) i nije se značajno razlikovala od nešto veće aktivnosti u kontroli.

Najveću ukupnu aktivnost glutation-reduktaze (GRu) je imala Tena pri tretmanu 10°C (0,208 μmol min^{-1} g^{-1} sv.t.), a najnižu je imala Zora pri tretmanu 30°C (0,086 μmol min^{-1} g^{-1} sv.t.). Kultivar nije imao značajan utjecaj na GRs u kontroli i pri tretmanu 10°C, dok je pri tretmanu 30°C imao vrlo značajan utjecaj (*Tablica 5.28.*). Pri tretmanu 30°C Tena je imala značajno veću aktivnost GRu od Zore.
Prema F testu, tretman nije imao značajan utjecaj na aktivnost GRu kod oba kultivara (*Tablica 5.28.*). Oba kultivara su imala najveću ukupnu aktivnost GR pri tretmanu 10°C, a najmanju pri tretmanu 30°C.

Najveću specifičnu aktivnost glutation-reduktaze (GRs) je imala Tena pri tretmanu 10°C (0,0127 μmol min^{-1} mg^{-1} prot.), a najnižu je imala Zora pri tretmanu 30°C (0,0050 μmol min^{-1} mg^{-1} prot.). Kultivar, prema F testu, nije imao značajan utjecaj na GRs u kontroli i pri tretmanu 10°C, dok je pri tretmanu 30°C imao vrlo značajan utjecaj (*Tablica 5.28.*). Značajno veću aktivnost GRs imala je Tena u odnosu na Zoru pri tretmanu 30°C.
Tretman nije imao značajan utjecaj na aktivnost GRs kod oba kultivara (*Tablica 5.28.*). Tena i Zora su imale najveću aktivnost GRs pri tretmanu 10°C, a najmanju pri tretmanu 30°C.

5.3. KORELACIJSKE POVEZANOSTI IZMEĐU ISPITIVANIH POKAZATELJA U FAZI KLIJANJE-NICANJE I FAZI CVATNJE

Linearnom korelacijskom analizom mjerenih pokazatelja reakcije soje na stres, u fazi klijanje-nicanje utvrđen je velik broj značajnih veza. Od svih mjerenih pokazatelja, jedino sadržaj peroksida (H_2O_2) nije korelirao s nijednim pokazateljem, osim pozitivno s klijavosti sjemena (KL%) na razini značajnosti $P \leq 0,05$ (*Tablica 5.29.*; r = 0,358*). Klijavost je na istoj razini značajnosti negativno korelirala s GPOXs (r = -0,304*). Nasuprot tomu, masa klijanca (MK) je vrlo značajno korelirala ($P \leq 0,01$) s nizom pokazatelja, i to pozitivno s masom hipokotila (MH; r = 0,986**), CATs (r = 0,781**) i GPOXs (r = 0,526**), a negativno s LP (r = -0,818**), PRO (r = -0,522**), EF (r = -0,651**), APXu (r = -0,817**), CATu (r = -0,605**), GPOXu (r = -0,763**), GRu (r = -0,572**) i GRs (r = -0,438**). Masa hipokotila (MH) je osim navedene korelacije s MK, vrlo značajno pozitivno korelirala s CATs (r = 0,788**) i GPOXs (r = 0,524**). Vrlo značajne negativne povezanosti utvrđene su između MH i LP (r = -0,849**), PRO (r = -0,569**), UF (r = -0,684**), APXu (r = -0,831**), CATu (r = -0,639**), GPOXu (r = -0,774**), GRu (r = -0,607**) i GRs (r = -0,471**). Sadržaj vodikovog peroksida (H_2O_2) je pokazao samo jednu značajnu korelaciju, s KL%, kako je gore navedeno. Intenzitet lipidne peroksidacije (LP), osim navedenih korelacija s MK i MH, pokazao je vrlo značajnu pozitivnu povezanost s PRO (r = 0,802**) ,UF (r = 0,766**), APXu (r = 0,708**), CATu (r = 0,600**), GPOXu (r = 0,712**), GRu (r = 0,751**) i GRs (r = 0,648**). Sa specifičnim aktivnostima katalaze (CATs) i gvajakol-peroksidaze (GPOXs) je LP bio u vrlo značajnoj negativnoj korelaciji (r = -0,741**, odn. r = -0,488**). Osim navedene vrlo značajne pozitivne korelacije s LP, sadržaj prolina u tkivu hipokotila (PRO) je značajno negativno korelirao s APXs i GPOXs (r = -0,326*, odn. r = -0,383*). Vrlo značajna negativna korelacija je utvrđena između PRO i CATs (r = -0,500*), a vrlo značajne pozitivne korelacije su bile s UF (r = 0,861**), APXu (r = 0,464**), CATu (r = 0,457**), GPOXu (r = 0,479**), GRu (r = 0,936**) i GRs (r = 0,893**).

Tablica 5.29. Značajnost linearnih korelacija između ispitivanih pokazatelja u fenofazi klijanje-nicanje. KL% - klijavost; MK - masa klijanca; MH - masa hipokotila; H_2O_2 - sadržaj vodikovog peroksida; LP - intenzitet lipidne peroksidacije; PRO - sadržaj slobodnog prolina; UF - sadržaj ukupnih fenola; APXu - ukupna aktivnost askorbat- peroksidaze; APXs - specifična aktivnost askorbat-peroksidaze; CATu - ukupna aktivnost katalaze; CATs - specifična aktivnost katalaze; GPOXu - ukupna aktivnost gvajakol-peroksidaze; GPOXs - specifična aktivnost gvajakol-peroksidaze; GRu - ukupna aktivnost glutation-reduktaze; GRs - specifična aktivnost gvajakol-peroksidaze (plavo = nema značajnosti; žuto $P \leq 0,05$; crveno $P \leq 0,01$; + = korelacija pozitivnog smjera, - = korelacija negativnog smjera).

	MK	MH	H_2O_2	LP	PRO	UF	APXu	APXs	CATu	CATs	GPOXu	GPOXs	GRu	GRs
KL%			+									-		
MK		+		-	-	-	-		-	+	-	+	-	-
MH				-	-	-	-		-	+	-	+	-	-
H_2O_2														
LP					+	+	+		+	-	+	-	+	+
PRO						+	+	-	+	-	+	-	+	+
UF							+	-	+	-	+	-	+	+
APXu									+	-	+	-	+	+
APXs										+		+	-	
CATu											+	-	+	+
CATs											-	+	-	-
GPOXu													+	+
GPOXs													-	
GRu														+

Ukupan sadržaj fenola (UF), osim u prethodno navedenim korelacijama s MK, MH, LP i PRO, bio je u vrlo značajnoj negativnoj vezi s APXs (r = -0,407**), CATs (r = -0,521**) i GPOXs (r = -0,465**). Vrlo značajne pozitivne korelacije UF je pokazao s APXu (r = 0,584**), CATu (r = 0,629**), GPOXu (r = 0,659**), GRu (r = 0,893**) i GRs (r = 0,828**). Kod ukupne aktivnosti askorbat-peroksidaze (APXu), osim navedenih korelacija s MK, MH, LP, PRO i UF, utvrđene su vrlo značajne pozitivne korelacije s CATu (r = 0,722**), GPOXu (r = 0,846**), GRu (r = 0,541**) i GRs (r = 0,417**). Također je APXu bila u vrlo značajnoj negativnoj korelaciji s CATs (r = -0,610**) te značajnoj negativnoj korelaciji s GPOXs (r = -0,384*). Specifična aktivnost askorbat-peroksidaze (APXs) je pokazala manji broj značajnih korelacija, te je osim navedenih s PRO i UF, značajno pozitivno korelirala s CATs (r = 0,342*), a značajno negativno s GRu (r = -0,313*). Jedina vrlo značajna pozitivna korelacija bila je s GPOXs (r = 0,473**). Ukupna aktivnost katalaze (CATu) pokazala je osim navedenih korelacija s MK, MH, LP, PRO, UF i APXu, vrlo značajne pozitivne korelacije s GPOXu (r = 0,788**), GRu (r = 0,519**) i GRs (r = 0,427**). Vrlo značajna negativna korelacija je utvrđena s GPOXs (r = -0,406**). Specifična aktivnost katalaze (CATs) je osim navedenih korelacija s MK, MH, LP, PRO, UF, APXu i APXs, pokazala vrlo značajnu pozitivnu korelaciju s GPOXs (r = 0,520**) te vrlo značajne negativne korelacije s GPOXu (r = -0,525**), GRu (r = -0,511**) i GRs (r = -0,395**). Ukupna aktivnost gvajakol-peroksidaze (GPOXu) je osim navedenih korelacija s MK, MH, LP, PRO, UF, APXu, CATu i CATs, vrlo značajno pozitivno korelirala s GRu (r = 0,583**) i GRs (r = 0,502**). Specifična aktivnost gvajakol-peroksidaze (GPOXs) je pored navedenih korelacija s KL%, MK, MH, LP, PRO, UF, APXu, APXs, CATu i CATs, pokazala i značajnu negativnu korelaciju s GRu (r = -0,370*). Ukupna aktivnost glutation-reduktaze (GRu) je, kako je navedeno, bila u značajnim korelacijama s APXs i GPOXs, te vrlo značajnim s MK, MH, LP, PRO, UF, APXu, CATu, GPOXu i GRs (r = 0,977**). Specifična aktivnost glutation-reduktaze (GRs) pokazala je vrlo značajne negativne korelacije s MK, MH i CATs, a pozitivne s LP, PRO, UF, APXu, CATu, GPOXu i GRu.

Linearna korelacijska analiza, koja obuhvaća samo rezultate djelovanja temperaturnog stresa u fazi klijanje-nicanje na mjerene pokazatelje, dala je puno manji broj značajnih korelacija. Vrlo značajne ($P \leq 0,01$) pozitivne korelacije su utvrđene između mase klijanca (MK) i mase hipokotila (MH; r = 0,993**), intenziteta lipidne peroksidacije

(LP) i sadržaja prolina u hipokotilu (PRO; r = 0,963**), odnosno ukupne aktivnosti askorbat-peroksidaze (APXu; r = 0,924**), te ukupnih aktivnosti gvajakol-peroksidaze (GPOXu) i glutation-reduktaze (GRu; r = 0,986**). Značajne pozitivne korelacije ($P \leq 0,05$) su utvrđene između MK i CATs (r = 0,844*), MH i CATs (r = 0,833*), PRO i APXu (r = 0,882*) te specifičnih aktivnosti gvajakol-peroksidaze i glutation-reduktaze (GPOXs i GRs; r = 0,821*). Značajna negativna korelacija je utvrđena između MH i LP (r = -0,880*), te LP i GRs (r = -0,850*).

Biljke dva kultivara soje su, nakon izlaganja temperaturnom stresu, u fazi cvatnje pokazale relativno mali broj značajnih korelacija između mjerenih morfoloških i fizioloških pokazatelja lista (*Tablica 5.30.*). Ukupna masa listova po biljci (ML) je bila u značajnoj ($P \leq 0,05$) pozitivnoj korelaciji s masom troliske (MT; r = 0,885*), značajnoj negativnoj vezi s UF (r = -0,856*) i APXu (r = -0,831*), te očekivano vrlo značajnoj ($P \leq 0,01$) pozitivnoj vezi s brojem troliski po biljci (r = 0,954**). Broj troliski po biljci (BT) je također pokazao i vrlo značajnu negativnu vezu sa sadržajem fenola u listu (UF; r = -0,938**). Sadržaj prolina u listu (PRO) je bio u vrlo značajnim pozitivnim korelacijama s ukupnom i specifičnom aktivnosti askorbat-peroksidaze (APXu, r = 0,928**; APXs, r = 0,958**). Ukupan sadržaj fenola je osim navedenih korelacija s ML i BT, pokazao značajne pozitivne korelacije s CATu (r = 0,911*) i CATs (r = 0,844*). Ukupna aktivnost askorbat-peroksidaze (APXu) je pored navedenih korelacija s ML i PRO, pokazala značajnu pozitivnu korelaciju s GPOXu (r = 0,818*) te vrlo značajnu pozitivnu s APXs (r = 0,993**). Specifična aktivnost askorbat-peroksidaze (APXs) je imala samo dvije, već navedene korelacije s PRO i APXu. Ukupna aktivnost katalaze (CATu) je također pokazala samo dvije korelacije, značajnu pozitivnu s UF i vrlo značajnu pozitivnu s CATs (r = 0,987**). Specifična aktivnost katalaze (CATs) je, kako je već navedeno, pozitivno korelirala s UF i CATu. Osim značajne pozitivne veze s APXu, ukupna aktivnost GPOXu je vrlo značajno pozitivno korelirala s GPOXs (r = 0,932**), što je bila jedina korelacija koja je utvrđena za GPOXs. Ukupna aktivnost glutation-reduktaze (GRu) i specifična aktivnost istog enzima (GRs) su bile u vrlo značajnoj pozitivnoj korelaciji (r = 0,932**), dok s ostalim pokazateljima nisu bile značajno povezane. Sadržaj vodikovog peroksida (H_2O_2) i intenzitet lipidne peroksidacije (LP) u listu soje nisu pokazali niti jednu značajnu korelaciju s ostalim pokazateljima.

Tablica 5.30. Značajnost linearnih korelacija između ispitivanih morfoloških i fizioloških pokazatelja reakcije soje na temperaturni stres u fenofazi pune cvatnje. ML - masa listova po biljci; MT - masa troliske; BT - broj troliski po biljci; H_2O_2 - sadržaj vodikovog peroksida; LP - intenzitet lipidne peroksidacije; PRO - sadržaj slobodnog prolina; UF - sadržaj ukupnih fenola; APXu - ukupna aktivnost askorbat-peroksidaze; APXs - specifična aktivnost askorbat-peroksidaze; CATu - ukupna aktivnost katalaze; CATs - specifična aktivnost katalaze; GPOXu - ukupna aktivnost gvajakol-peroksidaze; GPOXs - specifična aktivnost gvajakol-peroksidaze; GRu - ukupna aktivnost glutation-reduktaze; GRs - specifična aktivnost gvajakol-peroksidaze (plavo = nema značajnosti; žuto $P \leq 0,05$; crveno $P \leq 0,01$; + = korelacija pozitivnog smjera, - = korelacija negativnog smjera).

	MT	BT	H_2O_2	LP	PRO	UF	APXu	APXs	CATu	CATs	GPOX	GPOX	GRu	GRs
ML	+	+				-	-							
MT														
BT						-								
H_2O_2														
LP														
PRO							+	+						
UF									+	+				
APXu								+			+			
APXs														
CATu										+				
CATs														
GPOX												+		
GPOX														
GRu														+

Između mjerenih fotosintetskih pokazatelja u listu soje u cvatnji utvrđen je velik broj značajnih korelacija (*Tablica 5.31.*). Vrlo značajne pozitivne korelacije su utvrđene između: Fm/Fv i Fv/F_0 (r = 0,995**), Fm i Fv (r = 0,957**), Fm i KL/CAR (r = 0,974**), Kl a i Kl b (r = 0,939**), Kl a i KL (r = 0,997**), Kl a i CAR (r = 0,993**), Kl b i KL (r = 0,962**), Kl b i CAR (r = 0,936**), te KL i CAR (r = 0,991**).

Vrlo značajne negativne korelacije su dobivene između: Fm i Kl a/b (r = -0,931**), F_0 i Kl a (r = -0,989**), F_0 i KL (r = -0,979**), F_0 i CAR (r = -0,970**), Kl a i KL/CAR (r = -0,927**), CAR i KL/CAR (r = -0,956**).

Značajne pozitivne korelacije su utvrđene između: Fm/Fv i Kl a (r = 0,916*), Fm/Fv i Kl b (r = 0,899*), Fm/Fv i KL (r = 0,922*), Fm/Fv i CAR (r = 0,868*), t½ i Kl a/b (r = 0,853*), Fm i F_0 (r = 0,876*), F_0 i KL/CAR (r = 0,902*), Fv i KL/CAR (r = 0,894*), Fv/F_0 i Kl a (r = 0,890*), Fv/F_0 i Kl b (r = 0,904*), Fv/F_0 i KL (r = 0,902*), Fv/F_0 i CAR (r = 0,840*), Kl a i Kl a/b (r = 0,848*), CAR i Kl a/b (r = 0,834*).

Značajne negativne korelacije su utvrđene između: t½ i Fm (r = -0,870*), t½ i Fv (r = -0,845*), t½ i KL/CAR (r = -0,868*), Fm i Kl a (r = -0,878*), Fm i KL (r = -0,848*), Fm i CAR (r = -0,902*), F_0 i Fv/F_0 (r = -0,904*), F_0 i Kl b (r = -0,897*), F_0 i Kl a/b (r = -0,891*), Fv i Kl a/b (r = -0,861*), KL i KL/CAR (r = -0, 911*), te Kl a/b i KL/CAR (r = -0,911*).

Tablica 5.31. Značajnost linearnih korelacija između ispitivanih fotosintetskih pokazatelja u listu soje nakon izlaganja temperaturnom stresu u fenofazi pune cvatnje. Fm/Fv - maksimalni kvantni prinos PS II; t½ - poluvrijeme porasta fluorescencije; Fm - maksimalna razina fluorescencije; F_0 - minimalni intenzitet fluorescencije; Fv - varijabilna fluorescencija; Fv/F_0 - omjer varijabilne i početne fluorescencije; Kl a - koncentracija klorofila a; Kl b - koncentracija klorofila b; KL - ukupna koncentracija klorofila; CAR - koncentracija karotenoida; Kl a/b - omjer klorofila a i b; KL/CAR - omjer klorofila i karotenoida (plavo = nema značajnosti; žuto $P \leq 0,05$; crveno $P \leq 0,01$; + = korelacija pozitivnog smjera, - = korelacija negativnog smjera).

	t½	Fm	F_0	Fv	Fv/F_0	Kl a	Kl b	KL	CAR	Kl a/b	KL/CAR
F_m/F_v			-		+	+	+	+	+		
t½		-		-						+	-
Fm			+	+		-		-	-	-	+
F_0					-	-	-	-	-	-	+
Fv										-	+
Fv/F_0						+	+	+	+		
Kl a							+	+	+	+	-
Kl b								+	+		
KL									+		-
CAR										+	-
Kl a/b											-

6. RASPRAVA

6.1. Utjecaj razine sušnog, solnog i temperaturnog stresa na klijavost i razvoj klijanaca soje te utjecaj visokih i niskih temperatura na biljke u fazi cvatnje

U ovom doktorskom radu su istraživanja provedena sa svrhom pojašnjenja odgovora soje na tri glavna tipa abiotskog stresa (sušni, solni i temperaturni stres), a na temelju analize morfoloških i fizioloških pokazatelja u dvije razvojne faze soje. Kao prvi cilj istraživanja je zadano utvrditi utjecaj razine sušnog, solnog i temperaturnog stresa na klijavost i razvoj klijanaca šest kultivara soje te utjecaj visokih i niskih temperatura na biljke dva kultivara soje u fazi cvatnje.

Kobraei i sur. (2011.) smatraju da su za jačinu utjecaja sušnog stresa na rast i konačni urod zrna soje bitni razvojni stadij i trajanje stresa. Prema **Burton (1997.)**, u većini zemalja gdje se soja proizvodi i postoje aktivni selekcijski programi, cilj istraživanja je stvaranje kultivara tolerantnih na sušu. U praksi, toleranciju na sušu je teško definirati određenim sortnim svojstvima jer stupanj otpornosti uvijek ovisi o jačini stresa. Iz tog razloga, smatra autor, vrlo malo kultivara se definira kao tolerantno na sušu. **Phang i sur. (2011.)** smatraju da je unatoč velikom broju istraživanja u zadnjih desetak godina, razumijevanje odgovora soje na osmotski stres još uvijek preliminarno.

U prvoj fazi ovog istraživanja je utjecaj osmotskog (sušnog), solnog i temperaturnog stresa analiziran u fazi klijanje-nicanje kod šest kultivara soje. Primijenjeni stresni tretmani su u cjelini imali značajan utjecaj na klijavost soje (*Tablica 5.1.*), pri čemu se postotci klijavosti u tretmanima solnog stresa i više razine sušnog stresa nisu značajno razlikovali od kontrole. U istraživanju **Kosturkove i sur. (2008.)** uočena je različita reakcija kultivara soje na sušni stres ovisno o provinciji, uz općenito negativan učinak rastućih koncentracija PEG na klijavost i morfološka svojstva klijanaca. Oba temperaturna tretmana u našem istraživanju su u načelu smanjila klijavost (*Slika 5.2.*), pri čemu su statistički značajno nižu klijavost u odnosu na kontrolu pokazali kultivari Korana i Tena. Najveće smanjenje klijavosti pri tretmanu 10°C u odnosu na kontrolu je utvrđen kod kultivara Vita (54,5% odnosno 74% od klijavosti u kontroli) te je taj stresni tretman ujedno rezultirao i najmanjom klijavosti u prosjeku za sve kultivare, odnosno po tom kriteriju (klijavost) najjačim stresom. Prema **Vratarić i Sudarić (2008.)**

temperature značajno utječu na razvoj lisne mase. Temperatura kojoj su biljke bile izložene tri dana u fazi cvatnje je vrlo značajno ($P \leq 0,01$) utjecala na konačan broj troliski po biljci, masu listova po biljci i prosječnu masu troliske (*Tablica 5.19.*). Prema značajno manjim vrijednostima ovih morfoloških pokazatelja na višoj, odnosno nižoj temperaturi od optimalne, može se reći da su primijenjeni temperaturni tretmani izazvali stres. Pri tomu, razlika u masi troliske kod biljaka na 10°C, odnosno 30°C nije bila značajna. Broj troliski po biljci i masa listova po biljci su bile značajno manje na 30°C u usporedbi s kontrolom (*Tablica 5.20.*), što znači da je visoka temperatura dovela do djelomičnog propadanja razvijenih troliski odnosno listova, u prosjeku za oba ispitivana kultivara (*Slika 5.31., 5.32.* i *5.33.*). U prosjeku za sve primijenjene temperaturne tretmane, Tena je imala značajno veće vrijednosti sva tri morfološka pokazatelja, što može ukazivati na veću tolerantnost ovog kultivara na temperaturni stres. Na temelju ispitivanih morfoloških i fizioloških pokazatelja odgovora soje na temperaturni stres, može se zaključiti da je u fazi klijanje-nicanje veći stres niska temperatura (10°C), a u fazi cvatnje visoka temperatura (30°C), upravo kako se to često događa u poljskim uvjetima.

Prema **Piri i sur. (2009.)**, kod suboptimalne temperature se često javlja slaba klijavost sjemena, pri čemu je poznato da u takvim uvjetima nekoliko metoda primiranja sjemena različitih vrsta može poboljšati klijavost. U našem istraživanju, blagi osmotski stres u slučaju 5% otopine PEG, čiji je osmotski potencijal -0,05 MPa, mogao je imati tzv. *„priming"* efekt. Naime, u prosjeku za sve kultivare, najveća klijavost (93,4%) je postignuta u varijanti pokusa gdje je papir namočen 5%-tnim PEG (*Slika 5.2.*), što je prosječno 9%-tno povećanje klijavosti sjemena u odnosu na kontrolu (85,7%) uz najizraženiji učinak kod Tene. Po kultivarima, tretman s 5% PEG je povećao klijavost Lucije za 3,3%, Korane za 9,3%, Vite za 11,5%, Ike za 12,4%, Tene za 15,5% i Zore za 3,8% u odnosu na kontrolu. Prema istraživanju **Sadeghi i sur. (2011.)**, različiti osmotski potencijali otopina PEG i duljina trajanja tretmana mogu značajno utjecati na postotak klijavosti i vigor sjemena soje, te autori navode da je PEG otopina s osmotskim potencijalom od -1,2 MPa povećala % klijanja, indeks klijanja i vigor sjemena, uz značajno smanjenje vremena potrebnog za 50%-tnu klijavost. U istraživanju **Ghiyasi i Tajbakhsh (2013.)** PEG otopina s osmotskim potencijalom od -1,2 MPa je primijenjena na sjemenu soje kao jedno od sredstava za osmotski predtretman sjemena (eng. *„osmopriming"*) i kao činitelj sušnog stresa. Općenito, „osmoprimiranje" je povećalo

vigor sjemena u stresnim uvjetima naklijavanja, a kao najbolji predtretman sjemena se pokazao PEG 6000. **Rouhi i sur. (2011.)** su također izvijestili o pozitivnom utjecaju različitih otopina PEG 6000 na klijavost i vigor klijanaca soje, a **Arif i sur. (2010.)** i na kasniji rast i razvoj soje, nakon predtretmana sjemena s PEG 8000.

Primijenjeni stresni tretmani su vrlo značajno smanjili i masu klijanca soje u odnosu na kontrolu (*Slika 5.4.*). Nešto manja masa nego u kontroli utvrđena je u tretmanu 30°C, a najmanju masu su imali klijanci izloženi otopini PEG 10% (s prosječno 1,106 g na 0,52 g ili na 47% od kontrole), što je dokaz izrazitog sušnog stresa i njegovog negativnog utjecaja na rast i razvoj soje u fenofazama klijanje i nicanje. Drugim riječima, temperatura od 30°C, ukoliko u supstratu ima dovoljno vode za imbibiciju sjemena soje, neće imati negativan učinak na razvoj klijanaca, a jači solni i naročito sušni stres mogu imati presudan značaj za formiranje sklopa i konačnu produktivnost usjeva soje.

Općenito, stresni tretmani primijenjeni u našem istraživanju su vrlo značajno utjecali i na masu hipokotila klijanca soje (*Tablica 5.1.*). Kod svih kultivara u odnosu na kontrolu je dobiveno značajno smanjenje mase hipokotila kao rezultat utjecaja stresnih tretmana, osim kod 30°C. Najveću masu hipokotila kultivari su imali u kontroli (0,607 g), a nešto manju masu (0,606 g) pri klijanju na 30°C (*Slika 5.6.*). Uspoređujući tretmane kod pojedinih kultivara, svi su imali najmanju masu hipokotila pri tretmanu 10% PEG, čiji je osmotski potencijal -0,15 MPa (*Tablica 5.4.*). Obzirom da PEG ne djeluje toksično na sjeme, stresni učinak PEG-a se može pripisati osmotskom efektu (**Khajeh-Hosseini i sur., 2003.**; **Okçu i sur., 2005.**). U istraživanjima utjecaja sušnog stresa na biljke gdje se primjenjuje PEG, veća koncentracija PEG-a onemogućuje biljkama usvajanje dovoljne količine vode čime dolazi do nastanka vrlo reaktivnih slobodnih kisikovih radikala.

Istraživanje utjecaja osmotskog stresa na biljku od iznimnog je značaja, stoga je mogućnost simuliranja takvih uvjeta u laboratoriju znanstvenicima vrlo interesantna. U tu svrhu tijekom 80-tih godina započela je intenzivna primjena polietilen glikola (PEG) visokih molekulskih masa (4000 - 20000) (**Stout i sur., 1980.**; **Zahran i Sprent, 1986.**; **Ben-Hayyim, 1987.**; **Iraki i sur., 1989.**). U ovisnosti o dužini lanca i molekulskoj masi sintetizira se PEG 200, 300, 400, 600, 1000, 1500, 2000, 3000, 4000, 6000, 10000

(**Ugela, 1998.**). Za simulaciju osmotskog stresa u biljkama koristi se PEG visoke molekulske mase jer ne ulazi u stanice, a snižava vodni potencijal na način sličan isušenom tlu (**Larher i sur., 1993.**). PEG 6000 je neionska polihidroksilna tvar dobro topljiva u vodi, čiji se osmotski tlak otopine može unaprijed definirati (**Michel i Kaufmann, 1973.**), te time precizirati intenzitet stresa za biljku. U istraživanjima ovakvog tipa koriste se i druga sredstva koja izazivaju osmotski stres u biljkama, poput alkohola manitola**.** Tako su npr. **Machado Neto i sur. (2004.)** istraživali vodni stres induciran manitolom i natrij kloridom na četiri kultivara soje. Vodni deficit izazvan manitolom, utjecao je na nicanje i razvoj klijanaca, naročito pri višim koncentracijama, gdje niti jedan kultivar nije proizveo normalne klijance. Osmotski stres je također jedna komponenta solnog stresa, pored efekta toksičnosti pojedinih iona u sastavu soli, čiji se višak može pojaviti u bilo kojem uzgojnom mediju (tlo, supstrat, hranjiva otopina). Hranjiva otopina ili otopina tla ima određeni osmotski potencijal, koji je direktno ovisan o ukupnoj koncentraciji iona u njenom sastavu. **Zheng i sur. (1998.)** su u istraživanju s repicom utvrdili sličan učinak PEG i NaCl pri osmotskim potencijalima preko -0,3 MPa, dok je pri nižim razinama stresa toksičnost NaCl jače djelovala na usporavanje klijanja sjemena nego PEG. **Amirjani (2010.)** je istraživao utjecaj otopine NaCl koncentracije 50, 100 i 200 mM, na dužinu i masu klijanaca soje te enzimski i neenzimski odgovor u listovima. Utvrdio je kako veća koncentracija soli ima jači negativni utjecaj na masu i dužinu klijanaca. **Janmohammadi i sur. (2008.)** su ispitivali utjecaj PEG i NaCl na klijanje kukuruza te su utvrdili jači stresni učinak u tretmanima s PEG-om, nego u tretmanu sjemena s NaCl. Slično su kod sirka zaključili **Patané i sur. (2013.)**. Razlika između efekta otopina NaCl i PEG primijenjenih u našem istraživanju, pri čemu je jači osmotski stres postignut primjenom PEG, može se objasniti time da sjeme u otopini PEG s vremenom sve teže upija vodu jer se osmotski tlak otopine povećava. Navedeno je u skladu s mišljenjem **Okçu i sur., (2005.)**, koji smatraju da je kod izotoničnih otopina PEG i NaCl brže usvajanje vode od strane sjemena soje u otopini NaCl, te s rezultatima sličnih istraživanja koje je proveo **Hosseini (2000.)**. Varijante solnog stresa u našem istraživanju nisu imale utjecaja na klijavost, ali je njihov štetni učinak u usporedbi s kontrolom bio vrlo značajan ($P \leq 0,01$) kad je u pitanju masa klijanaca i hipokotila (*Slike 5.2., 5.4.* i *5.6.*). S obzirom da obje varijante solnog stresa nisu imale tako izraziti utjecaj na masu klijanca i hipokotila u usporedbi s varijantama sušnog stresa, unatoč većim osmotskim potencijalima (50 mM NaCl = -0,24 MPa; 100 mM NaCl = -0,49 MPa), može se

pretpostaviti da je ulazak Na^+ i Cl^- iz otopine u stanice sjemena soje povećao osmotski potencijal protoplazme. Time je porasla moć usvajanja vode sjemena, a primijenjene koncentracije NaCl nisu imale izraziti ionski učinak solnog stresa. U slučaju primjene otopine PEG molekule PEG-a ne ulaze u sjeme čime jače dolazi do izražaja osmotski efekt, unatoč manjem početnom osmotskom potencijalu otopine. Slične rezultate i tumačenje su dali **Alam i sur. (2002.)** u istraživanju utjecaja osmotskog potencijala PEG i NaCl na klijanje i porast klijanaca riže.

6.2. Utjecaj induciranog stresa u fazama klijanje-nicanje i cvatnje na specifične metabolite, pojava oksidacijskog stresa i metabolički pokazatelji kao indikatori stresa

U ovom istraživanju je analizirano nekoliko ključnih metabolita čija koncentracija se često povezuje s odgovorom biljke na različite oblike stresa. Cilj tih analiza je bio ustanoviti kako inducirani stres u soji u fazi klijanje-nicanje i fazi cvatnje utječe na specifične metabolite poput vodikovog peroksida, slobodnog prolina, produkata lipidne peroksidacije i sadržaja fenola. Ti pokazatelji mogu pojasniti dolazi li do pojave oksidacijskog stresa i koji su metabolički pokazatelji najbolji indikatori stresa u biljkama. Prema **Silvente i sur. (2012.)**, prilagodbe metabolizma u reakciji na nepovoljne okolišne uvjete mogu istaći komponente koje imaju važne uloge u metabolizmu i fiziologiji te ukazati na metaboličke putove na koje stres utječe. Nakon sedam dana klijanja na 25°C, na filtar papiru namočenom vodom, kao u našoj kontroli, **Zieliński (2003.)** je u klijancima soje utvrdio da u ukupnom antioksidativnom statusu fenolne komponente sudjeluju sa 67,7%, glutation sa 7,9% te askorbinska kiselina s 4,4%, te smatra da se zbog povišenog sadržaja antioksidansa klijanci soje mogu preporučiti kao komponenta prehrane. Povezano s tim, treba naglasiti da se sadržaj antioksidansa značajno mijenja kao rezultat aktivacije spomenutih metaboličkih putova pri čemu se vodikov peroksid javlja kao jedna od signalnih molekula koje dovode do ekspresije relevantnih gena. H_2O_2 je slabije reaktivan u usporedbi s ostalim ROS, međutim može biti izuzetno štetan jer je relativno stabilan i može difundirati unutar stanice i između stanica, stimulirajući tvorbu drugih ROS (**Feierabend, 2005.)**. U fotosintetskim biljnim tkivima, najveće količine peroksida nastaju u kloroplastima djelovanjem superoksid-dismutaze i u procesu fotorespiracije u peroksisomima

oksidacijom glikolne kiseline (**Smirnoff, 2005.**). Sadržaj vodikovog peroksida je u obje razvojne faze u našem istraživanju bio pod vrlo značajnim utjecajem stresnih tretmana (*Tablice 5.5.* i *5.25.*). U fazi klijanja-nicanja, najveći sadržaj peroksida (u prosjeku za sve kultivare) je bio u tretmanu s 50 mM NaCl (43% više u odnosu na kontrolu; *Slika 5.8.*). Interesantno je da je u tretmanima temperaturnog stresa (i visoka i niska temperatura) i više razine solnog stresa sadržaj peroksida bio značajno niži nego u kontroli, što upućuje na aktivaciju fizioloških mehanizama neutralizacije vodikovog peroksida u takvim stresnim uvjetima, dok niža razina solnog stresa u klijanju očigledno nije pokrenula aktivaciju tih mehanizama. Sadržaj peroksida u hipokotilu u obje varijante sušnog stresa se nije značajno razlikovao u odnosu na kontrolu ($P \leq 0{,}01$), zbog čega se može pretpostaviti da vodikov peroksid u fazi klijanja i nicanja nije dobar indikator sušnog stresa odnosno reakcije soje na tu vrstu abiotskog stresa. **Veljović-Jovanović i sur. (2002.)** smatraju da su količine H_2O_2 koje se utvrđuju nekim uobičajenim metodama u listu biljaka često precijenjene, jer visoki sadržaj askorbata i fenola u uzorku lista mogu tijekom analize utjecati na konačni sadržaj peroksida. U njihovoj analizi lista ječma, nakon izdvajanja askorbata iz ekstrakta lista, sadržaj H_2O_2 je iznosio 40 - 120 nmol g^{-1} svježe mase lista, što je znatno više od vrijednosti koje su utvrđene u našem istraživanju. **Ishibashi i sur. (2011.)** su tretirali listove soje s otopinom 1 mM H_2O_2, nakon čega su izostavljali zalijevanje posuda s biljkama uzgajanim u fitotronu na 25°C. Na osnovu povećane sinteze nekih oligosaharida u listovima tretiranim otopinom peroksida zaključuju da folijarna primjena H_2O_2 može potaknuti ekspresiju gena odgovornih za otpornost na sušni stres, odnosno da peroksid ima funkciju signala. U našem pokusu s temperaturnim stresom u cvatnji, sadržaj peroksida u listu je bio značajno ($P \leq 0{,}01$) veći na 30°C, u odnosu na temperature 20°C (kontrola) i 10°C (*Slika 5.39.*).

Türkan i sur. (2005.) su zabilježili značajno više vrijednosti lipidne peroksidacije u tretmanu s 10% PEG, što je u skladu s našim rezultatima. Autori također navode kako je intenzitet lipidne peroksidacije rastao u odnosu na duže razdoblje izloženosti stresu, te da postoje značajne razlike između istraživanih kultivara graha. U ovom istraživanju, primjena PEG-a u klijanju sjemena soje je imala vrlo značajan utjecaj na intenzitet lipidne peroksidacije kod svih ispitivanih kultivara (*Tablica 5.7.*), koji je u tretmanu s 10% PEG bio najveći u prosjeku za sve kultivare (*Slika 5.10.*). U fazi cvatnje, LP je bila najveća u tretmanu s 10°C a najmanja u kontroli (*Slika 5.40.*). Tretman niskom

temperaturom, u kojem je utvrđen najveći pad klijavosti (*Slika 5.2.*), nije izazvao najintenzivniju lipidnu peroksidaciju u hipokotilima soje. Obzirom da je tretman trajao sedam dana, može se pretpostaviti da u vrijeme mjerenja već djeluju određeni mehanizmi obrane od štetnih lipidnih peroksida, jer prema **Roskruge i Smith (1997.)** povećanje intenziteta lipidne peroksidacije pri imbibiciji sjemena soje na niskoj temperaturi prethodi drugim indikatorima stresa, poput izlaska K^+ kroz membrane stanica. Autori smatraju da sposobnost sjemena soje da kontrolira lipidnu peroksidaciju može biti važna komponenta hladnog stresa i gubitka nezasićenih masnih kiselina.

Uzevši u obzir sve kultivare i primijenjene tretmane u pokusu s klijanjem sjemena, između intenziteta lipidne peroksidacije (LP) i sadržaja prolina (PRO) u hipokotilu je utvrđena vrlo značajna pozitivna korelacija (r = 0,802**; *Tablica 5.29.*), dok u fazi cvatnje te povezanosti u listu nije bilo. Drugim riječima, u hipokotilu sjemena soje u ovom istraživanju je porast LP praćen pojačanom akumulacijom PRO. Do sličnog zaključka je došao i **Andrić (2008.)**, ispitujući utjecaj starosti sjemena, uvjeta skladištenja i kultivara na vigor sjemena i procese LP i akumulacije PRO u klijancima soje. Autor zaključuje da LP i PRO mogu poslužiti kao lako mjerljivi markeri u selekciji genotipova soje prema otpornosti na abiotski stres. **Masoumi i sur. (2011.)** su utvrdili značajnu negativnu korelaciju između ova dva pokazatelja u uvjetima sušnog stresa, ali je u njihovom istraživanju bio analiziran list 5 kultivara soje, bez naznake u kojoj fazi razvoja je list analiziran. U prosjeku za sve kultivare u našem istraživanju, najveći sadržaj PRO u fazi klijanje-nicanje bio je pri tretmanu 10% PEG-om (17,6 μmol g^{-1} sv.t.) a najmanji u kontroli (1,2 μmol g^{-1} sv.t.; *Slika 5.12.*). S obzirom na statističku značajnost razlika između pojedinih tretmana, uočljivo je da niska temperatura, a naročito sušni stres, aktiviraju sintezu prolina kao obrambeni mehanizam u klijancima soje. Nasuprot tomu, **Silvente i sur. (2012.)** nisu utvrdili povećan sadržaj prolina u prvoj razvijenoj troliski soje uzgajane u posudama s perlitom u plasteniku, kod dva kultivara različite otpornosti na sušu, gdje je sušni stres induciran prestankom zalijevanja biljaka u trajanju od 10 dana, odnosno do sadržaja vode u supstratu od 23%. Kada je u pitanju solni stres, postoji velik broj istraživanja u kojima je akumulacija prolina u različitim biljnim vrstama inducirana solnim stresom. Tako npr. **Aghaei i sur. (2009)** navode da je solni stres u rasponu 0 - 200 mM NaCl značajno utjecao na sadržaj PRO u hipokotilu i korijenu soje. U istraživanju **Amirjani (2010.)**, nakon 4 dana klijanja u otopinama NaCl, pri 100 mM NaCl je utvrđeno povećanje sadržaja PRO za 12

puta u odnosu na kontrolu. Analizirajući sadržaj PRO u listu 4 kultivara soje, **Ramana i sur. (2012.)** konstatiraju veći porast akumulacije PRO u tretmanima iznad 100 mM NaCl, pri čemu je kod tolerantnih kultivara bio veći nego kod osjetljivih, uz manji pad sadržaja vode u listu. U tretmanu s 99 mM NaCl, **Weisany i sur. (2012.)** su utvrdili povećanje PRO do 340% u odnosu na kontrolu, u listovima soje starosti 6 tjedana. Slično navedenim istraživanjima, **Queiroz i sur. (2012.)** utvrđuju vrlo značajno povećanje sadržaja PRO u ksilemu listova soje pod utjecajem solnog stresa do 200 mM NaCl. Nasuprot svim navedenim rezultatima, postoje i istraživanja koja negiraju značajnost akumulacije prolina u uvjetima solnog stresa, tako da npr. **Moftah i Michel (1987.)** zaključuju da prolin nije osjetljivi pokazatelj solnog stresa u soji te da je njegova akumulacija sortno specifično svojstvo, unatoč povećanju PRO u listu soje od 11 puta pod utjecajem 200 mM NaCl. **Delauney i Verma (1993.)** objašnjavaju da izostanak pozitivne korelacije između akumulacije PRO i tolerancije na osmotski stres u nekim biljnim vrstama ne isključuje ulogu prolina u adaptaciji biljaka, već je vjerojatnije da odražava prevagu nekih drugih morfoloških ili fizioloških mehanizama osmotske regulacije.

Ako se usporede prosječni sadržaji prolina i ukupnih fenola (UF) po tretmanima, uočava se da porast sadržaja PRO prati i povećanje sadržaja UF u fenofazi klijanje-nicanje (*Slika 5.14.*), dok u cvatnji nije bilo takve pravilnosti uslijed izostanka utjecaja niske temperature na sadržaj prolina (*Slike 5.41.* i *5.42.*). **Shetty (2003.)** pretpostavlja metaboličke interakcije sinteze prolina sa sintetskim putovima fenolnih spojeva, gdje se povezuju pentozofosfatni put, glikoliza, put šikiminske kiseline i fenilpropanoidni put, prema kojoj sinteza prolina stimulira navedene metaboličke puteve, a time i sintezu fenolnih spojeva. Također, **Hare i Cress (1997.)** smatraju da čak i malo povećanje biosinteze prolina može značajno utjecati na redukciju staničnog NADP. Povećan omjer $NADP^+$/NADPH uslijed biosinteze prolina, čini se da stimulira oksidativno-pentozni put, što omogućuje sintezu intermedijera neophodnih za sinteze sekundarnih metabolita u stresu, kao i sintezu nukleotida potrebnih za intenzivnu staničnu diobu u fazi oporavka, kada oksidacija prolina može biti važan izvor energije za sintezu ATP. Na metaboličku povezanost ova dva pokazatelja u našem istraživanju ukazuje i vrlo značajna pozitivna korelacija (*Tablica 5.29.*; r = 0,861**). Istovremeno povećanje sadržaja prolina i fenola ističe se naročito pri višoj razini sušnog stresa (10% PEG) u fazi klijanje-nicanje. Najveći sadržaj fenola, u prosjeku za sve kultivare, uočen je na

tretmanu 10% PEG-om a najmanji u kontroli. Rezultate slične ovima dobili su i **Shehab i sur. (2010.)**, koji su utvrdili akumulaciju ukupnih fenola s porastom intenziteta osmotskog stresa. U cjelini, osim utjecaja tretmana na sadržaj fenola u hipokotilu značajno su djelovali i kultivar i interakcija kultivara i stresnog tretmana. U fazi cvatnje, temperatura je značajno utjecala na sadržaj ukupnih fenola u listu soje, s najvećom akumulacijom pri 30°C, a najmanjom u kontroli.

Swigonska i Weidner (2013.) zaključuju da u reakciji klijanaca soje na hladni i osmotski stres funkcioniraju složeni stanični mehanizmi tolerancije. Analizirajući proteinski sastav klijanaca, utvrdili su da hladni (tri dana klijanja na 10°C) i osmotski stres (tri dana u otopini PEG 8000; -0,2 MPa) mijenjaju ekspresiju mnogih proteina, između kojih su navedeni glutation-transferaza i askorbat-peroksidaza. Autori smatraju da kada je u pitanju hladni i osmotski stres, važno je determinirati razlike u reakciji na različite stresove i pokušati razlučiti specifične molekularne markere, jer su informacije o preklapanju odgovora na pojedini stres kao i odgovora na kombinaciju ta dva stresa ograničene. **Ashraf i Haris (2004.)** naglašavaju poboljšanje tolerancije na solni stres kod različitih biljnih vrsta kroz pojačanu aktivnost specifičnih enzima za neutralizaciju ROS, te smatraju da ako postoji prirodna varijabilnost tih pokazatelja (antioksidativnih komponenata i enzima), ona može biti temelj oplemenjivačkog programa. **Wang i sur. (2009.)** su utvrdili više razine lipidne peroksidacije i sadržaja vodikovog peroksida u izdancima lucerne u usporedbi s korijenom, pod utjecajem stresa izazvanog s NaCl odnosno PEG, te pretpostavljaju da je za uklanjanje visokih koncentracija peroksida u izdancima važna aktivnost katalaze. **Willekens i sur. (1997.)** smatraju da je CAT stanični *„sink“* za H_2O_2 i da se u slučaju smanjenja aktivnosti ovog enzima pokreću alternativni mehanizmi, poput askorbat- i glutation-peroksidaze. Taj prvi otkriveni i opisani antioksidativni enzim ima prednost što za neutralizaciju peroksida ne zahtijeva dodatni reducens, a u višim biljkama je lokaliziran pretežno ili isključivo u peroksisomima (**Feierabend, 2005.**; **Mhamdi i sur., 2010.**). **Balestrasse i sur. (2010.)** ističu značaj 5-aminolevulinske kiseline za sintezu porfirinskih spojeva poput klorofila, katalaze i peroksidaze. U njihovom istraživanju su biljke soje stare četiri tjedna, tretirane sa navedenim spojem i izložene temperaturi 4°C dva dana, imale 100% veću aktivnost CAT u listu, bez utjecaja na aktivnosti SOD, GR i APX.

Dehghan i sur. (2011.) navode kako koncentracija soli od 50 mM smanjuje klijavost i dužinu klijanca kod istraživanih kultivara soje, a aktivnost CAT i POD je smanjena u odnosu na kontrolu. Pri istoj koncentraciji NaCl, **Amirjani (2010.)** utvrđuje manju masu klijanaca soje, bez utjecaja solnog stresa na aktivnost SOD, CAT i GPOX, dok su 100 i 200 mM NaCl značajno smanjile aktivnost ispitivanih enzima. U istraživanju **Dôgan (2011.)**, aktivnost CAT se nije značajno povećala u listovima soje u tretmanu sa 100 mM NaCl. Autor smatra da promjene aktivnosti CAT mogu varirati ovisno o jačini stresa, vremenu do analize nakon izlaganja biljke stresu i indukciji novih izoformi enzima. U cjelini, autor zaključuje da aktivnost antioksidativnih enzima u solnom stresu ovisi o kultivaru, starosti biljke, o biljnom organu te razini solnog stresa. U našem istraživanju, primijenjeni stresni tretmani su različito djelovali na aktivnost enzima koji sprječavaju štetne učinke povećanog sadržaja peroksida, dakle CAT i GPOX, ovisno i o fenofazi soje, odnosno vrsti analiziranog tkiva. U fazi klijanje-nicanje, CATu se pri 50 mM NaCl nije značajno razlikovala u odnosu na kontrolu, slično rezultatima **Amirjani (2010.)**, koji zaključuje da ta razina solnog stresa nije izazvala oksidacijski stres u soji. U našem pokusu CATu je imala najveću aktivnost u hipokotilu pri najjačem stresu (10% PEG) te pri 100 mM NaCl, a najmanju pri 30°C (*Slika 5.21.*). Nasuprot tomu, u fazi cvatnje je ista temperatura značajno povećala CATu u listu soje u usporedbi s 10°C i 20°C (*Slika 5.43.*). Identičan efekt temperaturnog stresa je u cvatnji utvrđen i kod CATs, dok je u fenofazi klijanje-nicanje, veća vrijednost CATs dobivena u kontroli i na 30°C, a najmanja je bila u 10% PEG, dakle suprotno od CATu. **Masoumi i sur. (2011.)** su u biljkama soje izloženim sušnom stresu utvrdili povećanje aktivnosti CAT praćeno smanjenjem LP, tj. značajnu negativnu korelaciju između ova dva pokazatelja, te pozitivnu vezu između aktivnosti CAT i GR. Biljke u kojima je utvrđena pojačana aktivnost ovih antioksidativnih enzima su na kraju postigle veći prinos zrna i ulja u zrnu. U našem istraživanju, ako se uzmu u obzir svi primijenjeni tretmani, ukupna aktivnost CAT je bila u vrlo značajnim negativnim korelacijama s masama klijanca i hipokotila (*Tablica 5.29.*) te pozitivnim s LP, PRO, UF, i ukupnim aktivnostima ostalih analiziranih enzima (APX, GPOX i GR). Kada je u pitanju temperaturni stres u cvatnji, CATu je značajno pozitivno korelirala samo s UF (*Tablica 5.30.*).

Fenolne komponente imaju ulogu donora elektrona gvajakol-peroksidazama u vakuolama i apoplastu, stoga mogu pridonijeti antioksidativnoj funkciji i neutralizaciji peroksida od strane askorbat-peroksidaze (**Grace, 2005.**). Peroksidaze vezane za

staničnu stjenku i one u fluidu apoplasta mogu biti inhibirane askorbatom, a peroksidaze stanične membrane u stanicama korijena soje su regulirane prisustvom askorbata te mogu imati dvostruku ulogu u stvaranju odnosno cijepanju H_2O_2 ovisno o fiziološkim okolnostima (**Zancani i Nagy, 2000.**). Autori tumače da peroksidaza započinje reakciju u kojoj u prisustvu askorbata dolazi do oksidacije fenola, čime nastaju fenoksi radikali, koji se neenzimskim putem reduciraju u fenole, pri čemu nastaje malondialdehid ili dehidroaskorbat, a vodikov peroksid se reducira do vode. U tom tumačenju je definiran samo jedan segment složenih odnosa između enzimskih i neenzimskih komponenti obrane biljnih stanica od oksidacijskog stresa. Njihova međusobna povezanost je potvrđena i u našem istraživanju brojnim statistički značajnim korelacijama između analiziranih pokazatelja (*Tablice 5.29.* i *5.30.*).

Kada je u pitanju ukupna aktivnost gvajakol-peroksidaze (GPOXu), u klijanju je najveća aktivnost bila na višoj razini solnog stresa (100 mM NaCl) bez statistički značajne razlike prema 10% PEG, a najmanja GXPu je utvrđena na 30°C (*Slika 5.25.*), dakle slično aktivnosti CATu. U fazi cvatnje GPOXu u listu je bila najveća upravo na 30°C, uz vrlo značajnu razliku prema tretmanima s nižom temperaturom (*Slika 5.43.*). GPOXs je u klijanju pokazala suprotno od GPOXu, a u cvatnji se nije razlikovala od GPOXu, što znači da je u klijanju viša temperatura povećala aktivnost a niža temperatura smanjila GPOXs (*Slika 5.44.*). Sve navedeno upućuje na zaključak da visoka temperatura u cvatnji predstavlja za soju stres, pri čemu se višak vodikovog peroksida neutralizira aktivacijom CAT i GPOX. Prema **Essemine i sur. (2010.)**, visoka temperatura u klijanju kod pšenice utječe na učinkovitost mobilizacije rezervi u sjemenu, a presudnu ulogu u reakciji na stres imaju topljive peroksidaze, koje autori smatraju biokemijskim markerima stresa.

Za klijanje sjemena uljarica karakteristična je mobilizacija pričuvnih lipida kao izvora ugljika za rastući klijanac, međutim, unatoč značajnosti ovih procesa, njihovi mehanizmi su tek djelomično razjašnjeni (**Feussner i sur., 2001.**). **Sun i sur. (2011.)** su utvrdili da osmoprimiranje sjemena soje (PEG 8000, 72 h na 25°C) smanjuje sadržaj vodikovog peroksida i produkata lipidne peroksidacije poput MDA koji mogu izazvati oksidacijsko oštećenje sjemena u klijanju pri imbibiciji na niskoj temperaturi. Njihovi rezultati pokazuju povećanu aktivnost enzima SOD, APX, GR i MDHAR (monodehidroaskorbat-reduktaze), povećan sadržaj askorbata i oksidiranog glutationa u

mitohondijima. Autori zaključuju da *„osmopriming"* sjemena soje povećava vigor sjemena u uvjetima klijanja na niskoj temperaturi (4°C), aktivacijom askorbat-glutation ciklusa. Stanični omjer reduciranog i oksidiranog oblika glutationa održava enzim glutation-reduktaza, koja za redukciju GSSG do GSH koristi NADPH, a askorbat i GSH su dva najvažnija topljiva reducensa u živim stanicama, smatraju **Foyer i sur. (2005.)**. APX katalizira redukciju H_2O_2 do vode uz askorbat kao donor elektrona. Ovaj enzim je prisutan u svim staničnim kompartmentima, ima visoki afinitet prema peroksidu i vjerojatno sudjeluje u uklanjanju peroksida u prijenosu staničnih signala (**Mittler i Poulos, 2005.**; **Smirnoff, 2005.**).

Ispitivani kultivari soje su u našem istraživanju pokazali čvrstu povezanost aktivnosti GRu i APXu u klijanju (r = 0,722**; *Tablica 5.29.*). Također, utvrđeno je da se na 100 mM NaCl i nižoj razini sušnog stresa, a naročito na višoj razini sušnog stresa u klijanju aktivira glutation-reduktaza (GRu i GRs; *Slike* 5.29. i *5.30.*), kao i u listu soje pri niskoj temperaturi u cvatnji (*Slike 5.43.* i *5.44.*). Visoka temperatura aktivira APXs u obje faze te APXu u cvatnji. Prema **Vratarić i Sudarić (2007.)**, minimalne temperature tijekom vegetacije pred cvatnju ne bi trebale biti niže od 15°C. Prema **Balestrasse i sur. (2010.)**, istraživanja aklimatizacije na stres uslijed niske temperature dobivaju na značaju zbog širenja uzgoja soje u hladnija područja. Autori ističu da soja potječe iz suptropskih krajeva, stoga ne iznenađuje njena osjetljivost na hladnoću. Uzgoj soje smatraju uspješnim u krajevima s vrućim ljetima, a temperature ispod 20 i iznad 40°C mogu značajno usporiti rast soje. Također navode da niske temperature uz visoku osvijetljenost u proljeće mogu izazvati nepopravljiva oštećenja klijanaca i mladih biljaka soje. U našem istraživanju visoka temperatura (30°C) je očito stimulirala aktivnost enzima askorbat-glutation ciklusa u listovima u fazi cvatnje, što ukazuje na bitan mehanizam zaštite fotosintetskog aparata od oksidacijskog stresa.

Statistički vrlo značajan utjecaj tretmana u obje razvojne faze soje na morfološke pokazatelje, intenzitet lipidne peroksidacije, sadržaj peroksida, prolina i fenola, kao i na enzimske antioksidativne mehanizme u cjelini, upućuje na zaključak da su primijenjeni tretmani abiotskog stresa izazvali oksidacijski stres i obrambene reakcije soje na molekularnoj razini.

6.3. Različitost ispitivanih kultivara soje u vigoru sjemena, razvoju klijanaca i metaboličkoj reakciji na primijenjene stresne tretmane

Znanstvena otkrića u području strukturne i funkcionalne genomike biljaka trebala bi dovesti do stvaranja novih varijeteta soje s poboljšanim nutritivnim i agronomskim svojstvima, kreiranih kombinacijom konvencionalnih i biotehnoloških metoda (**Sudarić i sur., 2011.).** Prema **Vratarić i sur. (2010.)**, jedino stvaranje novih kultivara s boljim gospodarskim svojstvima, uz ostala tehnička i tehnološka saznanja, značajno doprinosi održavanju visoke razine proizvodnje soje i njenom daljnjem unaprjeđenju u Republici Hrvatskoj. Autori navode da rezultati njihovih istraživanja ukazuju na genetski napredak u rodnosti unutar 00 grupe zriobe, te da je u području oplemenjivanja na adaptacijska svojstva težište oplemenjivačkog rada bilo na 0 i I grupi zriobe (**Sudarić i Vratarić, 2008.**). U ovom istraživanju je uključeno šest kultivara soje kreiranih na Poljoprivrednom institutu u Osijeku, koje pripadaju ranim grupama zriobe i to: Korana 00, Lucija 00-0, Vita 0, Zora, Tena i Ika 0-I (**Vratarić i sur., 2010.**). Kao jedan od ciljeva ovog istraživanja bio je utvrditi razlikuju li se ispitivani kultivari soje po vigoru sjemena, razvoju klijanaca i metaboličkoj reakciji u primijenjenim stresnim tretmanima, uz hipotezu da kultivar soje koji ima dobar genetski potencijal otpornosti na stres, trebao bi pokazati adekvatan odgovor na stres u smislu aktivacije fizioloških obrambenih mehanizama, što pretpostavlja bolje podnošenje stresnih uvjeta i preživljavanje većeg broja biljaka u potencijalno stresnim uvjetima tijekom vegetacije.

Najbolju klijavost pri tretmanu 10°C i 30°C pokazala je Ika, koja je također imala najbolji postotak klijavosti pri višoj i nižoj razini solnog stresa (*Tablica 5.2.*). Taj kultivar je ujedno imao najveći prosječni postotak klijavosti, za sve tretmane, dok je najmanji ukupan prosjek utvrđen za kultivar Vita (*Slika 5.1.*). Kod mase klijanca i hipokotila su se isticale Lucija i Korana najvećim vrijednostima, u prosjeku svih tretmana, što bi se moglo dovesti u vezu s njihovom većom masom 1000 zrna (Korana 182 – 206 g, Lucija 190 – 218 g; **Vratarić i sur., 2010.**) u odnosu na ostale ispitivane kultivare. Najslabije klijance su imale Ika i Tena (*Slike 5.3.* i *5.5.*). Utjecaj kultivara na sadržaj vodikovog peroksida u tkivu hipokotila klijanaca soje bio je vrlo značajan kod tretmana natrijevim kloridom koncentracije 50 mM i značajan kod tretmana 10%-tnim PEG-om (*Tablica 5.6.*), dok kod ostalih tretmana nije bilo značajne razlike. U tretmanu koji se pokazao kao najjači stres za soju u fazi klijanje-nicanje, 10% PEG, Lucija je

imala značajno veći sadržaj vodikovog peroksida u usporedbi s ostalim kultivarima koji se međusobno nisu značajno razlikovali. Najveći intenzitet lipidne peroksidacije (LP) je imala Korana pri tretmanu 10% PEG-om, a najmanji Tena u kontroli (*Tablica 5.7.*). Pri tretmanu 10% PEG-om najmanji intenzitet LP imala je Ika. Korana se značajno razlikovala od svih kultivara, s najvećim intenzitetom LP u ovom stresnom tretmanu.

Utjecaj kultivara na sadržaj slobodnog prolina u hipokotilu je bio vrlo značajan pri tretmanima s višom i nižom koncentracijom NaCl-a i PEG-a, dok pri temperaturnim tretmanima nije bio značajan (*Tablica 5.8.*). Kultivari su se značajno razlikovali i u kontrolnom tretmanu, gdje su Korana, Vita, Tena i Zora pokazale sadržaj prolina > 1 μmol g^{-1} sv.t., a ≤ 1 je bio kod Ike i Lucije (*Tablica 5.8.*). Ika je imala najmanji sadržaj PRO u kontroli i pri višoj razini sušnog stresa. U prosjeku svih tretmana, Ika, Tena i Zora su pokazale vrlo značajno manju akumulaciju prolina u hipokotilu u odnosu na Koranu, Vitu i Luciju (*Slika 5.11.*).

Kultivar je vrlo značajno utjecao na sadržaj ukupnih fenola u tkivu hipokotila klijanaca (*Tablica 5.5.*). Korana, u prosjeku za sve tretmane, imala je najveći sadržaj ukupnih fenola u tkivu hipokotila, a Vita najniži (*Slika 5.13.*). Utjecaj 10% PEG-a na sadržaj UF je bio intenzivan u tolikoj mjeri da kod svih ispitivanih kultivara postoji značajna razlika u odnosu na tretman 5% PEG-om i kontrolu. Najveći porast sadržaja fenola u odnosu na kontrolu pod utjecajem 10% PEG je bio kod kultivara Vita (350% u odnosu na kontrolu; *Tablica 5.9.*).

Kultivari Korana, Vita i Lucija su imali u prosjeku za sve tretmane u fazi klijanje-nicanje visok sadržaj peroksida i prolina, uz visok intenzitet lipidne peroksidacije, dok je kod kultivara Zora, Tena i Ika gotovo u pravilu nizak sadržaj peroksida praćen manjom akumulacijom prolina i manjim intenzitetom lipidne peroksidacije.

Rezultati analiza enzimskih pokazatelja reakcije soje na stres pokazuju da je najveću ukupnu i specifičnu aktivnost askorbat-peroksidaze (APXu), prosječno za sve tretmane, imao kultivar Korana a najmanju Ika (*Slike 5.15.* i *5.16.*), koji su imali i najveći odnosno najmanji intenzitet lipidne peroksidacije u hipokotilu. Najveću ukupnu aktivnost askorbat-peroksidaze je imao kultivar Zora pri tretmanu 100 mM NaCl-om.

Najveću specifičnu aktivnost askorbat-peroksidaze u tkivu hipokotila klijanaca soje je imala Tena pri tretmanu 30°C. Specifična aktivnost enzima kod Korane, Ike, Tene i Zore je bila značajno veća pri tretmanu 30°C u odnosu na ostale tretmane i kontrolu. **Van Heerden i Krüger (2002.)** su analizirajući antioksidativne reakcije dva kultivara soje u V_3 fazi na sušni i hladni (chilling) stres, ustanovili razlike u aktivaciji APX i GR te akumulaciji prolina, iako se ispitivani kultivari smatraju tolerantnima na hladni stres.

Najveću ukupnu i specifičnu aktivnost katalaze, u prosjeku za sve tretmane, imala je Zora, a najmanju Ika. U cjelini, najveću ukupnu aktivnost katalaze imala je Korana pri tretmanu 10% PEG, a specifičnu Zora u kontroli. Tretman 30°C je značajno povećao obje aktivnosti CAT u odnosu na tretman 10°C, kod svih kultivara osim Zore.

Kultivar je imao vrlo značajan utjecaj na GPOXu u kontroli i pri tretmanima 10°C, 50 mM NaCl-om i 10% PEG-om, a značajan utjecaj kultivara je utvrđen u tretmanima 100 mM NaCl-om i 5% PEG-om (*Tablica 5.15.*). Na 30°C se kultivari nisu međusobno značajno razlikovali po vrijednostima GPOXu. U prosjeku svih tretmana, kod GPOXu se istakla Lucija najnižom aktivnosti enzima, dok se ostali kultivari nisu značajno razlikovali na razini $P \leq 0{,}01$ (*Slika 5.23.*). Ovaj kultivar je pokazao i najnižu prosječnu vrijednost GPOXs. Utvrđen je vrlo značajan utjecaj kultivara na GPOXs u kontroli i pri tretmanima 10°C i 10% PEG om, a značajan pri tretmanu 5% PEG (*Tablica 5.16.*). Pri tretmanima 30°C, 50 mM i 100 mM NaCl nije bilo značajnog utjecaja kultivara.

Kultivar je imao vrlo značajan utjecaj na ukupnu i specifičnu aktivnost glutation-reduktaze (*Tablica 5.10.*). Obje aktivnosti enzima su imale najveće vrijednosti u prosjeku za sve tretmane kod kultivara Lucija, dok su najniže aktivnosti utvrđene kod kultivara Ika. U tretmanu s 10% PEG, povećanje ukupne aktivnosti u usporedbi s kontrolom kod kultivara Lucija je bilo 15 puta (kontrola 0,129, 10% PEG 1,953 μmol min^{-1} g^{-1} sv.t.). Svi kultivari su imali najmanju GRs aktivnost pri tretmanu 10°C, a najveću pri tretmanu 10% PEG-om.

Iako su kultivari Tena i Zora slično reagirale na primijenjene stresne tretmane u smislu promjene sadržaja H_2O_2 i PRO, te aktivnosti GPOX i GR, na temelju razlika u morfološkim pokazateljima i aktivnostima APX i CAT, ova dva kultivara su odabrana za testiranje reakcije soje na temperaturni stres u fazi cvatnje. U klijanju, Zora je u oba

stresna temperaturna tretmana pokazala bolju klijavost ($P \leq 0,01$; *Tablica 5.2.*), veću masu klijanca na 30°C, i veću masu hipokotila na 10°C. Uspoređujući sve kultivare ispitivane u klijanju, Zora je na 10°C imala najveći sadržaj UF a Tena najmanji (*Tablica 5.9.*). APXu je kod Zore bila manja u oba temperaturna stresa ($P \leq 0,01$; *Tablica 5.11.*), CATu je bila statistički značajno manja kod Zore na 30°C ($P \leq 0,01$; *Tablica 5.13.*), kao i GPOXu, GPOXs i GRu na 10°C ($P \leq 0,01$; *Tablica 5.15., 5.16.* i *5.17.*).

6.4. Fotosintetska učinkovitost i razina antioksidativnog odgovora u listu soje pod utjecajem visokih i niskih temperatura u fazi cvatnje

Stabilan genotip odlikuje manja varijabilnost fenotipske ekspresije svojstva u svim istraživanim okolišima, odnosno genotip ne pokazuje odstupanje od očekivane visine svojstva promjenom okoliša (**Sudarić i sur., 2003**.). **Gass i sur. (1996.)** navode da je naročito interesantno da je između tolerantnih i osjetljivih kultivara soje na nisku temperaturu razlika u samo 3°C (15, odnosno 18°C). Tijekom intenzivnog rasta soji je potrebna relativno visoka temperatura, od 20 do 25°C (**Vratarić i Sudarić, 2008**.). U stadiju cvatnje i sazrijevanja zrna, niske temperature odgađaju zriobu a pri padu temperature ispod 14°C dolazi do zaustavljanja rasta. Holmberg smatra (cit. **Vratarić i Sudarić, 2008.)** da je za cvatnju soje minimalna temperatura 17 - 18, a optimalna 20 - 25°C. Autorice navode da za vrijeme ljetnih mjeseci kada naglo zatopli nakon vlažnog razdoblja i temperatura poraste iznad 32°C, te nastane sušno vrijeme s jakom insolacijom, na listovima soje mogu se pojaviti ožegotine. Ukoliko su jača oštećenja u cvatnji, slabija je oplodnja cvjetova te u konačnici ukupni urod. Pri tomu su uočene razlike u oštećenjima među kultivarima. Kako je tvorba organske tvari neophodan preduvjet rasta i produktivnosti biljaka, proces fotosinteze je naročito bitan segment metabolizma u kojem može doći do oksidacijskog stresa i molekularnih oštećenja koja mogu rezultirati inhibicijom rasta i smanjenjem prinosa. Stoga je jedan od ciljeva ovog istraživanja bio utvrditi fotosintetsku učinkovitost i razinu antioksidativnog odgovora u listu soje pod utjecajem visokih i niskih temperatura u fazi cvatnje. U literaturi ima nedovoljno informacija upravo o tom tipu abiotskog stresa kod soje, za razliku od sušnog stresa, stoga smatramo da bi bolje poznavanje fizioloških mehanizama otpornosti ili adaptabilnosti soje na temperaturne ekstreme bilo poželjno zbog kreiranja novih kultivara koji bi bolje podnosili sve izraženije klimatske poremećaje. Među

potencijalno korisne pokazatelje reakcije biljaka na temperaturni stres često se ubrajaju koncentracije fotosintetskih pigmenata, njihovi omjeri te pokazatelji učinkovitosti fotosinteze temeljeni na fluorescenciji klorofila. Polazeći od analiziranih morfoloških pokazatelja - mase listova po biljci, broja razvijenih troliski i prosječne mase troliske, nakon tri dana izlaganja biljaka visokoj odnosno niskoj temperaturi, može se utvrditi vrlo značajan utjecaj tretmana (*Tablice 5.19.* i *5.20.*), s izrazito negativnim utjecajem visoke temperature. Istražujući utjecaj niske temperature na cvatnju i formiranje mahuna kod soje, **Ohnishi i sur. (2010.)** su utvrdili da se ističu dva stadija prije polinacije u kojima je izrazita osjetljivost na hladni stres. Otprilike 12,5 dana prije polinacije, kada je polen u stadiju tetrada, hladni stres (15/10°C dnevna/noćna temperatura) dovodi do poremećaja u razvoju polena, a u kasnijem razvoju cvijeta 3 - 4 dana prije polinacije remeti difuziju polena i smanjuje broj polenovih zrnaca na njuški tučka.

U prosjeku za sve kultivare, temperatura je imala vrlo značajan utjecaj na sadržaj svih mjerenih pigmenata i njihove omjere (*Tablica 5.21.*). U kontroli, sadržaj klorofila a je bio najveći u prosjeku za oba kultivara (1,72 mg g^{-1} sv.t.), ali se nije značajno razlikovao od nešto nižih vrijednosti pri tretmanu 10°C (*Slika 5.34.*). Statistički značajno manji sadržaj klorofila a je bio u tretmanu 30°C (1,27 mg g^{-1} sv.t.), gdje je i sadržaj karotenoida bio značajno niži u odnosu na kontrolu i nižu temperaturu. Ukupan sadržaj klorofila u kontroli i pri tretmanu 10°C je bio značajno veći u odnosu na sadržaj pri tretmanu 30°C.

Temperaturni tretman je imao vrlo značajan utjecaj na sadržaj klorofila a kod oba kultivara (*Tablica 5.23.*). Tena je imala najveći sadržaj klorofila a pri tretmanu 10°C, nešto niži sadržaj je imala u kontroli a najniži pri 30°C. Najveći sadržaj klorofila a je imala Zora u kontroli, a najmanji sadržaj je kod ovog kultivara također bio pri tretmanu 30°C. Kod oba kultivara je evidentan pad koncentracije klorofila i karotenoida u listu u fazi cvatnje kao rezultat stresnog djelovanja visoke temperature. Nasuprot tomu, utjecaj kultivara u prosjeku za sve tretmane je bio statistički značajan samo kod omjera klorofila a i b, pri čemu je kod Zore iznosio 2,46 a kod Tene 2,59. U istraživanju **Teklić i sur. (2009**.), između pet analiziranih kultivara soje Poljoprivrednog instituta u Osijeku utvrđene su značajne razlike u sadržajima kloroplastnih pigmenata, dok su omjeri pigmenata više ovisili o godini istraživanja u poljskim uvjetima. U ovom istraživanju,

provedenom na biljkama u R_2 fazi, prosječne vrijednosti kod netretiranih biljaka su bile: Kl a 1,72 mg g^{-1}, Kl b 0,64 mg g^{-1}, KL 2,36 mg g^{-1}, CAR 0,52 mg g^{-1}, Kl a/b 2,66 i KL/CAR 4,55, što su s izuzetkom KL/CAR uočljivo niže vrijednosti u odnosu na rezultate navedenih autora i mogu se pripisati različitim uzgojnim uvjetima, sortimentu i fazi razvoja. Između mjerenih pokazatelja učinkovitosti fotosinteze i sadržaja i omjera fotosintetskih pigmenata ustanovljen je veliki broj značajnih korelacija (*Tablica 5.35.*).

Stres izazvan visokim temperaturama može ograničiti rast usjeva i prinos biljaka (**Boyer, 1982.**). Prema prethodno opisanim pokazateljima, trodnevni tretman biljaka soje u fazi cvatnje temperaturom od 30°C izaziva stres u listovima koji su glavni dio fotosintetskog aparata biljke i o čijem funkcioniranju ovisi konačna produktivnost usjeva. **Kereša i sur. (2008.)** ističu da su kloroplasti posebno pogođeni slobodnim radikalima jer sadrže relativno visoku koncentraciju kisika koji se reducira elektronima koji „pobjegnu" iz fotosustava pretvarajući ga u superoksidni radikal ($\bullet O_2^-$). Uobičajen odgovor biljaka osjetljivih na niže temperature je brza inhibicija fotosinteze (**Ort, 2002.**), koja, čak i pri umjerenom intenzitetu svjetla može imati za posljedicu usporavanje aktivnosti i fotooštećenje PS II. Inaktivacija PS II i dezorganizacija tilakoida se smatraju ključnim obilježjima stresa izazvanog visokim temperaturama, koje prati nagli porast F_0 koja je zavisna od temperature i ukazuje na kritičnu temperaturu za inaktivaciju PS II (**Smillie i Nott, 1979.**; **Havaux, 1993.**). Naime, smanjenje Fv/Fm može biti posljedica usporavanja procesa gašenja fluorescencije i fotooštećenja reakcijskih centara fotosustava II, što sve skupa smanjuje maksimalnu učinkovitost kvanata svjetlosti u fotokemijskom sustavu PS II. Fv/Fm se koristi kao indikator ukupne fotosintetske učinkovitosti, čija optimalna vrijednost iznosi oko 0,83 - 0,84 kod većine biljnih vrsta (**Agati i sur., 1996.**; **Maxwell i Johnson, 2000.**; **Murchie i Lawson, 2013.**; **Kalaji i sur., 2014.**). **Li i sur. (2009.)** su izložili odsječene listove četiri tjedna starih biljaka soje temperaturi 45 i 48°C te mjerili fotokemijsku učinkovitost PS II. Prema dobivenim rezultatima zaključuju da bez obzira kako je Fv/Fm reagirao na različite temperaturne tretmane, taj pokazatelj ne može potpuno objasniti ponašanje PS II. U našem istraživanju je Fv/Fm kod oba kultivara soje bio najviši na 10°C, a najniži na 30°C (*Slika 5.36.*), uz visoku značajnost utjecaja tretmana kod oba kultivara (*Tablica 5.24.*) s tim što razlike između kultivara u pojedinim tretmanima nisu bile statistički značajne. Unatoč statistički vrlo značajnoj razlici između kontrole i tretmana s 10°C, dobivene vrijednosti prema dostupnim literaturnim

podacima ne ukazuju na „*chilling*“ stres odnosno negativan utjecaj niske temperature na funkcioniranje PS II, niti se ovaj pokazatelj može smatrati dobrim indikatorom stresa uslijed niske temperature u listovima soje u cvatnji. Slično zaključuju i **Van Heerden i sur. (2004.)** te **Strauss i sur. (2006.)**. Suprotno našim rezultatima, **Tambussi i sur. (2004.)** su utvrdili značajan pad maksimalnog kvantnog prinosa PS II (Fv/Fm) u listovima soje izloženim niskoj temperaturi (7°C), međutim ističu da niska temperatura nije izazvala značajan porast lipidne peroksidacije u tilakoidnim membranama. Fluorescencija u odsustvu aktinske svjetlosti (minimalna razina fluorescencije, F_0), bila je značajno najviša na 30°C. Povećanje F_0 je indikator fotoinhibicije u uvjetima visokih (**Gamon i Pearcy, 1990**.) i niskih (**Groom i Baker, 1992**.) temperatura. Između F_0 na 10°C i 20°C nije bilo statistički značajnih razlika. Prosječna vrijednost maksimalne fluorescencije, Fm, bila je najviša na 30°C i najniža na 20°C, kod oba kultivara. Odnos između varijabilne i početne fluorescencije, Fv/F_0, bio je kod oba kultivara različit na sve tri temperature - najviši na 10°C i najniži na 30°C, slično kao Fv/Fm. U cjelini, na parametre fluorescencije je veći utjecaj imala temperatura nego kultivar. U preglednom radu o istraživanjima povezanosti fluorescencije klorofila a i abiotskog stresa, **Guo i Tan (2015.)** prikazuju rezultate radova na tom području u zadnjih 10 godina. Prema njihovom mišljenju, ustanovljen je velik broj pokazatelja vezanih za mjerenje fluorescencija klorofila kojima se povećava fleksibilnost u primjeni ove metodologije, ali s druge strane to doprinosi složenosti, nekonzistentnosti i kontradiktornosti rezultata i njihovih tumačenja, naročito pri usporedbi različitih istraživanja. Konkretno, pojedini parametar fluorescencije klorofila u jednom ispitivanju može biti koristan a u nekom drugom ne. Tako npr. **Strauss i sur. (2006.)** na temelju mjerenih pokazatelja fluorescencije zaključuju koji kultivari soje su tolerantni na stres niske temperature a koji su osjetljivi. Prema našim rezultatima Fv/Fm i F_0 evidentno je da 30°C u fazi cvatnje negativno djeluje na fotosintetsku aktivnost u listu soje. Učinkovitost fotosintetskog transporta elektrona i morfološki pokazatelji na razini lista su kod Zore više varirali u tri primijenjena temperaturna tretmana nego kod Tene. Obzirom da je kultivar Tena pokazao manju varijabilnost morfoloških svojstava na razini lista, pretpostavljamo da je prema otpornosti na temperaturni stres u fazi cvatnje stabilniji genotip od Zore.

Primijenjeni temperaturni tretmani su imali različit učinak na fiziološke mehanizme odgovora soje na stres i u fazi cvatnje. Vrlo značajan utjecaj temperature utvrđen je kod

sadržaja vodikovog peroksida i prolina, intenziteta lipidne peroksidacije te ukupne i specifične aktivnosti askorbat-peroksidaze i gvajakol-peroksidaze (*Tablica 5.25.* i *5.27.*), gdje su gotovo u pravilu najveće vrijednosti dobivene na 30°C. Izuzetak je LP, koja je bila najveća na 10°C. Prema **Kotak i sur. (2007.)**, hiperprodukcija H_2O_2 se javlja već nakon vrlo kratkih razdoblja visoke temperature, vjerojatno kao rezultat aktivnosti enzima NADPH-oksidaze. U istraživanju **Ma i sur. (2008.)**, povećani intenzitet lipidne peroksidacije i sadržaj H_2O_2 u listu jabuke nakon izlaganja visokoj temperaturi (40°C) do 8 h, dokazuju oksidacijski stres, pri čemu je aktivnost enzima askorbat-glutation ciklusa bila najveća 4 h od početka tretmana, nakon čega se smanjivala. U istraživanju stresa zbog visoke temperature u jagodama, **Gulen i Eris (2004.)** dobivaju značajno povećanje ukupne i specifične aktivnosti peroksidaze. Kako su u biljkama izlaganim postupnom povećanju temperature uočili manji gubitak elektrolita iz stanica lista, pretpostavljaju da je uloga peroksidaza u odgovoru na toplinski stres popravak oštećenja u staničnim membranama.

Izlaganje biljaka soje u fazi cvatnje trodnevnom tretmanu s konstantnom temperaturom od 30°C rezultiralo je povećanjem sadržaja peroksida, prolina i fenola, te povećanjem aktivnosti ukupne i specifične aktivnosti APX i CAT, te GPOXu, dok je ista temperatura značajno smanjila aktivnost GRs, a kod GRu nije bilo značajne razlike u odnosu na kontrolu. Temperatura od 10°C čini se nije predstavljala stres za biljku u fazi cvatnje jer su vrijednosti ispitivanih pokazatelja uglavnom bile niže nego na 30°C ili podjednake onima u kontrolnom tretmanu (20°C). Značajno niža pri 10°C u odnosu na kontrolu i 30°C je bila jedino GPOXs. Ispitivani kultivari se nisu značajno razlikovali u analiziranim metaboličkim pokazateljima reakcije na stres, stoga se ne može istaći nijedan od navedenih pokazatelja kao najbolji indikator otpornosti soje na temperaturni stres u fazi cvatnje. Međutim, analizirajući povezanost morfoloških i fizioloških pokazatelja reakcije na temperaturni stres u cvatnji, mogu se istaći značajne negativne korelacije između mase listova biljke i sadržaja fenola te APXu u listu (*Tablica 5.30.*), te vrlo značajna korelacija negativnog smjera između sadržaja fenola i broja troliski po biljci.

Rezultati istraživanja **Jukić i sur. (2010.)** potvrđuju mogućnost povećanja prinosa zrna soje pravilnim odabirom kultivara i skupine zriobe ovisno o mikroklimatskim osobinama pojedinog proizvodnog područja. Stoga bi ispitivane genotipove soje trebalo

testirati na agroekološki različitim lokalitetima i godinama (interakcije genotipa, lokaliteta i godine), kako bi se provjerile utvrđene razlike u mjerenim pokazateljima fotosintetske učinkovitosti i ocijenio njihov značaj u tvorbi prinosa zrna, kao i metaboličke reakcije soje na abiotski stres u realnim, poljskim uvjetima.

6.5. Aktiviraju li se obrambeni fiziološki mehanizmi, utvrđeni u fazi klijanje-nicanje, i u fazi cvatnje?

U okviru polaznih hipoteza u ovom istraživanju pretpostavljeno je da su interakcije genetske osnove, faze rasta i razvoja, odnosno razine stresa, presudne u aktivaciji pojedinih fizioloških mehanizama obrane na stres u biljci soje. Stoga je cilj također bio utvrditi da li se obrambeni fiziološki mehanizmi utvrđeni u fazi klijanje-nicanje aktiviraju i u fazi cvatnje. U fokusu istraživanja kojim se željelo provjeriti navedene pretpostavke je bio temperaturni stres, kao bitan činitelj, kako uspješnog klijanja i postizanja željenog sklopa usjeva, tako i generativnog rasta i razvoja soje odnosno visine uroda.

Primijenjeni temperaturni tretmani su u dva ispitivana kultivara (Tena i Zora) inicirali dijelom identične a dijelom različite reakcije. Sadržaj vodikovog peroksida je u fazi klijanje-nicanje bio smanjen kod oba kultivara na niskoj i visokoj temperaturi, u usporedbi s kontrolom, što ukazuje na aktivaciju zaštitnih metaboličkih mehanizama pri temperaturnom stresu. U cvatnji, oba kultivara su imala najveći sadržaj peroksida u listu pri temperaturi 30°C. Intenzitet lipidne peroksidacije je u obje faze i kod oba kultivara bio najveći na 10°C. Usporedbom reakcija ova dva kultivara na temperaturni stres, uočava se veći porast intenziteta LP na 10°C u hipokotilu Tene, u odnosu na kontrolu, nego kod Zore. Sadržaj prolina je u klijanju-nicanju kod oba kultivara bio najveći na 10°C a u cvatnji na 30°C, što ukazuje da je akumulacija PRO osjetljiv indikator stresa kod soje, u različitim fazama razvoja. Ispitivani kultivari su se razlikovali po akumulaciji fenola u hipokotilu pod utjecajem temperaturnog stresa, te je na obje stresne temperature kod Tene utvrđen niži sadržaj UF u odnosu na kontrolu, a kod Zore je najveći sadržaj utvrđen na tretmanu koji se po ostalim pokazateljima može smatrati većim stresom za soju u klijanju i nicanju - niskoj temperaturi (10°C). Kako je već

navedeno, akumulacija UF u listu oba kultivara je bila stimulirana visokom temperaturom u cvatnji.

Slično kao kod PRO, aktivnost APXu je u fazi klijanje-nicanje kod oba kultivara bila najveća pri 10°C, a u cvatnji u tretmanu s 30°C. Na temelju značajnih pozitivnih korelacija između PRO i APXu u obje razvojne faze (klijanje r = 0.882*; cvatnja r = 0,928**), može se pretpostaviti izvjesna metabolička povezanost između ova dva mehanizma obrane od temperaturnog stresa, koju bi trebalo detaljnije ispitati na genetskoj i molekularnoj razini. Specifična aktivnost askorbat-peroksidaze je pokazala najveće vrijednosti kod oba kultivara, u obje razvojne faze, pri stresu visokom temperaturom. Kada je u pitanju enzim katalaza, ispitivani kultivari su pokazali određene razlike. CATu je u klijanju bila najveća kod Tene na 10°C, a kod Zore je u oba stresna tretmana bila smanjena u odnosu na kontrolu. U cvatnji je aktivnost katalaze kod Tene bila najveća na 30°C a kod Zore na 10°C. Specifična aktivnost je kod oba kultivara u klijanju smanjena u stresnim tretmanima u odnosu na kontrolu, dok je u cvatnji pokazala iste razlike između kultivara kao i CATu, dakle Tena je imala najveću CATs na 30°C, a Zora na 10°C. Kultivari su se po aktivnosti GPOXu u klijanju razlikovali isto kao kod CATu, odnosno Tena je imala najveću aktivnost na 10°C a Zora u kontroli. U cvatnji su oba kultivara na temperaturu reagirale slično, tj. visoka temperatura je stimulirala aktivnost CATu. GPOXs je kod obje razvojne faze i oba kultivara također bila stimulirana visokom temperaturom. Suprotno tomu, GRu je kod oba kultivara i u obje razvojne faze bila stimulirana niskom temperaturom. **Kocsy i sur. (2001.)** također zaključuju da povećanje aktivnosti GR doprinosi toleranciji na stres niskom temperaturom kod termofilnih vrsta poput soje i kukuruza. Isti učinak je niska temperatura proizvela u cvatnji kada je u pitanju GRs, dok je u klijanju ovaj pokazatelj bio kod Tene najveći u kontroli a kod Zore na 30°C. U cjelini, ukupne aktivnosti ispitivanih enzima su bile veće u klijanju na 10°C a u cvatnji na 30°C, što sugerira različitost stresnog efekta ambijentalne temperature ovisno o fazi razvoja biljke soje. Ista pravilnost se može istaći kada se ocjenjuje značaj akumulacije prolina u različitim tkivima soje pod utjecajem temperaturnog stresa.

Pri imbibiciji i klijanju sjemena soje na 4°C, **Cheng i sur. (2010.)** su utvrdili pojačanu transkripciju gena *SOL34* u vršnim dijelovima korijena i klici. Navedeni gen kodira jedan od ribosomalnih proteina (*L34*) s ulogom negativnih regulatora, koji prekidaju

transkripcijske procese drugih gena kao odgovor na stres, te autori zaključuju da ovaj gen može imati negativnu ulogu u adaptaciji na nisku („*chilling*“) temperaturu. Kako su prosječne vrijednosti CAT i GPOX bile vrlo značajno smanjene pod utjecajem niske temperature u usporedbi s kontrolom bilo bi interesantno analizirati ekspresiju ovog gena te aktivnost navedenih enzima i u ostalim domaćim kultivarima soje, u uvjetima hladnog stresa u fazi klijanja (*Slika 5.21., 5.22., 5.25.* i *5.26.*).

Reakcija ispitivanih kultivara soje na solni stres ukazuje da je ova glikofitna biljna vrsta osjetljiva na koncentracije NaCl ≥ 100 mM u fazi klijanja. Je li za aktivaciju obrambenih fizioloških mehanizama pri ovoj vrsti i razini stresa važnija osmotska ili ionska komponenta otopine soli u kojoj se odvija imbibicija sjemena soje, trebalo bi ustanoviti daljnjim istraživanjima. **Phang i sur. (2011.)** smatraju da je produktivnost soje u nepovoljnim okolišnim uvjetima značajno limitirana osmotskim stresom, uslijed solnog, sušnog i hladnog stresa, te navode da je sve više informacija o transkripcijskim faktorima soje i mikro-RNA i njihovim ulogama u reakciji na osmotski stres.

Sušni stres imitiran otopinama PEG u fazi klijanje-nicanje kod soje je izazvao različitu fiziološku reakciju, ovisno o intenzitetu stresa i kultivaru. Stimulativno djelovanje otopina različite osmotske vrijednosti na prekidanje dormantnosti sjemena i poboljšavanje klijanja je u literaturi poznato kao „*osmopriming*“, te je niža razina imitiranog sušnog stresa, tj. naklijavanje sjemena soje u prisustvu 5% PEG u našem istraživanju imalo sličan učinak. **Filippou i sur. (2013.)** tumače da se fiziološko stanje u kojem su biljke sposobne aktivirati obrambene mehanizme brže, bolje, ili oboje, naziva „*primed state*“, a „*priming*“ ili kondicioniranje biljke može biti odgovor na određeni okolišni činitelj, i ostati kao rezidualni učinak nakon početnog izlaganja stresu. Pretpostavljamo da je upravo takvo objašnjenje moguće prihvatiti za rezultate našeg istraživanja, gdje je 5%-tni PEG rezultirao pozitivnim učinkom na vigor klijanaca soje.

Bailly i sur. (2008.) su postavili koncept tzv. „oksidacijskog prozora“ za klijanje, u čemu je za odvijanje staničnih procesa vezanih za klijanje presudna kritična razina ROS, u smislu donje i gornje granice količine ROS. Prema tom konceptu, manje i veće količine ROS sprječavaju odvijanje procesa klijanja. Smatramo da buduća istraživanja potencijala otpornosti soje na abiotski stres trebaju otkriti granice „prozora“ u različitim organima i tkivima soje i produbiti spoznaje o povezanosti genoma i fenotipa

(„*phenotyping*“) soje u stresnim uvjetima uzgoja, s ciljem stvaranja kultivara s visokom produktivnošću u sve nepovoljnijim uvjetima okoliša.

7. ZAKLJUČCI

Provedena istraživanja odgovora soje na sušni, solni i temperaturni stres upućuju na slijedeće zaključke:

1. Statistički vrlo značajan utjecaj tretmana u obje razvojne faze soje na morfološke pokazatelje, intenzitet lipidne peroksidacije, sadržaj peroksida, prolina i fenola, kao i na enzimske antioksidativne mehanizme u cjelini, upućuje na zaključak da su primijenjeni tretmani izazvali oksidacijski stres i obrambene reakcije soje na molekularnoj razini.
2. U fazi klijanje-nicanje je visoka temperatura (30°C) stimulirala rast i razvoj klijanaca bez značajne razlike prema kontroli (20°C), dok su u cvatnji broj i masa listova, tj. troliski značajno smanjeni u oba stresna temperaturna tretmana, s jačim negativnim efektom visoke temperature. U prosjeku za sve kultivare, na temelju ostvarenog postotka klijavosti, niska temperatura (10°C) se može smatrati najjačim stresom za soju.
3. Blagi osmotski stres u slučaju 5% otopine PEG, čiji je osmotski potencijal -0,05 MPa, mogao je imati tzv. „*priming*" efekt u fazi klijanje-nicanje. Naime, u prosjeku za sve kultivare, najveća klijavost je postignuta u varijanti pokusa gdje je papir kao podloga za sjeme tijekom klijanja namočen 5%-tnim PEG-om.
4. Sve razine i vrste stresa su smanjile masu klijanca, osim temperature 30°C, a najmanju masu klijanca su kultivari imali pri višoj razini sušnog stresa induciranog s otopinom 10% PEG, čiji je osmotski potencijal -0,15 MPa. Kod svih kultivara u odnosu na kontrolu je dobiveno značajno smanjenje mase hipokotila kod svih tretmana, osim kod 30°C. Svi kultivari su imali najmanju masu hipokotila pri tretmanu 10% PEG.
5. Prema vrijednostima ispitivanih metaboličkih pokazatelja (peroksidi, intenzitet lipidne peroksidacije, sadržaj slobodnog prolina i ukupnih fenola, aktivnosti antioksidativnih enzima) u tkivu hipokotila, odnosno lista soje u fazi pune cvatnje, može se zaključiti da je najznačajniji abiotski stres u klijanju viša razina sušnog stresa (PEG 10%), između 50 i 100 mM NaCl nije bilo značajne razlike u metaboličkoj reakciji u klijancima, temperatura 10°C je predstavljala veći stres u klijanju, a temperatura 30°C u cvatnji. Istovremeno povećanje sadržaja prolina i

fenola ističe se naročito pri višoj razini sušnog stresa (10% PEG) u fazi klijanje-nicanje.

6. Između ispitivanih morfoloških i fizioloških pokazatelja reakcije soje na primijenjene stresne tretmane postojale su brojne statistički značajne korelacije u fazi klijanje-nicanje, dok je pri temperaturnom stresu u fazi cvatnje broj takvih korelacija bio manji.
7. U prosjeku za sve ispitivane kultivare, na višoj razini sušnog stresa u klijanju su uz pojačan intenzitet lipidne peroksidacije, inducirani enzimski obrambeni mehanizmi ukupne aktivnosti katalaze, gvajakol-peroksidaze, glutation-reduktaze, te specifična aktivnost glutation-reduktaze.
8. Kultivari Korana, Vita i Lucija su imali u prosjeku za sve tretmane u fazi klijanje-nicanje, visok sadržaj peroksida i prolina, uz visok intenzitet lipidne peroksidacije, dok je kod kultivara Zore, Tene i Ike gotovo u pravilu nizak sadržaj peroksida praćen manjom akumulacijom prolina i manjim intenzitetom lipidne peroksidacije. U istoj razvojnoj fazi, kultivar Lucija se isticala visokom aktivnosti glutation-reduktaze, kultivar Vita je imala najveću prosječnu aktivnost gvajakol-peroksidaze, kultivar Zora se istakla najvećim prosjekom ukupne i specifične aktivnosti katalaze, a kultivar Korana askorbat-peroksidaze.
9. Na temelju značajnih pozitivnih korelacija između sadržaja prolina i ukupne aktivnosti askorbat-peroksidaze u obje razvojne faze, može se pretpostaviti izvjesna metabolička povezanost između ova dva mehanizma obrane od toplinskog stresa, koju bi trebalo detaljnije ispitati na genetskoj i molekularnoj razini.
10. U prosjeku za sve kultivare, temperatura je u fazi cvatnje imala vrlo značajan utjecaj na sadržaj svih mjerenih pigmenata i njihove omjere, uz jači negativni učinak visoke temperature. Između mjerenih pokazatelja učinkovitosti fotosinteze i sadržaja i omjera fotosintetskih pigmenata ustanovljen je veliki broj značajnih korelacija. Na ispitivane pokazatelje fotosintetske učinkovitosti soje pod utjecajem temperaturnog stresa je veći utjecaj imala temperatura nego sortna specifičnost.
11. Visoka temperatura je u listu soje u fazi cvatnje značajno stimulirala akumulaciju vodikovog peroksida, prolina, ukupnih fenola kao i aktivnosti svih analiziranih antioksidativnih enzima osim ukupne aktivnosti glutation-reduktaze.
12. U fazi klijanje-nicanje kultivar Tena je u prosjeku svih tretmana imao niži postotak klijavosti od Zore, malu masu hipokotila i srednju aktivnost askorbat-peroksidaze i katalaze. Kultivar Zora je uz veću klijavost i srednju masu hipokotila, pokazao

visoku aktivnost askorbat-peroksidaze i katalaze. Sadržaj vodikovog peroksida je u fazi klijanja-nicanja bio smanjen kod Tene i Zore na niskoj i visokoj temperaturi, što ukazuje na aktivaciju zaštitnih metaboličkih mehanizama u stresnim uvjetima niske i visoke temperature. U cvatnji, oba kultivara su imali najveći sadržaj vodikovog peroksida u listu pri temperaturi 30°C.

13. U cjelini, ukupne aktivnosti ispitivanih enzima su bile veće u klijanju na 10°C a u cvatnji na 30°C, što sugerira različitost stresnog efekta ambijentalne temperature ovisno o fazi razvoja biljke soje.
14. Obzirom da je kultivar Tena pokazao manju varijabilnost ispitivanih morfoloških i fizioloških svojstava, pretpostavlja se da je prema otpornosti na temperaturni stres u fazi cvatnje stabilniji genotip od Zore, što bi trebalo ispitati i u poljskim uvjetima.

8. LITERATURA

A Aebi, H. (1984.): Catalase *in vitro*. Methods in Enzymology; Packer, L. (Ed.) Academic Press Inc.: San Diego, CA, USA. 105: 121–126.

Agati, G., Mazzinghi, P., Lipucci di Paola, M., Fusi, F., Cecchi, G. (1996.): The F685/F730 chlorophyll fluorescence ratio as indicator of chilling stress in plants. Journal of Plant Physiology. 148(3-4): 384-390.

Aghaei, K., Ehsanpour, A.A., Shah, A.H., Komatsu, S. (2009.): Proteome analysis of soybean hypocotyl and root under salt stress. Amino Acids. 36(1): 91-98.

Ahuja, I., de Vos, R.C.H., Bones, A.M., Hall, R.D. (2010.): Plant molecular stress responses face climate change. Trends in Plant Science. 15(12):664-674.

Alam, M.Z., Stuchbury, T., Naylor, R.E.L. (2002.): Effect of NaCl and PEG induced osmotic potentials on germination and early seedling growth of rice cultivars differing in salt tolerance. Pakistan Journal of Biological Sciences. 5(11): 1207-1210.

Alexieva, V., Ivanov, S., Sergiev, I., Karanov, E. (2003.): Interaction between stresses. Bulgarian Journal of Plant Physiology. Special Issue: 1-17.

Alia, Saradhi, P.P., Mohanty, P. (1997.): Involvement of proline in protecting thylakoid membranes against free radical-induced photodamage**.** Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology. 38(2): 253-257.

Almeselmani, M., Deshmukh, P.S., Sairam, R.K., Kushwaha, S.R., Singh, T.P. (2006.): Protective role of antioxidant enzymes under high temperature stress. Plant Science. 171(3): 382-388.

Alscher, R.G., Donahue, J.L., Cramer, C.L. (1997.): Reactive oxygen species and antioxidants: Relationships in green cells. Physiologia Plantarum. 100(2): 224-233.

Ambriović Ristov, A., Brozović, A., Bruvo Mađarić, B., Ćetković, H., Hranilović, D., Herak Bosnar, M., Katušić Hećimović, S., Meštrović Radan, N., Mihaljević, S., Slade, N., Vujaklija, D. (2007.): Metode u molekularnoj biologiji. Institut Ruđer Bošković; Zagreb.

Amirjani, M.R. (2010.): Effect of salinity stress on growth, mineral composition, proline content, antioxidant enzymes of soybean. American Journal of Plant Physiology. 5(6): 350-360.

Andrić, L. (2008.): Gubitak vigora sjemena soje tijekom skladištenja. Disertacija, Poljoprivredni fakultet Osijek. Str. 173.

Arif, M., Jan, M.T., Khan, N.U., Khan, A., Khan, M.J., Munir, I. (2010.): Effect of seed priming on growth parameters of soybean. Journal of Botany. 42(4): 2803-2812.

Arora, A., Sairam, R.K., Srivastava, G.C. (2002.): Oxidative stress and antioxidative system in plants. Current science. 82(10): 1227-1238.

Asada, K. (1994.): Production and action of active oxygen species in photosynthetic tissues. In: Causes of photooxidative stress and amelioration of defense systems in plants. Foyer, C.H., Mullineaux, P.M. (Eds.). Boca Raton, FL: CRC Press. 77-104.

Ashraf, M. (2010.): Inducing drought tolerance in plants: recent advances. Biotechnology advances. 28(1): 169-183.

Ashraf, M., Foolad, M.R. (2007.): Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. Environmental and Experimental Botany. 59(2): 206-216.

Ashraf, M., Harris, P.J.C. (2004.): Potential biochemical indicators of salinity tolerance in plants. Plant Science. 166(1): 3-16.

Atienza, S.G., Faccioli, P., Perrotta, G., Dalfino, G., Zschiesche, W., Humbeck, K., Stanca, A.M., Cattivelli, L. (2004.): Large scale analysis of transcripts abundance in barley subjected to several single and combined abiotic stress conditions. Plant Science. 167(6): 1359-1365.

Azevedo, R.A., Lea, P.J. (2001.): Research on abiotic and biotic stress – what next? Annals of Applied Biology. 159(3): 317-319.

B Bailly, C., El-Maarouf-Bouteau, H., Corbineau, F. (2008.): From intracellular signaling networks to cell death: the dual role of reactive oxygen species in seed physiology. Comptes rendus biologies. 331(10): 806-814.

Balestrasse, K.B., Tomaro, M.L. Batlle, A., Noriega, G.O. (2010.): The role of 5-aminolevulinic acid in the response to cold stress in soybean plants. Phytochemistry. 71(17-18): 2038-2045.

Bates, L.S., Waldern, R.P., Teare, I.D. (1973.): Rapid determination of free proline for water stress studies. Plant and Soil. 39(1): 205-207.

Bellaloui, N. (2012.): Soybean seed phenol, lignin, and isoflavones and sugars composition altered by foliar boron application in soybean under water stress. Food and Nutrition Sciences. 3(4): 579-590.

Ben-Hayyim, G. (1987.): Relationship between salt tolerance and resistance to polyethylene glycol-induced water stress in cultured citrus cells. Plant Physiology. 85(2): 430-433.

Bhattacharjee, S. (2005.): Reactive oxygen species and oxidative burst: roles in stress, senescence and signal transduction in plants. Current Science. 89: 1113-1121.

Blanco, F.F., Folegatti, M.V., Gheyi, H.R., Fernandes, P.D. (2007.): Emergence and growth of corn and soybean under saline stress. Scientia Agricola, Piracicaba, Brazil. 64(5): 451-459.

Blokhina, O. (2000.): Anoxia and oxidative stress: Lipid peroxidation, antioxidant status and mitochondrial functions in plants. Academic dissertation, Faculty of Science, University of Helsinki. 79 str.

Bohnert, H.J., Gong, Q., Li, P., Ma, S. (2006.): Unraveling abiotic stress tolerance mechanisms - getting genomics going. Current Opinion in Plant Biology. 9(2): 180-188.

Bohnert, H.J., Nelson, D.E., Jensen, R.G. (1995.): Adaptations to environmental stresses. The Plant Cell. 7(7): 1099-1111.

Botella M.A., Rosado, A., Bressan, R.A., Hasegawa, P.M. (2005.): Plant adaptive responses to salinity stress. In: Plant abiotic stress. Jenks, M.A., Hasegawa, P.M. (Eds.). Blackwell Publishing Ltd, Oxford, UK. 37-70.

Boyer J. (1982.): Plant productivity and the environment. Science. 218(4571): 443-448.

Bradford, M.M. (1976.): A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantites of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry. 72(1-2): 248-254.

Bray, E.A. (1997.): Plant responses to water deficit. Trends in Plant Science. 2(2): 48-54.

Brugière, N., Dubois, F., Limami, A., Lelandais, M., Roux, Y., Sangwan, R., Hirel, B. (1999): Glutamine synthetase in the phloem plays a major role in controlling proline production. The Plant Cell. 11(10): 1995-2012.

Burke, J.J. (1998.): Characterization of acquired thermotolerance in soybean seedlings. Plant Physiology and Biochemistry. 36(8): 601-607.

Burton, J.W. (1997.): Soyabean (*Glycine max* (L.) Merr.). Field Crops Research. 53(1): 171-186.

Butler, W.L. (1978.): Energy distribution in the photochemical apparatus of photosynthesis. Annual Review of Plant Physiology. 29: 345-378.

C Cakmak, I. (2000.): Tansley review No. 111; Possible roles of zinc in protecting plant cells from damage by reactive oxygen species. New Phytologist. 146(2): 185-205.

Campestre, M.P., Bordenave, C.D., Origone, A.C., Menendez, A.B., Ruiz, O.A., Rodriguez, A.A., Maiale, S.J. (2011.): Polyamine catabolism is involved in response to salt stress in soybean hypocotyls. Journal of Plant Physiology. 168(11): 1234-1240.

Chen, T.H.H., Murata, N. (2002.): Enhancement of tolerance of abiotic stress by metabolic engineering of betaines and other compatible solutes. Current Opinion in Plant Biology. 5(3): 250-257.

Cheng, L., Gao, X., Li, S., Shi, M., Javeed, H., Jing, X., Yang, G., He, G. (2010.): Proteomic analysis of soybean [*Glycine max* (L.) Meer.] seeds during imbibition at chilling temperature. Molecular Breeding. 26(1): 1-17.

Chinnusamy, V., Jagendorf, A., Zhu, J.K. (2005.): Understanding and improving salt tolerance in plants. Crop Science. 45(2): 437-448.

Chinnusamy, V., Zhu, J.K. (2003.): Plant salt tolerance. In: Plant responses to abiotic stress. Topics in Current Genetics. Hirt, H., Shinozaki, K. (Eds.). Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 4: 241-270.

Claussen, W. (2005.): Proline as a measure of stress in tomato plants. Plant Science. 168(1): 241-248.

Conklin, P.L. (2001.): Recent advances in the role and biosynthesis of ascorbic acid in plants**.** Plant, Cell and Environment. 24(4): 383-394.

D Dąbrowska, G., Kata, A., Goc, A., Szechyńska-Hebda, M., Skrzypek, E. (2007.): Characteristics of the plant ascorbate peroxidase family. Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica. 49(1): 7-17.

de Cruz, R.P., Sperotto, R.A., Cargnelutti, D., Adamski, J.M., de Freitas Terra, T., Fett, J.P. (2013.): Avoiding damage and achieving cold tolerance in rice plants. Food and Energy Security. 2(2): 96-119.

de Ronde, A., Cress, W.A., Krüger, G.H.J., Strasser, R.J., van Staden, J. (2004.): Photosynthetic response of transgenic soybean plants, containing an *Arabidopsis* P5CR gene, during heat and drought stress. Journal of Plant Physiology. 161(11): 1211-1224.

Dehghan, G., Rezazadeh, L., Habibi, G. (2011.): Exogenous ascorbate improves antioxidant defense system and induces salinity tolerance in soybean seedlings. Acta Biologica Szegediensis. 55(2): 261-264.

Delauney, A.J., Verma, D.P.S. (1993.): Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. The Plant Journal. 4(2): 215-223.

Dinler, B.S., Antoniou, C., Fotopoulos, V. (2014.): Interplay between GST and nitric oxide in the early response of soybean (*Glycine max* L.) plants to salinity stress. Journal of Plant Physiology. 171(18): 1740-1747.

Dobrá, J., Motyka, V., Dobrev, P., Malbeck, J., Prášil, I.T., Haisel, D., Gaudinová, A., Havlová, M., Gubiš, J., Vaňková, R. (2010.): Comparison of hormonal responses to heat, drought and combined stress in tobacco plants with elevated proline content. Journal of Plant Physiology. 167(16): 1360-1370.

Doğan, M. (2011.): Antioxidative and proline potentials as a protective mechanism in soybean plants under salinity stress. African Journal of Biotechnology. 10(32): 5972-5978.

Dolphin, D., Poulson, R., Avramovic, O. (1989.): Glutathione: chemical, biochemical and medical aspects. Cell biochemistry and function. Dolphin, D., Poulson, R., Avramovic, O. (Eds.). Wiley-Interscience: New York, Parts A and B.

Dong, Z., Shi, L., Wang, Y., Chen, L., Cai, Z., Wang, Y., Jin, J., Li, X. (2013.): Identification and dynamic regulation of microRNAs involved in salt stress responses in functional soybean nodules by high-throughput sequencing. International Journal of Molecular Sciences. 14(2): 2717-2738.

Duh, P.D., Du, P.C., Yen, G.C. (1999.): Action of methanolic extract of mung bean hulls as inhibitors of lipid peroxidation and non-lipid oxidative damage. Food and Chemical Toxicology, Elsevier Science Ltd. 37(11): 1055-1061.

E Essemine, J., Ammar, S., Bouzid, S. (2010.): Impact of heat stress on germination and growth in higher plants: Physiological, biochemical and molecular repercussions and mechanisms of defence. Journal of Biological Sciences. 10(6): 565-572.

Esterbauer, H., Schaur, R.J., Zollner, H. (1991.): Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. Free Radicals in Biology and Medicine. 11(1): 81-128.

F Fan, X.D., Wang, J.Q., Yang, N., Dong Y.Y., Liu, L., Wang F.W., Wang, N., Chen, H., Liu, W.C., Sun, Y.P., Wu, J.Y., Li, H.Y. (2013.): Gene expression profiling of soybean leaves and roots under salt, saline-alkali and drought stress by high-throughput Illumina sequencing. Gene. 512(2): 392-402.

Feierabend, J. (2005.): Catalases in plants: molecular and functional properties and role in stress defence. In: Antioxidants and reactive oxygen species in plants. Smirnoff, N. (Ed.). Blackwell Publishing Ltd. 101-140.

Fenta, B.A., Schlüter, U., Marquez Garcia, B., DuPlessis, M., Foyer, C.H., Kunert, K.J. (2011.): Identification and application of phenotypic and molecular markers for abiotic stress tolerance in soybean. In: Soybean - genetics and novel techniques for yield enhancement. Krezhova, D. (Ed.). InTech Europe, Rijeka, Croatia. 181-200.

Feussner, I., Kühn, H., Wasternack, C. (2001.): Lipoxygenase-dependent degradation of storage lipids. Trends in Plant Science. 6(6): 268-273.

Figueiredo, J.E.F., Cascardo, J.C.M., Carolino, S.M.B., Alvim, F.C., Fontes, E.P.B. (1997.): Water-stress regulation and molecular analysis of the soybean BIP gene family**.** Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal. 9(2):103-110.

Filippou, P., Tanou, G., Molassiotis, A., Fotopoulos, V. (2013.): Chapter 1. Plant acclimation to environmental stress using priming agents. In: Plant Acclimation to Environmental Stress. Tuteja, N., Gill, S. (Eds.). Springer Science and Business Media New York. 1-27.

Flowers, T.J. (2003.): Improving crop salt tolerance. Journal of Experimental Botany. 55(396): 307-319.

Foyer, C.H. (1997.): Oxygen metabolism and electron transport in photosynthesis. In: The molecular biology of free radical scavenging systems. Scandalios, J. (Ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, NY. 587-621.

Foyer, C.H., Gomez, L.D., van Heerden, P.D.R. (2005.): Glutathione. In: Antioxidants and reactive oxygen species in plants. Smirnoff, N. (Ed.). Blackwell Publishing Ltd. 1-24.

Foyer, C.H., Lopez-Delgado, H., Dat, J.F., Scott, I.M. (1997.): Hydrogen peroxide- and glutathione associated mechanisms of acclimatory stress tolerance and signaling. Physiologia Plantarum. 100(2): 241-254.

Foyer, C.H., Noctor, G. (2000.): Tansley review No. 112; Oxygen processing in photosynthesis: regulation and signalling. New Phytologist. 146(3): 359-388.

Foyer, C.H., Vanacker, H., Gomez, L.D., Harbinson, J. (2002.): Regulation of photosynthesis and antioxidant metabolism in maize leaves at optimal and chilling temperatures: review. Plant Physiology and Biochemistry. 40(6-8): 659-668.

G Gamon, J.A., Pearcy, R.W. (1990.): Photoinhibition in *Vitis californica*. The role of temperature during high-light treatment. Plant Physiology. 92(2): 487-494.

Gass, T., Schori, A., Fossati, A., Soldati, A., Stamp, P. (1996.): Cold tolerance of soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) during the reproductive phase. European Journal of Agronomy. 5: 71-88.

Ghassemi-Golezani, K., Taifeh-Noori, M., (2011.): Soybean performance under salinity stress. In: Soybean - biochemistry, chemistry and physiology. Ng, T.B., (Ed.). InTech, Europe, Rijeka, Croatia. 631-642.

Ghiyasi, M., Tajbakhsh, M. (2013.): Osmopriming alleviates drought stress in soybean (*Glycine max* L.) seeds during germination and early growth stages. Journal of Applied Biological Sciences. 7(1): 35-41.

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.

Gorai, M., Neffati, M. (2007.): Germination responses of *Reaumuria vermiculata* to salinity and temperature. Annals of Applied Biology. 151(1): 53-59.

Grace, S.C. (2005.): Phenolics as antioxidants. In: Antioxidants and reactive oxygen species in plants. Smirnoff, N. (Ed.) Blackwell Publishing Ltd. 141-168.

Grassmann, J., Hippeli, S., Elstner, E.F. (2002.): Plant's defence and its benefits for animals and medicine: role of phenolics and terpenoids in avoiding oxygen stress. Plant Physiology and Biochemistry. 40(6-8): 471-478.

Grene, R. (2002.): Oxidative stress and acclimation mechanisms in plants. In: The Arabidopsis book. American Society of Plant Biologists. 1: e0036.

Groom, Q.J., Baker, N.R. (1992.): Analysis of light-induced depressions of photosynthesis in leaves of a wheat crop during the winter. Plant Physiology. 100(3): 1217-1223.

Grover, A., Sahi, C., Sanan, N., Grover, A. (1999.): Taming abiotic stresses in plants through genetic engineering: current strategies and perspective. Plant Science. 143(1): 101-111.

Gulen, H., Eris, A. (2004.): Effect of heat stress on peroxidase activity and total protein content in strawberry plants. Plant Science. 166: 739-744.

Guo, Y., Tan, J. (2015.): Recent advances in the application of chlorophyll a fluorescence from photosystem II. Photochemistry and Photopiology. 91: 1-14.

H Halliwell, B. (1996.): Commentary: Vitamin C: Antioxidant or prooxidant *in vivo*? Free Radical Research. 25(5): 439-454.

Hare, P.D., Cress, W.A. (1997.): Metabolic implications of stress-induced proline accumulation in plants. Plant Growth Regulation. 23: 535-553.

Hare, P.D., Cress, W.A., van Staden, J. (1998.): Dissecting the roles of osmolyte accumulation during stress. Plant, Cell and Environment. 21(6)**:** 535-553.

Hare, P.D., Cress, W.A., van Staden, J. (1999.): Proline synthesis and degradation: a model system for elucidating stress-related signal transduction. Journal of Experimental Botany. 50(333): 413-434.

Hasegawa, P.M., Bressan, R.A., Zhu, J.K., Bohnert, H.J. (2000.): Plant cellular and molecular responses to high salinity. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology. 51: 463-99.

Havaux, M. (1993.): Rapid photosynthetic adaptation to heat stress triggered in potato leaves by moderately elevated temperatures. Plant, Cell and Environment. 16(4): 461-467.

He, Y. (2008.): Plasticity of soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) root system development under mild water deficit. MSc thesis, Faculty of the Graduate School University of Missouri-Columbia. 24 str.

Heath, R.L., Packer, L. (1968.): Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. Archives of Biochemistry and Biophysics. 125(1): 189-198.

Hilal, M., Zenoff, A.M., Ponessa, G., Moreno, H., Massa, E.M. (1998.): Saline stress alters the temporal patterns of xylem differentiation and alternative oxidase expression in developing soybean roots. Plant Physiology. 117(2): 695-701.

Hiraga, S., Sasaki, K., Ito, H., Ohashi, Y., Matsui, H. (2001.): A large family of class III plant peroxidases. Plant Cell Physiology. 42(5): 462-468.

Holm, G. (1954.): Chlorophyll mutations in barley. Acta Agronomica Scandinavica. 4: 457-471.

Hosseini, M.K. (2000.): The response of soybean seeds to the stresses of semi-arid environments during germination and early seedling growth. PhD thesis, University of Aberdeen, UK.

Huner, N.P.A., Öquist, G., Sarhan, F. (1998.): Energy balance and cold acclimation to light and cold. Trends in Plant Science. 3(6): 224-230.

I Im, J.H., Lee, H., Kim, J., Kim, H.B., Seyoung, K., Kim, B.M., An, C.S. (2012.): A salt stress-activated mitogen-activated protein kinase in soybean is regulated by phosphatidic acid in early stages of the stress response. Journal of Plant Biology. 55(4): 303-309.

Iraki, N.M., Bressan, R.A., Hasegawa, P.M., Carpita, N.C. (1989.): Alteration of the physical and chemical structure of the primary cell wall of growth-limited plant cells adapted to osmotic stress. Plant Physiology. 91(1): 39-47.

Ishibashi, Y., Yamaguchi, H., Yuasa, T., Iwaya-Inoue, M., Arima, S., Zheng, S.-H. (2011.): Hydrogen peroxide spraying alleviates drought stress in soybean plants. Journal of Plant Physiology. 168(13): 1562-1567.

Ismail, A., Takeda, S., Nick, P. (2014.): Life and death under salt stress: same players, different timing? Journal of Experimental Botany. 65(12): 2963-2979.

J Janmohammadi, M., Dezfuli, P.M., Sharifzadeh F. (2008.): Seed invigoration techniques to improve germination and early growth of inbred line of maize under salinity and drought stress. General and Applied Plant Physiology. Special Issue 34(3-4): 215-226.

Jukić G., Čupić T., Marić S., Jukić R., Teodorović R. (2010.): Utjecaj agroekoloških uvjeta na prinos zrna soje. Sjemenarstvo. 27(3-4): 103-112.

K Kalaji, M.H., Schansker, G., Ladle, R.J., Goltsev, V., Bosa, K., Allakhverdiev, S.I., Brestic, M., Bussotti, F., Calatayud, A., Dąbrowski, P., Elsheery, N.I., Ferroni, L., Guidi, L., Hogewoning, S.W., Jajoo, A., Misra, A.N., Nebauer, S.G., Pancaldi, S., Penella, C., Poli, D.B., Pollastrini, M., Romanowska-Duda, Z.B., Rutkowska, B., Serôdi, J., Suresh, K., Szulc, W., Tambussi, E., Yanniccari, M.,

Zivcak, M. (2014.): Frequently asked questions about *in vivo* chlorophyll fluorescence: practical issues. Photosynthesis Research. 122(2): 121-58.

Kao, W.Y., Tsai, T.T., Tsai, H.C., Shih, C.N. (2005.): Response of three *Glycine* species to salt stress. Environmental and Experimental Botany. 56(1):120-125.

Kavi Kishor, P.B., Sangam, S., Amrutha, R.N., Sri Laxmi, P., Naidu, K.R., Rao, K.R.S.S., Rao, S., Reddy, K.J., Theriappan, P., Sreenivasulu, N. (2005.): Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: its implications in plant growth and abiotic stress tolerance. Current Science. 88(3): 424-438.

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

Khajeh-Hosseini, M., Powell, A.A., Bingham, I.J. (2003.): The interaction between salinity stress and seed vigour during germination of soyabean seeds. Seed Science and Technology. 31(3): 715-725.

Kobraei, S., Etminan, A., Mohammadi, R., Kobraee, S. (2011.): Effects of drought stress on yield and yield components of soybean. Annals of Biological Research. 2(5): 504-509.

Kocsy, G., Kobrehel, K., Szalai, G., Duviau, M.P., Buzás, Z., Galiba, G. (2004.): Abiotic stress-induced changes in glutathione and thioredoxin *h* levels in maize. Environmental and Experimental Botany. 52(2): 101-112.

Kocsy, G., Laurie, R., Szalai, G., Szilágyi, V., Simon-Sarkadi, L., Galiba, G., de Ronde, J.A. (2005.): Genetic manipulation of proline levels affects antioxidants in soybean subjected to simultaneous drought and heat stresses. Physiologia Plantarum. 124(2): 227-235.

Kocsy, G., Tóth, B., Berzy, T., Szalai, G., Jednákovits, A., Galiba, G. (2001.): Glutathione reductase activity and chilling tolerance are induced by a hydroxylamine derivative BRX-156 in maize and soybean. Plant Science. 160(5): 943-950.

Kokubun, M. (2004.): Mechanisms of flower abortion in water-stressed soybean. Proceedings of the VII World Soybean Research Conference, IV International Soybean Processing and Utilization Conference, III Congresso Brasileiro de Soja (Brazilian Soybean Congress), Foz do Iguassu, PR, Brazil, 29 February-5 March. 253-259.

Kondetti, P., Jawali, N., Apte, S.K., Ganpat Shitole, M. (2012.): Salt tolerance in Indian soybean (*Glycine max* (L.) Merill) varieties at germination and early seedling growth. Annals of Biological Research. 3(3): 1489-1498.

Kosturkova, G., Todorova, R., Sakthivelu, G., Devs, M.K., Akitha Giridhar, P., Rajasekaran, T., Ravishankar, G.A. (2008.): Response of bulgarian and indian soybean genotypes to drought and water deficiency in field and laboratory conditions. General and Applied Plant Physiology. 34(3-4): 239-250.

Kotak, S., Larkindale, J., Lee, U., von Koskull-Döring, P., Vierling, E., Scharf, K.D. (2007.): Complexity of the heat stress response in plants. Current Opinion in Plant Biology. 10(3): 310-316.

Kranner, I., Seal, C.E. (2013.): Salt stress, signalling and redox control in seeds. Functional Plant Biology. 40(9): 848-859.

L Lanna, A.C., Jose, I.C., Oliveira, M.G. de A., Barros, E.G., Moreira, M.A. (2005.): Effect of temperature on polyunsaturated fatty acid accumulation in soybean seeds. Brazilian Journal of Plant Physiology. 17(2): 213-222.

Larher, F., Leport, L., Petrivalsky, M., Chappart, M. (1993.): Effectors for the osmoinduced proline response in higher plants. Plant Physiology and Biochemistry. 31(6): 911-922.

Larkindale J., Mishkind, M., Vierling, E. (2005.): Plant responses to high temperature. In: Plant abiotic stress. Jenks, M.A., Hasegawa P.M. (Eds.). Blackwell Publishing Ltd, Oxford, UK. 100-144.

Lawlor, D.W. (2012.): Genetic engineering to improve plant performance under drought: physiological evaluations of achievements, limitations and possibilities. Journal of Experimental Botany. 64(1): 83-108.

Lea, P.J., Parry, M.A.J., Medrano, H. (2005.): Improving resistance to drought and salinity in plants. Annals of Applied Biology. 144(3): 249-250.

Li, P., Cheng, L., Gao, H., Jiang, C., Peng T., (2009.): Heterogeneous behaviour of PSII in soybean (*Glycine max*) leaves with identical PSII photochemistry efficiency under different high temperature treatments. Journal of Plant Physiology. 166(15): 1607-1615.

Lichtenthaler, H.K. (1996.): Vegetation stress: an introduction to the stress concept in plants. Journal of Plant Physiology. 148(1-2): 4-14.

Lisjak, M., Wilson, I.D., Civale, L., Hancock, J.T., Teklić, T. (2009.): Lipid peroxidation leveles in soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) seed parts as a consequence of imbibition stress. Poljoprivreda, Osijek. 15(2): 32-37.

Luo, Q., Yu, B., Liu, Y. (2005.): Differential sensitivity to chloride and sodium ions in seedlings of *Glycine max* and *G. soja* under NaCl stress. Journal of Plant Physiology. 162(9): 1003-1012.

M Ma, S., Gong Q., Bohnert, H.J. (2006.): Dissecting plant stress pathways. Journal of Experimental Botany; Special Issue: Plants and Salinity. 57(5): 1097-1107.

Ma, Y.H., Ma, F.W., Zhang, J.K., Li, M.J., Wang, Y.H., Liang, D. (2008.): Effects of high temperature on activities and gene expression of enzymes involved in ascorbate-glutathione cycle in apple leaves. Plant Science. 175(6): 761-766.

Machado Neto, N.B., Saturnino, S.M., Bomfim, D.C., Custódio, C.C. (2004.): Water stress induced by mannitol and sodium chloride in soybean cultivars. Brazilian Archives of Biology and Technology. 47(4): 521-529.

Mahajan, S., Tuteja, N. (2005): Cold, salinity and drought stresses: An overview. Archives of Biochemistry and Biophysics. 444(2): 139-158.

Makbul, S., Saruhan Güler, N., Durmuş, N., Güven, S. (2011.): Changes in anatomical and physiological parameters of soybean under drought stress. Turkish Journal of Botany. 35(4): 369-377.

Masoumi, H., Darvish, F., Daneshian, J., Nourmohammadi, G., Habibi, D. (2011.): Chemical and biochemical responses of soybean (*Glycine max* L.) cultivars to water deficit stress. Australian Journal of Crop Science. 5(5): 544-553.

Maxwell, K., Johnson, G.N. (2000): Chlorophyll fluorescence - a practical guide. Journal of Experimental Botany. 51(345): 659-668.

May, M.J. Vernoux, T., Leaver, C., van Montagu, M., Inzé, D, (1998.): Glutathione homeostasis in plants: implications for environmental sensing and plant development. Journal of Experimental Botany. 49(321): 649-667.

Melis, A. (1999.): Photosystem-II damage and repair cycle in chloroplast: What modulates the rate of photodamage *in vivo*? Trends in Plant Science. 4: 130-135.

Mhamdi, A., Queval, G., Chaouch, S., Vanderauwera, S., van Breusegem, F., Noctor, G. (2010.): Catalase function in plants: a focus on *Arabidopsis* mutants as stress-mimic models. Journal of Experimental Botany. 61(15): 4197-4220.

Michel, B.E., Kaufmann, M.R. (1973.): The osmotic potential of polyethylene glycol 6000. Plant Physiology. 51(5): 914-916.

Millar, A.H., Mittova, V., Kiddle, G., Heazlewood, J.L., Bartoli, C.G., Theodoulou, F.L., Foyer, C.H. (2003.): Control of ascorbate synthesis by respiration and its implications for stress responses. Plant Physiology. 133(2): 443-447.

Mittler, R. (2002.): Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. Trends in Plant Science. 7(9): 405-410.

Mittler, R. (2006.) Abiotic stress, the field environment and stress combination. Trends in Plant Science 11(1): 15-19.

Mittler, R., Poulos, T.L. (2005.): Ascorbate peroxidase. In: Antioxidants and reactive oxygen species in plants. Smirnoff, N. (Ed.). Blackwell Publishing Ltd. 87-100.

Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M., van Breusegem, F. (2004.): Reactive oxygen gene network of plants. Trends in Plant Science. 9(10): 490-498.

Moftah, A.H., Michel, B.E. (1987.): The effect of sodium chloride on solute potential and proline accumulation in soybean leaves. Plant Physiology. 83: 238-240.

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.

Mukherjee, S.P., Choudhuri, M.A. (1983.): Implications of water stress-induced changes in the levels of endogenous ascorbic acid and hydrogen peroxide in Vigna seedlings. Physiologia Plantarum. 58(2): 166-170.

Mundree, S.G., Baker, B., Mowla, S., Peters, S., Marais, S., Willigen, C.V., Govender, K., Maredza, A., Muyanga, S., Farrant, J.M., Thomson, J.A. **(**2002.): Physiological and molecular insights into drought tolerance. African Journal of Biotechnology. 1(2): 28-38.

Munns, R. (2002.): Comparative physiology of salt and water stress. Plant Cell and Environment. 25(2): 239-250.

Murchie, E.H., Lawson, T. (2013.): Chlorophyll fluorescence analysis: a guide to good practice and understanding some new applications. Journal of Experimental Botany. 64(13): 3983-3998.

N Nakano, Y., Asada, K. (1981.): Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. Plant and Cell Physiology. 22(5): 867-880.

Nanjo, T., Kobayashi, M., Yoshiba, Y., Kakubari, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K. (1999.): Antisense suppression of proline degradation improves tolerance to freezing and salinity in *Arabidopsis thaliana*. FEBS Letters. 461(3): 205-210.

Neumann, P.M. (2008.): Coping mechanisms for crop plants in drought-prone environments. Annals of Botany. 101(7): 901-907.

Neves-Borges, A.C., Guimarães-Dias, F., Cruz, F., Mesquita, R.O., Nepomuceno, A.L., Romano, E., Loureiro, M.E., Grossi-de-Sá, M. de F., Alves-Ferreira, M. (2012.): Expression pattern of drought stress marker genes in soybean roots under two water deficit systems. Genetics and Molecular Biology. 35(1 (suppl)): 212-221.

Noctor, G., Foyer, C.H. (1998.): Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. Annual Review of Plant Physiology and Molecular Biology. 49: 249-279.

Nouri, M.Z., Toorchi, M., Komatsu, S. (2011.): Proteomics approach for identifying abiotic stress responsive proteins in soybean. In: Soybean - Molecular Aspects of Breeding. Sudarić, A. (Ed.). ISBN: 978-953-307-240-1. InTech, Rijeka, Croatia. 187-214.

O Ohnishi, S., Miyoshi, T., Shirai, S. (2010.): Low temperature stress at different flower developmental stages affects pollen development, pollination, and pod set in soybean. Environmental and Experimental Botany. 69(1): 56–62.

Okçu, G., Kaya, M.D., Atak, M. (2005.): Effects of salt and drought stresses on germination and seedling growth of pea (*Pisum sativum* L.). Turkish Journal of Agriculture and Forestry. 29: 237-242.

Öquist, G., Wass, R. (1988.): A portable microprocessor operated instrument for measuring chlorophyll fluorescence kinetics in stress physiology. Physiologia Plantarum. 73(2): 211-217.

Ort, D.R. (2002.): Chilling-induced limitations on photosynthesis in warm climate plants: contrasting mechanisms. Environmental Control in Biology. 40: 7-18.

Osakabe, Y., Osakabe, K., Shinozaki, K., Tran L.S.P. (2014.): Response of plants to water stress. Frontiers in Plant Science. 5(86): 1-8.

P Parry, M.A.J., Flexas, J., Medrano, H. (2005.): Prospects for crop production under drought: research priorities and future directions. Annals of Applied Biology. 147(3): 211-226.

Passardi, F., Cosio, C., Penel, C., Dunand, C. (2005): Peroxidases have more functions than a Swiss army knife. Plant Cell Reports. 24(5): 255-265.

Pastori, G.M., Foyer, C.H. (2002.): Common components, networks, and pathways of cross-tolerance to stress. The central role of "redox" and abscisic acid-mediated controls. Plant Physiology. 129(2): 460-468.

Patanè, C., Saita, A., Sortino, O. (2013.): Comparative effects of salt and water stress on seed germination and early embryo growth in two cultivars of sweet sorghum. Journal of Agronomy and Crop Science. 199: 30-37.

Pathan, S., Lee, J.D., Shannon, J.G., Nguyen, H.T. (2007.): Recent advances in breeding for drought and salt stress tolerance in soybean. In: Advances in molecular breeding toward drought and salt tolerant crops. Jenks, M.A., Hasegawa, P.M., Jain, S.M. (Eds.). Springer Netherlands. 739-773.

Pellinen, R. (2001.): Hydrogen peroxide in inducible plant stress responses. Academic dissertation, Faculty of Science, University of Helsinki. 64 str.

Peñalosa-Barbero, A. (2004.): New signalling network in plant abiotic stress discovered through a genetic approach. Dissertation. Fakultät für Biologie der Albert-Ludwig-Universität Freiburg. 121 str.

Perrey, R., Hauser, M.T., Wink, M. (1989.): Cellular and subcellular localization of peroxidase isoenzymes in plants and cell suspension cultures from *Lupinus polyphyllus*. Zeitschrift für naturforschung C. 44c: 931-936.

Pevalek Kozlina, B. (2003.): Fiziologija bilja. Udžbenik Sveučilišta u Zagrebu, Profil International, Zagreb.

Phang, T.H., Li, M.W., Cheng, C.C., Wong, F.L., Chan, C., Lam, H.M. (2011.): Molecular responses to osmotic stresses in soybean. In: Soybean - Molecular Aspects of Breeding. Sudarić, A. (Ed.). ISBN: 978-953-307-240-1. InTech, Rijeka, Croatia. 215-240.

Piri, M., Mahdieh, M.B., Olfati, J.A., Peyvast, Gh. (2009.): Germination and seedling development of cucumber are enhanced by priming at low temperature. International Journal of Vegetable Science. 15(3): 285-292.

Posmyk, M.M., Bailly, C., Szafrańska, K., Janas, K.M., Corbineau, F. (2005.): Antioxidant enzymes and isoflavonoids in chilled soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) seedlings. Journal of Plant Physiology. 162(4): 403-12.

Posmyk, M.M., Janas, K.M. (2007.): Effects of seed hydropriming in presence of exogenous proline on chilling injury limitation in *Vigna radiata* L. seedlings. Acta Physiologiae Plantarum. 29(6):509-517.

Pucciariello, C., Banti, V., Perata, P. (2012.): ROS signaling as common element in low oxygen and heat stresses. Plant Physiology and Biochemistry. 59: 3-10.

Q Qin, F., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. (2011.): Achievements and challenges in understanding plant abiotic stress responses and tolerance. Plant Cell Physiology. 52(9): 1569-1582.

Queiroz, H.M., Sodek, L., Haddad, C.R.B. (2012.): Effect of salt on the growth and metabolism of *Glycine max*. Brazilian Archives of Biology and Technology. 55(6): 809-817.

R Ramana, G.V., Sweta Padma P., Chaitanya, K.V. (2012.): Differential responses of four soybean (*Glycine max* L.) cultivars to salinity stress. Legume Research. 35(3): 185-193.

Rasheed, R. (2009.): Salinity and extreme temperature effects on sprouting buds of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.): some histological and biochemical studies. PhD thesis. Faculty of sciences, University of agriculture, Faisalabad, Pakistan. 169 str.

Rathinasabapathi, B. (2000.): Metabolic engineering for stress tolerance: installing osmoprotectant synthesis pathways. Annals of Botany. 86(4): 709-716.

Reguera, M., Peleg, Z., Blumwald, E. (2012.): Targeting metabolic pathways for genetic engineering abiotic stress-tolerance in crops. Biochimica et Biophysica Acta. 1819(2): 186-194.

Reynolds, M.P., Mujeeb-Kazi, A., Sawkins, M. (2005.): Prospects for utilising plant-adaptive mechanisms to improve wheat and other crops in drought- and salinity-prone environments. Annals of Applied Biology. 146(2): 239-259.

Reynolds-Henne, C.E., Langenegger, A., Mani, J., Schenk, N., Zumsteg, A., Feller, U. (2010.): Interactions between temperature, drought and stomatal opening in legumes. Environmental and Experimental Botany. 68(1): 37-43.

Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Paganga, G. (1997.): Antioxidant properties of phenolic compounds. Trends in Plant Science. 2(4): 152-159.

Rivero, R.M., Ruiz, J.M., García, P.C., López-Lefebre, L.R., Sánchez, E., Romero, L. (2001.): Resistance to cold and heat stress: accumulation of phenolic compounds in tomato and watermelon plants. Plant Science. 160(2): 315–321.

Rizhsky, L., Hongjian, L., Mittler, R. (2002.): The combined effect of drought stress and heat shock on gene expression in tobacco. Plant Physiology. 130(3): 1143-1151.

Roskruge, C.L., Smith, M.T. (1997.): Peroxidative changes associated with chilling injury in soybean seeds during imbibition. Journal of Plant Physiology. 151(5): 620-626.

Rouhi, H.R., Abbasi Surki, A., Sharif-Zadeh, F., Tavakkol Afshari, R., Aboutalebian, M.A., Ahmadvand, G. (2011.): Study of different priming treatments on germination traits of soybean seed lots. Notulae Scientia Biologicae. 3(1): 101-108.

Ruelland, E., Zachowski, A. (2010.): How plants sense temperature. Environmental and Experimental Botany. 69(3): 225-232.

S Sadeghi, H., Khazaei, F., Yari, L., Sheidaei, S. (2011.): Effect of seed osmopriming on seed germination behavior and vigor of soybean (*Glycine max* L.). ARPN Journal of Agricultural and Biological Science. 6(1): 39-43.

Sairam, R.K., Veerabhadara Rao, K., Srivastava, G.C. (2002.): Differential response of wheat genotypes to long term salinity stress in relation to oxidative stress, antioxidant activity and osmolyte concentration. Plant Science. 163(5): 1037-1046.

Sakthivelu, M.K. Akitha Devi, P. Giridhar, T. Rajasekaran, G.A. Ravishankar, T. Nedev, G. Kosturkova (2008.): Drought-induced alterations in growth, osmotic potential and *in vitro* regeneration of soybean cultivars. General and Applied Plant Physiology. Special Issue, 34 (1-2): 103-112.

Serraj, R., Sinclair, T.R. (2002.): Osmolyte accumulation: can it really help increase crop yield under drought conditions? Plant, Cell and Environment. 25(2): 333-341.

Setter, T.L. (2012.): Analysis of constituents for phenotyping drought tolerance in crop improvement. Frontiers in physiology. 3: 180.

Shao, H.B., Chu, L.Y, Shao, M.A., Jaleel, C.A., Mi, H.M. (2008.): Higher plant antioxidants and redox signalling under environmental stresses. Comptes Rendus Biologies. 331(6): 433-441.

Shao, H.B., Guo, Q.J., Chu, L.Y., Zhao, X.N., Su, Z.L., Hu, Y.C., Cheng, J.F. (2007.): Understanding molecular mechanism of higher plant plasticity under abiotic stress. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 54(1): 37-45.

Sharma, P., Dubey, R.S. (2004.): Ascorbate peroxidase from rice seedlings: Properties of enzyme isoforms, effects of stresses and protective roles of osmolytes. Plant Science. 167(3): 541-550.

Shavrukov, Y. (2013.): Salt stress or salt shock: which genes are we studying? Journal of Experimental Botany. 64(1): 119-127.

Shehab, G.G, Ahmed, O.K., El-Beltagi, H.S. (2010.): Effects of various chemical agents for alleviation of drought stress in rice plants (*Oryza sativa* L.). Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca. 38(1): 139-148.

Shetty, K. (2003.): Role of proline-linked pentose phosphate pathway in biosynthesis of plant phenolics for functional food and environmental applications: a review. Process Biochemistry. 39(7): 789-803.

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.

Shulaev, V., Oliver, D.J. (2006.): Metabolic and proteomic markers for oxidative stress. New tools for reactive oxygen species research. Plant Physiology. 141(2): 367-372.

Siegel, B.Z., Galston, W. (1967.): The isoperoxidase of *Pisum sativum*. Plant Physiology. 42(2): 221-226.

Silvente, S., Sobolev, A.P., Lara, M. (2012.): Metabolite adjustment in drought tolerant and sensitive soybean genotypes in response to water stress. PLoS One 7(6): e38554.

Singleton, V.L., Rossi, J.A. (1965.): Colorimetry of total phenolics with phospho-molybdic-phosphotungistic acid reagents. American Journal of Enology and Viticulture. 16(3): 144-158.

Smillie, R.M., Nott, R. (1979.): Heat injury in leaves of alpine, temperate and tropical plants. Australian Journal of Plant Physiology. 6: 135-141.

Smirnoff, N. (2005.): Ascorbate, tocopherol and carotenoids: metabolism, pathway engineering and functions. In: Antioxidants and reactive oxygen species in plants. Smirnoff, N. (Ed.). Blackwell Publishing Ltd. 53-86.

Soccio, M., Laus, M.N., Spera, G.P., Trono, D., Pompa, M., Flagella, Z., Pastore, D. (2010.): Mitochondrial proline oxidation is affected by hyperosmotic stress in durum wheat seedlings. Annals of Applied Biology. 157(1): 1-11.

Stanisavljević, A., Lisjak, M., Vinković, T., Špoljarević, M., Karakaš, M., Teklić, T., Ćosić, T. (2009.): Prolin u listu jagode kao indikator solnog stresa. Proceedings of the 44th Croatian & 4th International Symposium on Agriculture. Lončarić, Z., Marić, S. (Ur.). Sveučilište J. J. Strossmayera, Poljoprivredni fakultet u Osijeku, Osijek. 94-98.

Stolf-Moreira, R., Lemos, E.G.M. Carareto-Alves, L., Marcondes, J., Pereira, S.S., Rolla, A.A.P., Pereira, R.M., Neumaier, N., Binneck, E., Abdelnoor, R.V., de Oliveira, M.C.N., Marcelino, F.C., Farias, J.R.B., Nepomuceno, A.L. (2011.): Transcriptional profiles of roots of different soybean genotypes subjected to drought stress. Plant Molecular Biology Reporter. 29(1): 19-34.

Stout, D.G., Simpson, G.M., Flotre, D.M. (1980.): Drought resistance of *Sorghum bicolor* L. Moench. 3. Seed germination under osmotic stress. Canadian Journal of Plant Science. 60(1): 13-24.

Strauss, A.J., Krüger, G.H.J., Strasser, R.J., van Heerden, P.D.R. (2006.): Ranking of dark chilling tolerance in soybean genotypes probed by the chlorophyll a fluorescence transient O-J-I-P. Environmental and Experimental Botany. 56: 147-157.

Sudarić A., Vratarić M., Duvnjak T., Klarić J. (2003.): Fenotipska stabilnost uroda zrna nekoliko OS kultivara soje. Poljoprivreda. 9(2): 5-11.

Sudarić, A., M. Vratarić, S. Mladenović Drinić, Z. Zdunić (2011): Genetic improvement: Molecular-based strategies. In: Soybean: Molecular Aspects of Breeding. Sudarić, A. (Ed.). InTech, Rijeka, Croatia. 57-80.

Sudarić, A., Vratarić, M. (2008): Značenje, dostignuća i trendovi u oplemenjivanju soje u Poljoprivrednom institutu Osijek. Sjemenarstvo. 25(3-4): 207-216.

Sun, H., Li, L., Wang, X., Wu, S., Wang, X., (2011.): Ascorbate-glutathione cycle of mitochondria in osmoprimed soybean cotyledons in response to imbibitional chilling injury. Journal of Plant Physiology. 168(3): 226-232.

Sung, D.Y., Kaplan, F., Lee, K.J. Guy, C.L. (2003.): Acquired tolerance to temperature extremes. Trends in Plant Science. 8(4): 179-187.

Swigonska, S., Weidner, S. (2013.): Proteomic analysis of response to long-term continuous stress in roots of germinating soybean seeds. Journal of Plant Physiology 170(5): 470-479.

Szabados, L., Savouré, A. (2010.): Proline: a multifunctional amino acid. Trends in Plant Science. 15(2): 89-97.

Szalai, G., Kellos, T., Galiba, G., Kocsy, G. (2009.): Glutathione as an antioxidant and regulatory molecule in plants under abiotic stress conditions. Journal of Plant Growth Regulation. 28(1): 66-80.

Špoljarević, M., Agić, D., Lisjak, M., Gumze, A., Wilson, I.D., Hancock, J.T., Teklić, T. (2011.): The relationship of proline content and metabolism on the productivity of maize plants. Plant Signaling and Behavior. 6(2): 251-257.

Takahama, U. (2004.): Oxidation of vacuolar and apoplastic phenolic substrates by peroxidase: physiological significance of the oxidation reactions. Phytochemistry Reviews. 3(1): 207-219.

Tambussi, E.A., Bartoli, C.G., Guiamet, J.J., Beltrano, J., Araus, J.L. (2004.) Oxidative stress and photodamage at low temperatures in soybean (*Glycine max* L. Merr.) leaves. Plant Science. 167(1): 19-26.

Tausz, M., Šircelj, H., Grill, D. (2004.): The glutathione system as a stress marker in plant ecophysiology: Is a stress-response concept valid? Journal of Experimental Botany. Sulphur Metabolism in Plants Special Issue. 55(404): 1955-1962.

Teklić, T., Vratarić, M., Sudarić, A., Kovačević, V., Vukadinović, V., Bertić, B. (2009.): Relationships among chloroplast pigments concentration and chlorophyllmeter readings in soybean under influence of foliar magnesium application. Communications in Soil Science and Plant Analysis. 40(1): 706-725.

Tester, M., Davenport, R. (2003.): Na^+ tolerance and Na^+ transport in higher plants. Annals of Botany. 91(5): 503-527.

Thakur, P., Kumar, S., Malik, J.A., Berger, J.D., Nayyar, H. (2010.): Cold stress effects on reproductive development in grain crops: an overview. Environmental and Experimental Botany. 67(3): 429-443.

Toorchi, M., Yukawa, K., Nouri, M.Z., Komatsu, S. (2009.): Proteomics approach for identifying osmotic-stress-related proteins in soybean roots. Peptides. 30(12): 2108-2117.

Tran, L.S.P. Mochida, K. (2010.): Identification and prediction of abiotic stress responsive transcription factors involved in abiotic stress signaling in soybean. Plant Signaling and Behavior. 5(3): 255-257.

Tuberosa, R. (2012.): Phenotyping for drought tolerance of crops in genomic era. Frontiers Physiology. 3: 347.

Türkan, I., Bor, M., Özdemir, F., Koca, H. (2005.): Differential responses of lipid peroxidation and antioxidants in the leaves of drought-tolerant *P. acutifolius* Gray and drought-sensitive *P. vulgaris* L. subjected to polyethylene glycol mediated water stress. Plant science. 168(1): 223-231.

U Ugela, C.V. (1998.): Oligoethers. In: Oligomer technology and applications, New York, USA: Marcel Dekker, inc. 249-263.

Umezawa, T., Fujita, M., Fujita, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K. (2006.): Engineering drought tolerance in plants: discovering and tailoring genes to unlock the future. Current Opinion in Biotechnology. 17(2): 113-122.

Urano, K., Kurihara, Y., Seki, M., Shinozaki, K. (2010.): 'Omics' analyses of regulatory networks in plant abiotic stress responses. Current Opinion of Plant Biology. 13(2): 132-138.

V van Heerden, P.D.R., Krüger, G.H.J. (2002.): Separately and simultaneously induced dark chilling and drought stress effects on photosynthesis, proline accumulation and antioxidant metabolism in soybean. Journal of Plant Physiology. 159(10): 1077-1086.

van Heerden, P.D.R., Krüger, G.H.J. (2004.): Dark chilling inhibition of photosynthesis and symbiotic nitrogen fixation in soybean during pod filling. Journal Plant Physiology. 161(5): 599-609.

Veljović-Jovanović, S., Noctor, G., Foyer, C.H. (2002.): Are leaf hydrogen peroxide concentrations commonly overestimated? The potential influence of artefactual interference by tissue phenols and ascorbate. Plant Physiology and Biochemistry. 40: 501-507.

Verslues, P.E., Agarwal, M., Katiyar-Agarwal, S., Zhu, J., Zhu, J.K. (2006.): Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status. The Plant Journal. 45(4): 523-539.

von Wettstein, D. (1957.): Chlorophyll-letale und der submikroskopische form-wechsel der plastiden. Experimental Cell Research. 12(3): 427-506.

Vranová, E., Inzé, D., van Breusegem, F. (2002.): Signal transduction during oxidative stress. Journal of Experimental Botany. 53(372): 1227-1236.

Vratarić, M., Sudarić, A. (2007.): Tehnologija proizvodnje soje. Poljoprivredni institut Osijek. Zvijezda d.d., Zagreb.

Vratarić, M., Sudarić, A. (2008.): Soja *Glycine max* (L.) Merr. Poljoprivredni institut Osijek.

Vratarić, M., Sudarić, A., Duvnjak, T., Šunjić, K. (2010.): Agronomska vrijednost novih vrlo ranih sorata soje. Sjemenarstvo. 27(1-2): 5-16.

Vu, J.C.V., Gesch, R.W., Pennanen, A.H., Hartwell Allen, Jr., L., Boote, K.J., Bowes, G. (2001.): Soybean photosynthesis, Rubisco, and carbohydrate enzymes function at supraoptimal temperatures in elevated CO_2. Journal of Plant Physiology. 158(3): 295-307.

W Wahid, A., Gelani, S., Ashraf, M., Foolad, M.R. (2007.): Heat tolerance in plants: an overview. Environmental and Experimental Botany. 61(3): 199-223.

Wang, L.J., Huang, W.D., Li, J.Y., Liu, Y.F., Shi, Y.L. (2004.): Peroxidation of membrane lipid and Ca^{2+} homeostasis in grape mesophyll cells during the process of cross-adaptation to temperature stresses. Plant Science. 167(1): 71-77.

Wang, W., Vinocur, B., Altman, A. (2003.): Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. Planta. 218(1): 1-14.

Wang, W.B., Kim, Y.H., Lee, H.S., Kim, K.Y., Deng, X.P., Kwak, S.S. (2009.): Analysis of antioxidant enzyme activity during germination of alfalfa under salt and drought stresses. Plant Physiology and Biochemistry. 47: 570-577.

Weisany, W., Sohrabi, Y., Heidari, G., Siosemardeh, A., Golezani, K.G. (2012.): Changes in antioxidant enzymes activity and plant performance by salinity stress and zinc application in soybean (*Glycine max* L.). Plant Omics Journal. 5: 60-67.

Willekens, H., Chamnongpol, S., Davey, M., Schraudner, M., Langebartels, C., van Montagu, M., Inzé, D., van Camp, W. (1997.): Catalase is a sink for H_2O_2 and is indispensable for stress defense in C_3 plants. EMBO Journal. 16: 4806-4816.

Wood, A.J. (2005.): Eco-physiological adaptations to limited water environments. In: Plant abiotic stress. Jenks, M.A., Hasegawa P.M. (Eds.). Blackwell Publishing Ltd, Oxford, UK. 1-13.

Wu, G., Zhang, C., Chu, L.Y., Shao, H.B. (2007.): Responses of higher plants to abiotic stresses and agricultural sustainable development. Journal of Plant Interactions. 2(3): 135-147.

X Xiong, L., Zhu, J.K. (2002.): Molecular and genetic aspects of plant responses to osmotic stress. Plant, Cell and Environment. 25(2): 131-139.

Xoconostle-Cázares, B., Ramirez-Ortega, F.A., Flores-Elenes, L. Ruiz-Medrano, R. (2010.): Drought tolerance in crop plants. American Journal of Plant Physiology. 5(5): 241-256.

Xu, X.Y., Fan, R., Zheng, R., Li, C.M., Yu, D.Y. (2011.): Proteomic analysis of seed germination under salt stress in soybeans. Journal of Zhejiang University Science. 12(7): 507-517.

Y Yu, Q., Rengel, Z. (1999.): Drought and salinity differentially influence activities of superoxide dismutases in narrow-leafed lupins. Plant Science. 142(1): 1-11.

Z Zahran, H.H., Sprent, J.I. (1986.): Effects of sodium chloride and polyethylene glycol on root-hair infection and nodulation of *Vicia faba* L. plants by *Rhizobium leguminosarum*. Planta. 167(3): 303-309.

Zancani, M., Nagy, G. (2000.): Phenol-dependent H_2O_2 breakdown by soybean root plasma membrane-bound peroxidase is regulated by ascorbate and thiols. Journal of Plant Physiology. 156: 295-299.

Zheng, G.H., Gao, Y.P., Wilen, R.W., Gusta, L.V. (1998.): Canola seed germination and seedling emergence from pre-hydrated and re-dried seeds subjected to salt and water stresses at low temperatures. Annals of Applied Biology. 132(2): 339-348.

Zhu, J.K. (2002.): Salt and drought stress signal transduction in plants. Annual Reviews in Plant Biology. 53: 247-273.

Zieliński, H. (2003.): Contribution of low molecular weight antioxidants to the antioxidant screen of germinated soybean seeds. Plant Foods for Human Nutrition. 58(3): 1-20.

9. SAŽETAK

Otpornost na stres je značajan preduvjet za uspješnu proizvodnju soje u sve zahtjevnijim agroekološkim uvjetima uslijed globalnih klimatskih promjena i antropogenog učinka na okoliš. Nove spoznaje o fiziološkim mehanizmima otpornosti, odnosno odgovoru kultivara soje na abiotski stres, neophodne su zbog postizanja bolje adaptabilnosti a samim time i produktivnosti budućih genotipova. Među najznačajnijim vrstama abiotskog stresa koji sve više ugrožavaju biljnu proizvodnju u cjelini, pa tako i proizvodnju soje, ističu se sušni, temperaturni i solni stres, koji su često međusobno povezani i mogu izazvati slična stanična oštećenja.

Ova doktorska disertacija ima za cilj doprinijeti boljem poznavanju genetski definiranih fizioloških mehanizama kojima se soja odupire navedenim stresnim uvjetima. S tom svrhom je provedeno istraživanje sa šest kultivara soje (Lucija, Korana, Vita, Ika, Tena i Zora) Poljoprivrednog instituta u Osijeku. U prvoj etapi istraživanja, primijenjeno je po dvije varijante sušnog (otopine PEG 5% i PEG 10%, na 20°C), solnog (otopine 50 i 100 mM NaCl, na 20°C) i temperaturnog stresa (10°C i 30°C, voda) tijekom 7 dana klijanja sjemena soje na papiru u klijalištu, uz kontrolu (voda, 20°C). Sve varijante pokusa su provedene u četiri ponavljanja. Osim postotka klijavosti na kraju tretmana, mase klijanca i hipokotila, analiziran je sadržaj vodikovog peroksida, prolina, fenola, intenzitet lipidne peroksidacije te ukupna i specifična aktivnost enzima askorbat-peroksidaze, katalaze, gvajakol-peroksidaze i glutation-reduktaze u hipokotilu. Rezultati pokazuju da su u fazi klijanje-nicanje (*VE*) najjači stresni učinak imali viša razina sušnog stresa (PEG 10%) te niska temperatura (10°C). Visoka temperatura je djelovala povoljno na razvoj klijanaca a blagi sušni stres (PEG 5%) je imao „*priming*“ efekt i povećao postotak klijavosti. Kultivar Korana, Vita i Lucija su imali visok sadržaj peroksida i prolina, uz visok intenzitet lipidne peroksidacije, dok je kod kultivara Zora, Tena i Ika gotovo u pravilu nizak sadržaj peroksida praćen manjom akumulacijom prolina i manjim intenzitetom lipidne peroksidacije. Razlike među kultivarima su se isticale i u enzimskim pokazateljima. Tena je u prosjeku svih tretmana imala niži postotak klijavosti od Zore, manju masu hipokotila i srednju aktivnost askorbat-peroksidaze i katalaze. Kultivar Zora je uz veću klijavost i srednju masu hipokotila, pokazao visoku aktivnost askorbat-peroksidaze i katalaze. Ova dva kultivara su u drugoj etapi istraživanja uzgojena u posudama s tlom na otvorenom do faze cvatnje (R_2), nakon čega su izloženi različitoj temperaturi (30°C, 10°C i 20°C kao kontrola)

tijekom tri dana u klima komori. U listu soje su analizirani sadržaji fotosintetskih pigmenata i pokazatelji učinkovitosti fotosinteze, te svi prethodno navedeni fiziološki pokazatelji reakcije biljke na stres. Visoka temperatura je u listu soje značajno stimulirala akumulaciju vodikovog peroksida, prolina, ukupnih fenola kao i aktivnosti svih analiziranih antioksidativnih enzima, osim ukupne aktivnosti glutation-reduktaze. S obzirom da je kultivar Tena pokazao manju varijabilnost ispitivanih morfoloških i fizioloških svojstava, pretpostavlja se da je prema otpornosti na temperaturni stres u fazi cvatnje stabilniji genotip od Zore, što bi trebalo ispitati i u poljskim uvjetima. Statistički vrlo značajan utjecaj tretmana u obje razvojne faze soje na analizirane pokazatelje, potvrđuje da su primijenjeni tretmani izazvali oksidacijski stres i obrambene reakcije soje na molekularnoj razini. U cjelini, ukupne aktivnosti ispitivanih enzima su bile veće u klijanju na 10°C a u cvatnji na 30°C, što sugerira različitost stresnog efekta ambijentalne temperature ovisno o fazi razvoja biljke soje. Značajne pozitivne korelacije između sadržaja prolina i ukupne aktivnosti askorbat-peroksidaze u obje razvojne faze upućuju na moguću metaboličku povezanost ova dva mehanizma obrane od toplinskog stresa.

10. SUMMARY

Stress resistance is an important pre-condition of successful soybean production in demanding agroecological conditions which exist due to global climate changes and anthropogenic influence on the environment. New knowledge of physiological resistance mechanisms within soybean cultivars' response to abiotic stress are needed because of better adaptability achievement and future genotypes' productivity. Among the most important types of abiotic stress which jeopardise plant production in general, including soybean growing, drought, temperature and salt stress stand out, and they are frequently interconnected and may generate similar cellular damages.

This PhD dissertation aimed to contribute to better knowledge on genetically defined physiological mechanisms which soybean activates in order to resist to the above mentioned stress conditions. For this purpose the research was performed using six cultivars (Lucija, Korana, Vita, Ika, Tena i Zora) created at the Agricultural institute in Osijek. Within the first phase of the research, two levels of drought (5% and 10% PEG solutions), salt (50 and 100 mM NaCl solutions) and temperature stress (10°C and 30°C, water) were applied through a 7 day germination period in paper rolls in a germinator, including control treatment (water, 20°C). All the experimental variants were set in four repetitions. Beside the evaluation of the seed germinability (%) at the end of the treatment, seedling and hypocotyl masses, the content of hydrogen peroxide, proline, phenols, the lipid peroxidation rate were determined, as well as total and specific activity od of ascorbate peroxidase, calatase, guaiacol peroxidae and glutathione reductase in hypocotyl tissue were analysed. The results show that the highest stress effect in the germination - emergence stage (*VE*) had a higher level of drought stress (10% PEG) and low temperature (10°C). High temperature (30°C) was favourable for seedling development and mild drought stress (5% PEG) have had "priming" effect and increased germination rate. Cultivars Korana, Vita and Lucija showed high peroxide and proline content, with high level of lipid peroxidation rate, whereas the cultivars Zora, Tena and Ika almost as a rule had lower peroxide content followed with lower proline accumulation and lipid peroxidation rate. Cultivar differences were established as well regarding the enzymatic parameters. In average of all treatments, Tena had lower germinability then Zora, low hypocotyl mass and medium activity of ascorbate peroxidase and catalase. Cultivar Zora had higher germinability and medium hypocotyl mass, however high ascorbate peroxidase and

catalase activities. In the second phase of the research, these two cultivars were grown in the pots, filled with soil and kept in the open until flowering stage (R_2), and afterwards exposed to different temperature conditions (30°C, 10°C i 20°C as control treatment) during 3 days in climate chamber. The contents of photosynthetic pigments, photosynthesis efficiency parameters and all the aforementioned physiological indicators of plant response to stress were determined in the most developed trifoliate leaf. High temperature significantly stimulated the accumulation of hydrogen peroxide, proline, total phenols, as well as the activities of all tested enzymes in the leaf, except for total activity of glutathione reductase. Considering that cultivar Tena showed less variability in the examined morphological and physiological traits, it can be assumed that is more stabile than cultivar Zora considering the resistance to temperature stress in flowering stage, which should be investigated in the field conditions as well. Statistically, the very significant treatment influence on the analysed parameters in the both growth stages, confirms that the applied treatments invoked the oxidative stress and defence reactions in soybean at molecular level. In general, the total activities of tested enzymes were higher in the germination stage at 10°C, and in the flowering stage at 30°C, what suggests diversity of stress effects of ambient temperature depending on growth stage in soybean. Significant positive correlations between proline content and total activity of ascorbate peroxidase in both growth stages indicate possible metabolic connections of these two mechanisms of heat stress defence.

11. PRILOG

11.1. Popis tablica

Tablica 4.1. Rezultati iz izvješća o kakvoći sjemena poljoprivrednog bilja

Tablica 4.2. Tretmani primijenjeni prilikom postavljanja eksperimenta u fazi klijanje-nicanje

Tablica 4.3. Rezultati analize tla

Tablica 5.1. Značajnost utjecaja kultivara i tretmana na pokazatelje morfoloških svojstava klijanca soje

Tablica 5.2. Značajnost utjecaja kultivara i tretmana na postotak klijavosti sjemena soje

Tablica 5.3. Značajnost utjecaja kultivara i tretmana na prosječnu masu klijanca soje

Tablica 5.4. Značajnost utjecaja kultivara i tretmana na prosječnu masu hipokotila klijanca soje

Tablica 5.5. Značajnost utjecaja kultivara i tretmana na pokazatelje fizioloških svojstava (H_2O_2 = sadržaj vodikovog peroksida; LP = intenzitet lipidne peroksidacije; Prolin = sadržaj slobodnog prolina; Fenoli = sadržaj ukupnih fenola) u tkivu hipokotila klijanaca soje.

Tablica 5.6. Značajnost utjecaja kultivara i tretmana na sadržaj vodikovog peroksida u tkivu hipokotila klijanaca soje

Tablica 5.7. Značajnost utjecaja kultivara i tretmana na intenzitet lipidne peroksidacije u tkivu hipokotila klijanaca soje

Tablica 5.8. Značajnost utjecaja kultivara i tretmana na sadržaj slobodnog prolina u tkivu hipokotila klijanaca soje

Tablica 5.9. Značajnost utjecaja kultivara i tretmana na sadržaj ukupnih fenola u tkivu hipokotila klijanaca soje

Tablica 5.10. Značajnost utjecaja kultivara i tretmana na ukupnu (u) i specifičnu (s) aktivnost enzima askorbat-peroksidaze (APX), katalaze (CAT), gvajakol-peroksidaze (GPOX) i glutation reduktaze (GR) u tkivu hipokotila klijanaca soje

Tablica 5.11. Značajnost utjecaja kultivara i tretmana na ukupnu aktivnost enzima askorbat peroksidaze (APXu) u tkivu hipokotila klijanaca soje

Tablica 5.12. Značajnost utjecaja kultivara i tretmana na specifičnu aktivnost enzima askorbat peroksidaze (APXs) u tkivu hipokotila klijanaca soje

Tablica 5.13. Značajnost utjecaja kultivara i tretmana na ukupnu aktivnost enzima katalaze (CATu) u tkivu hipokotila klijanaca soje

Tablica 5.14. Značajnost utjecaja kultivara i tretmana na specifičnu aktivnost enzima katalaze (CATs) u tkivu hipokotila klijanaca soje

Tablica 5.15. Značajnost utjecaja kultivara i tretmana na ukupnu aktivnost enzima gvajakol peroksidaze (GPOXu) u tkivu hipokotila klijanaca soje

Tablica 5.16. Značajnost utjecaja kultivara i tretmana na specifičnu aktivnost enzima gvajakol peroksidaze (GPOXs) u tkivu hipokotila klijanaca soje

Tablica 5.17. Značajnost utjecaja kultivara i tretmana na ukupnu aktivnost enzima glutation reduktaze (GRu) u tkivu hipokotila klijanaca soje

Tablica 5.18. Značajnost utjecaja kultivara i tretmana na specifičnu aktivnost enzima glutation reduktaze (GRs) u tkivu hipokotila klijanaca soje

Tablica 5.19. Značajnost utjecaja kultivara i tretmana na pokazatelje morfoloških svojstava soje u fazi pune cvatnje

Tablica 5.20. Značajnost utjecaja kultivara i tretmana na masu listova po biljci i masu troliske

Tablica 5.21. Značajnost utjecaja kultivara i tretmana na sadržaj i omjere fotosintetskih pigmenata u listovima soje u fazi pune cvatnje

Tablica 5.22. Značajnost utjecaja kultivara i tretmana na pokazatelje fotosintetske aktivnosti PS II u intaktnim listovima soje u fazi pune cvatnje

Tablica 5.23. Značajnost utjecaja kultivara i tretmana na sadržaj klorofila a, b i a+b, sadržaj karotenoida te omjer klorofila a/b i klorofila a+b/karotenoida u listovima soje

Tablica 5.24. Značajnost utjecaja kultivara i tretmana na minimalnu razinu fluorescencije (F_0), maksimalnu razinu fluorescencije (Fm), varijabilnu fluorescenciju (Fv), poluvrijeme porasta ($t_{½}$), maksimalni kvantni prinos PS II (Fv/Fm), omjer varijabilne i početne fluorescencije (Fv/F_0) u intaktnim listovima soje

Tablica 5.25. Značajnost utjecaja kultivara i tretmana na pokazatelje fizioloških svojstava (H_2O_2 = sadržaj vodikovog peroksida; LP = intenzitet lipidne peroksidacije; Prolin = sadržaj slobodnog prolina; Fenoli = sadržaj ukupnih fenola) u tkivu lista soje

Tablica 5.26. Značajnost utjecaja kultivara i tretmana na sadržaj vodikovog peroksida (H_2O_2; nmol g^{-1} sv.t.), intenzitet lipidne peroksidacije (LP; nmol TBA g^{-1} sv.t.), sadržaj slobodnog prolina (prolin; μmol g^{-1} sv.t.) i sadržaj ukupnih fenola (fenoli; mg GA g^{-1} sv.t.) u tkivu listova soje

Tablica 5.27. Značajnost utjecaja kultivara i tretmana na ukupnu (u) i specifičnu (s) aktivnost enzima askorbat-peroksidaze (APX), katalaze (CAT), gvajakol-peroksidaze (GPOX) i glutation reduktaze (GR) u fazi pune cvatnje

Tablica 5.28. Značajnost utjecaja kultivara i tretmana na ukupnu (u) i specifičnu (s) aktivnost enzima askorbat-peroksidaze (APX), katalaze (CAT), gvajakol peroksidaze (GPOX) i glutation reduktaze (GR) u listovima soje

Tablica 5.29. Značajnost linearnih korelacija između ispitivanih pokazatelja u fenofazi klijanje-nicanje

Tablica 5.30. Značajnost linearnih korelacija između ispitivanih morfoloških i fizioloških pokazatelja reakcije soje na temperaturni stres u fenofazi pune cvatnje

Tablica 5.31. Značajnost linearnih korelacija između ispitivanih fotosintetskih pokazatelja u listu soje nakon izlaganja temperaturnom stresu u fenofazi pune cvatnje

11.2. Popis slika

Slika 1.1. Prikaz broja objavljenih publikacija o abiotskom stresu u biljkama citiranih u bazi Web of Science po godinama (1995. - 2015.), prema pretrazi u bazi na dan 10. veljače 2016.

Slika 4.1. Rolanje natopljenog filtar papira u kojem je posloženo sjeme soje

Slika 4.2. Naklijavanje sjemena soje u klima komori

Slika 4.3. Klijanci soje

Slika 4.4. Određivanje broja klijanaca soje

Slika 4.5. Uzgoj biljaka na otvorenom

Slika 4.6. Biljke soje u R_2 fenofazi

Slika 4.7. Biljke soje u klima komori

Slika 4.8. Mjerenje fluorescencije

Slika 5.1. Prosječna klijavost (%), za sve tretmane, kod šest kultivara soje

Slika 5.2. Prosječna klijavost (%), za sve kultivare, po tretmanima

Slika 5.3. Prosječna masa klijanca (g), za sve tretmane, kod šest kultivara soje

Slika 5.4. Prosječna masa klijanca (g), za sve kultivare, po tretmanima

Slika 5.5. Prosječna masa hipokotila (g), za sve tretmane, kod šest kultivara soje

Slika 5.6. Prosječna masa hipokotila (g), za sve kultivare, po tretmanima

Slika 5.7. Prosječan sadržaj vodikovog peroksida (H_2O_2; nmol g^{-1} sv.t.), za sve tretmane, u tkivu hipokotila klijanaca šest kultivara soje

Slika 5.8. Prosječan sadržaj vodikovog peroksida (H_2O_2; nmol g^{-1} sv.t.), za sve kultivare, po tretmanima, u tkivu hipokotila klijanaca

Slika 5.9. Prosječne vrijednosti intenziteta lipidne peroksidacije (LP; nmol TBA g^{-1} sv.t.), za sve tretmane, u tkivu hipokotila klijanaca šest kultivara soje

Slika 5.10. Prosječne vrijednosti intenziteta lipidne peroksidacije (LP; nmol TBA g^{-1} sv.t.), za sve kultivare, po tretmanima, u tkivu hipokotila klijanaca

Slika 5.11. Prosječan sadržaj slobodnog prolina (μmol g^{-1} sv.t.), za sve tretmane, u tkivu hipokotila klijanaca šest kultivara soje

Slika 5.12. Prosječan sadržaj slobodnog prolina (μmol g^{-1} sv.t.), za sve kultivare, po tretmanima, u tkivu hipokotila klijanaca

Slika 5.13. Prosječan sadržaj ukupnih fenola (mg GA g^{-1} sv.t.), za sve tretmane, u tkivu hipokotila klijanaca šest kultivara soje

Slika 5.14. Prosječan sadržaj ukupnih fenola (mg GA g^{-1} sv.t.), za sve kultivare, po tretmanima, u tkivu hipokotila klijanaca

Slika 5.15. Prosječna ukupna aktivnost askorbat-peroksidaze (APXu; μmol min^{-1} g^{-1} sv.t.), za sve tretmane, u tkivu hipokotila klijanaca šest kultivara soje

Slika 5.16. Prosječna specifična aktivnost askorbat-peroksidaze (APXs; μmol min^{-1} mg^{-1} prot.), za sve tretmane, u tkivu hipokotila klijanaca šest kultivara soje

Slika 5.17. Prosječna ukupna aktivnost askorbat-peroksidaze u tkivu hipokotila klijanaca (APXu; μmol min^{-1} g^{-1} sv.t.), za sve kultivare, po tretmanima

Slika 5.18. Prosječna specifična aktivnost askorbat-peroksidaze u tkivu hipokotila klijanaca (APXs; μmol min^{-1} mg^{-1} prot.), za sve kultivare, po tretmanima

Slika 5.19. Prosječna ukupna aktivnost katalaze (CATu; μmol min^{-1} g^{-1} sv.t.), za sve tretmane, u tkivu hipokotila klijanaca šest kultivara soje

Slika 5.20. Prosječna specifična aktivnost katalaze (CATs; μmol min^{-1} mg^{-1} prot.), za sve tretmane, u tkivu hipokotila klijanaca šest kultivara soje

Slika 5.21. Prosječna ukupna aktivnost katalaze u tkivu hipokotila klijanaca (CATu; μmol min^{-1} g^{-1} sv.t.), za sve kultivare, po primijenjenim tretmanima

Slika 5.22. Prosječna specifična aktivnost katalaze u tkivu hipokotila klijanaca (CATs; μmol min^{-1} mg^{-1} prot.), za sve kultivare, po primijenjenim tretmanima

Slika 5.23. Prosječna ukupna aktivnost gvajakol-peroksidaze (GPOXu; μmol min^{-1} g^{-1} sv.t.), za sve tretmane, u tkivu hipokotila klijanaca šest kultivara soje

Slika 5.24. Prosječna specifična aktivnost gvajakol-peroksidaze (GPOXs; μmol min^{-1} mg^{-1} prot.), za sve tretmane, u tkivu hipokotila klijanaca šest kultivara soje

Slika 5.25. Prosječna ukupna aktivnost gvajakol-peroksidaze u tkivu hipokotila klijanaca (GPOXu; μmol min^{-1} g^{-1} sv.t.), za sve kultivare, po tretmanima

Slika 5.26. Prosječna specifična aktivnost gvajakol-peroksidaze u tkivu hipokotila klijanaca (GPOXs; μmol min^{-1} mg^{-1} prot.), za sve kultivare, po tretmanima

Slika 5.27. Prosječna ukupna aktivnost glutation-reduktaze (GRu; μmol min^{-1} g^{-1} sv.t.), za sve tretmane, u tkivu hipokotila šest kultivara soje

Slika 5.28. Prosječna specifična aktivnost glutation-reduktaze (GRs; μmol min^{-1} mg^{-1} prot.), za sve tretmane, u tkivu hipokotila šest kultivara soje

Slika 5.29. Prosječna ukupna aktivnost glutation-reduktaze u tkivu hipokotila klijanaca (GRu; μmol min^{-1} g^{-1} sv.t.), za sve kultivare, po tretmanima

Slika 5.30. Prosječna specifična aktivnost glutation-reduktaze u tkivu hipokotila klijanaca (GRs; μmol min^{-1} mg^{-1} prot.), za sve kultivare, po tretmanima

Slika 5.31. Prosječna masa listova biljke (g), u prosjeku za dva kultivara soje, po tretmanima

Slika 5.32. Prosječna masa troliske (g), u prosjeku za dva kultivara soje, po tretmanima

Slika 5.33. Prosječan broj troliski po biljci, u prosjeku za dva kultivara soje, po tretmanima

Slika 5.34. Prosječan sadržaj klorofila a, klorofila b, klorofila a+b i karotenoida (mg g^{-1} sv.t.), u prosjeku za dva kultivara soje, po tretmanima

Slika 5.35. Omjer klorofila a/b i klorofila a+b/karotenoida, u prosjeku za dva kultivara soje, po tretmanima

Slika 5.36. Fotokemijski pokazatelji fotosustava II (Fm, Fv, F_0) u intaktnim listovima soje, u prosjeku za dva kultivara soje, po tretmanima

Slika 5.37. Fotokemijski pokazatelji fotosustava II (Fv/Fm, Fv/F_0) u intaktnim listovima soje, u prosjeku za dva kultivara soje, po tretmanima

Slika 5.38. Fotokemijski pokazatelj fotosustava II (t½), u prosjeku za dva kultivara soje, po tretmanima

Slika 5.39. Prosječan sadržaj vodikovog peroksida (H_2O_2; nmol g^{-1} sv.t.), u prosjeku za dva kultivara soje, po tretmanima

Slika 5.40. Prosječne vrijednosti intenziteta lipidne peroksidacije (LP; nmol TBA g^{-1} sv.t.), u prosjeku za dva kultivara soje, po tretmanima

Slika 5.41. Prosječan sadržaj slobodnog prolina (µmol g^{-1} sv.t.), u prosjeku za dva kultivara soje, po tretmanima

Slika 5.42. Prosječan sadržaj ukupnih fenola (mg GA g^{-1} sv.t.), u prosjeku za dva kultivara soje, po tretmanima

Slika 5.43. Prosječna ukupna aktivnost enzima askorbat-peroksidaze (APXu), katalaze (CATu), gvajakol-peroksidaze (GPOXu) i glutation-reduktaze (GRu) u listovima dva kultivara soje (µmol min^{-1} g^{-1} sv.t.), po tretmanima

Slika 5.44. Prosječna specifična aktivnost enzima askorbat-peroksidaze (APXs), katalaze (CATs), gvajakol-peroksidaze (GPOXs) i glutation-reduktaze (GRs) u listovima dva kultivara soje (µmol min^{-1} mg^{-1} prot.), po tretmanima

11.3. Popis korištenih kratica

AA - askorbinska kiselina (engl. Ascorbic Acid)
ANOVA - analiza varijance
APX - askorbat-peroksidaza (engl. Ascorbate Peroxidase)
BSA - albumin goveđeg seruma (engl. Bovine Serum Albumin)
BT - broj troliski po biljci
CAR - koncentracija karotenoida
CAT - katalaza (engl. Catalase)
dH_2O - destilirana voda
DHA - dehidroaskorbat
DNA - deoksiribonukleinska kiselina
EDTA - etilendiamintetraoctena kiselina
F_0 - minimalni intenzitet fluorescencije
Fm - maksimalna razina fluorescencije
Fv - varijabilna fluorescencija (Fm - F_0)
Fv/F_0 - omjer varijabilne i početne fluorescencije
Fv/Fm - maksimalni kvantni prinos fotosustava II
GA - galna kiselina; trihidroksibenzojeva kiselina
GPX -glutation-peroksidaza (engl. Glutathione Peroxidase)
GPOX - gvajakol-peroksidaza (engl. Guaiacol Peroxidase)
GR - glutation-reduktaza (engl. Glutathione Reductase)
GSH - glutation, reducirani oblik
GSSG - glutation, oksidirani oblik
HSCS - proteini toplinskog šoka koji nastaju u stanicama kao odgovor na stres (engl. Heat Shock Cognate Proteins)
KL - ukupna koncentracija klorofila (Klorofil a+b)
Kl a - koncentracija klorofil a
Kl a/b - omjer klorofila a i b
Kl b - koncentracija klorofil b
KL/CAR - omjer klorofila i karotenoida
KP - kalij-fosfatni pufer

LEA - proteini čija je koncentracija obilna u stadiju kasne embriogeneze (engl. Late Embryogenesis Abundant Proteins)

LP - intenzitet lipidne peroksidacije

LSD - test najmanje značajne razlike (engl. Least Significant Difference)

MDA - malondialdehid

MDHAR - monodehidroaskorbat-reduktaza (engl. Monodehydroascorbate Reductase)

ML - masa listova po biljci

MT - masa troliske

$NADP^+$ - nikotinamid adenin dinukleotid fosfat, oksidirani

NADPH - nikotinamid adenin dinukleotid fosfat, reducirani

PEG - polietilenglikol

POD; POX - peroksidaze (engl. Peroxidase)

PRO - sadržaj slobodnog prolina

PS II - fotosustav II

PVPP - polivinil-polipirolidon

QTL - lokusi za određeno kvantitativno svojstvo (engl. Quantitative Trait Locus)

ROS - reaktivne kisikove jedinke (engl. Reactive Oxygen Species)

SAS - statistički program (engl. Statistical Analysis System)

SOD - superoksid-dismutaza (engl. Superoxide Dismutase)

t½ - poluvrijeme porasta od F_0 do Fm

TBA - tiobarbiturna kiselina

TBARS - reaktivne supstance tiobarbiturne kiseline (engl. Thiobarbituric Acid Reactive Substances)

TCA - trikloroctena kiselina

UF - sadržaj ukupnih fenola

UV - VIS - ultraljubičasti - vidljivi spektar

12. ŽIVOTOPIS

Marija Špoljarević rođena je 2. siječnja 1981. godine u Osijeku gdje je završila osnovnu školu i srednju Medicinsku školu. Nakon srednjoškolskog obrazovanja upisala je Pedagoški fakultet Sveučilišta u Osijeku, smjer biologija i kemija. Diplomirala je 2006. godine na Odjelu za biologiju Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, te stekla zvanje diplomiranog profesora biologije i kemije. Nakon završenog fakulteta radila je dvije godine kao nastavnica prirode, biologije i kemije u osnovnim školama, te kao suradnica u naslovnom zvanju asistenta na Odjelu za kemiju, Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku. Tijekom 2007./2008. i 2008./2009. akademske godine pristupnica je radila na modulu Agroekologija stručnog studija Hortikulture pri Veleučilištu u Slavonskom Brodu kao vanjski suradnik u naslovnom suradničkom zvanju asistenta. Od 2007. godine bila je zaposlena na Odjelu za biologiju u Osijeku kao stručni suradnik, a 2009. godine prelazi na Poljoprivredni fakultet u Osijeku na Zavod za agroekologiju gdje kao stručni suradnik, odnosno viši stručni suradnik radi i danas. Poslijediplomski doktorski studij, smjer „Oplemenjivanje bilja i sjemenarstvo“, pristupnica je upisala 2007. godine na Poljoprivrednom fakultetu u Osijeku.

Sudjelovala je u radu nekoliko projekata:

- u istraživačkom projektu MZOŠ-a „Zaštita voda Kopačkog rita - ekološke interakcije Dunava i poplavnog područja” od 2007. do 2009. godine voditeljice prof.dr.sc. Jasna Vidaković (285-0000000-2674)
- u istraživačkom projektu MZOŠ-a „Fiziološki mehanizmi otpornosti biljaka na abiotski stres” od 2009. do 2012. godine voditeljice prof.dr.sc. Tihana Teklić (079-0790494-0559)
- na međunarodnom bilateralnom projektu (Hrvatska - Srbija; 2011. - 2012.) „Istraživanje mehanizama otpornosti biljaka na abiotski stres”.

Tijekom 2012. godine boravila je kao gost istraživač u laboratoriju Zavoda za primijenjena istraživanja na University of the West of England (Bristol, UK) pod mentorstvom prof.dr.sc. Johna Hancocka i prof.dr.sc. Iana Wilsona.

Marija Špoljarević je kao autorica i koautorica objavila dva gimnazijska udžbenika i jednu radnu bilježnicu iz biologije, jedan metodički priručnik iz biologije za gimnazijske nastavnike, te pet a1, šest a2 i šest a3 rada. Član je Hrvatskog tloznanstvenog društva.