

Utjecaj različite razine vode i gnojidbe s fosforom na antioksidativni metabolizam hrasta kitnjaka

Balenović, Maja

Undergraduate thesis / Završni rad

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:825529>

Rights / Prava: [Attribution-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-03**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Sveučilišni prijediplomski studij Biotehnologija

Maja Balenović
0058218427

**UTJECAJ RAZLIČITE RAZINE VODE I GNOJIDBE S
FOSFOROM NA ANTIOKSIDATIVNI
METABOLIZAM HRASTA KITNJAKA**

ZAVRŠNI RAD

Naziv znanstveno-istraživačkog ili stručnog projekta: IP-2020-02 Fenotipski odgovor provenijencija obične bukve i hrasta kitnjaka na dugotrajnu sušu u interakciji s različitom koncentracijom fosfora u tlu

Mentor: dr. sc. Manuela Panić

Zagreb, 2023.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Sveučilišni prijediplomski studij Biotehnologija

Zavod za biokemijsko inženjerstvo
Laboratorij za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

Utjecaj različite razine vode i gnojidbe s fosforom na antioksidativni metabolizam hrasta kitnjaka

Maja Balenović, 0058218427

Sažetak:

Cilj ovog rada bio je utvrditi reakciju biljke na stres izazvan dugotrajnim sušnim razdobljem te utjecajem povećane gnojidbe fosforom na antioksidativni mehanizam hrasta (*Quercus petraea*), praćenjem stupnja lipidne peroksidacije i koncentracije vodikovog peroksida (H_2O_2) u uzorcima lista hrasta. Nadalje, kako bi se odredio utjecaj fosfora i tretmana vode, mjerene su i aktivnosti antioksidativnih enzima (superoksid dismutaze (SOD), nespecifičnih peroksidaza (POD), katalaze (CAT) i askorbat-peroksidaze (APOX)), koji sudjeluju u zaštiti biljaka od oksidativnog stresa u uzorcima lista hrasta. Zaključak istraživanja ukazuje na kompleksan utjecaj količine fosfora, količine vode i aktivnosti antioksidativnih enzima na oksidativni stres i peroksidaciju lipida u hrastovim uzorcima, što pruža važne uvide u mehanizme obrane biljaka u stresnim uvjetima.

Ključne riječi: antioksidativni enzimi, fosfor, hrast, oksidativni stres, voda

Rad sadrži: 24 stranice, 8 slika, 2 tablice, 25 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: dr. sc. Manuela Panić

Pomoć pri izradi: mag.ing., Martina Bagović

Datum obrane: 14. rujan 2023.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Undergraduate thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
University undergraduate study Biotechnology

Department of Biochemical Engineering
Laboratory for Cell Culture Technology and Biotransformations

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Biotechnology

**Effect of Different Water Levels and Phosphorus Fertilization on the Antioxidative Metabolism
of Pedunculate Oak**

Maja Balenović, 0058218427

Abstract:

The aim of this study was to determine the plant's response to stress induced by prolonged drought conditions and the impact of increased phosphorus fertilization on the oak tree's (*Quercus petraea*) antioxidative mechanism by monitoring the degree of lipid peroxidation and hydrogen peroxide (H₂O₂) concentration in oak leaf samples. Furthermore, to assess the influence of phosphorus and water treatment, the activities of antioxidative enzymes (superoxide dismutase (SOD), nonspecific peroxidases (POD), catalase (CAT), and ascorbate peroxidases (APOX)), which participate in plant protection against oxidative stress, were measured in oak leaf samples. The conclusion of the study indicates a complex interplay between phosphorus concentration, water quantity, and the activities of antioxidant enzymes in oak samples, impacting oxidative stress and lipid peroxidation. This provides valuable insights into plant defense mechanisms under stressful conditions.

Keywords: antioxidant enzymes, phosphorus, oak, oxidative stress, water

Thesis contains: 24 pages, 8 figures, 2 tables, 25 references

Original in: Croatian

Thesis is deposited in printed and electronic form in the Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: Manuela Panić, PhD

Technical support and assistance: Martina Bagović, mag.ing.

Thesis defended: September 14, 2023

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. UTJECAJ OKSIDATIVNOG STRESA NA BILJKE	2
2.2. REAKTIVNE KISIKOVE ČESTICE	3
2.3. ZAŠTITA OD OKSIDATIVNOG STRESA	4
2.4. UTJECAJ FOFORA NA ANTIOKSIDATIVNI METABOLIZAM BILJAKA.....	6
2.5. UTJECAJ VODE NA ANTIOKSIDATIVNI METABOLIZAM BILJAKA.....	7
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	8
3.1. MATERIJALI.....	8
3.1.1. BILJNI MATERIJAL ZA PROVOĐENJE EKSPERIMENTA.....	8
3.1.2. KEMIKALIJE.....	8
3.1.3. OPREMA	9
3.2. METODE	9
3.2.1. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE H ₂ O ₂ I LIPIDNE PEROKSIDACIJE	9
3.2.2. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE UKUPNIH TOPLJIVIH PROTEINA PO BRADFORDU I AKTIVNOSTI ANTIOKSIDATIVNIH ENZIMA.....	10
4. REZULTATI I RASPRAVA	13
5. ZAKLJUČCI.....	20
6. POPIS LITERATURE	21

1. UVOD

Onečišćenje zraka i klimatske promjene te složene interakcije između okolišnih parametara i same biljke mogu utjecati na zdravlje i produktivnost šuma (Proietti i sur., 2016). Na primjer, na šume može utjecati nedostatak nekih nutrijenata te promjene u učestalosti i intenzitetu klimatskih ekstrema (npr. toplinski valovi, oborine, oluje). Sve navedeno može utjecati na strukturu, sastav i funkcioniranje šumskih ekosustava. U takvim stresnim okolnostima vrlo bitnu ulogu ima i antioksidativni obrambeni mehanizam kako bi biljke mogle preživjeti u takvim uvjetima. Sam biokemijski odgovor biljke ovisit će o okolini u kojoj raste te o vanjskim izvorima stresa koji utječu na nju kao i o vrsti same biljke (Sharma i sur., 2012, Tariq i sur., 2017).

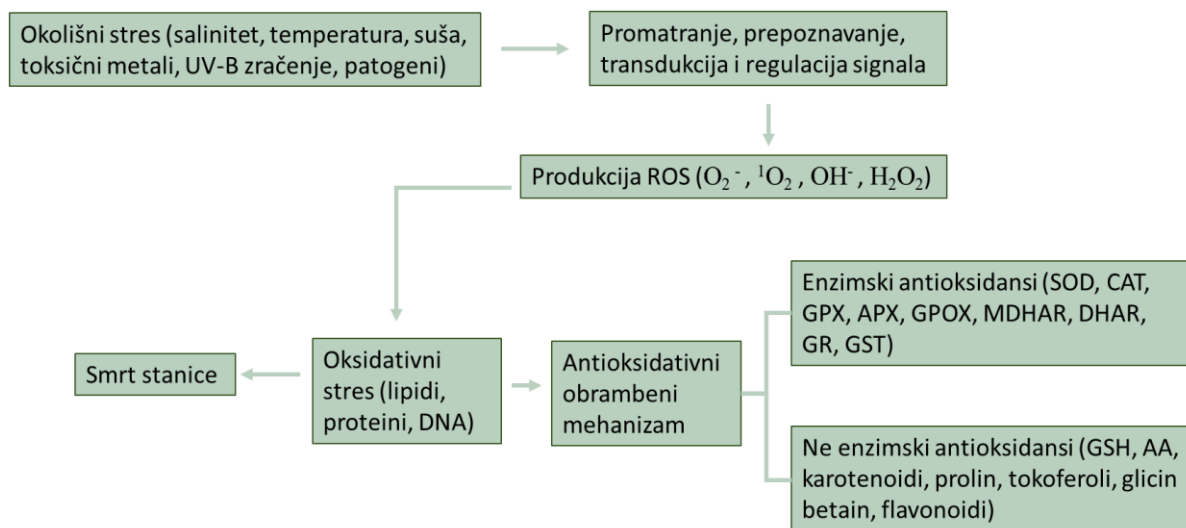
Jedan od glavnih okolišnih parametara koji mogu negativno utjecati na stanje šuma svakako je suša. Dehidracija stanica uzrokovana nedostatkom vode, uzrokuje pad turgorovog tlaka, povećava toksičnost iona i inhibira fotosintezu. Tijekom sušnog razdoblja biljke se prilagođavaju smanjenjem veličine listova i redistribucijom ugljika u korijenov sustav, što rezultira povećanom osutosti. Osim toga, biljke reguliraju gubitak vode zatvaranjem puči, što smanjuje unos CO₂ i posljedično utječe na fotosintezu i rast biljaka (Sharma i sur., 2012). Nadalje, manjak hranjivih tvari može uzrokovati nepravilni razvoj biljke te može biti i jedan od uzročnika abiotičkog stresa (Gill i Tuteja, 2010). Jedan od važnih nutrijenata je i fosfor koji je nužan za odvijanje niza staničnih procesa i kao takav je potreban za optimalan rast i razvoj biljaka (Vance i sur., 2003). Njegov nedostatak dovodi do povećanog nastajanja vodikovog peroksida, lipidne peroksidacije te smanjuje aktivnost antioksidativnih enzima (Kumar Tewari i sur., 2007).

Temeljem gore navedenog, cilj je ovog rada bio utvrditi reakciju biljke na stres izazvan dugotrajnim sušnim razdobljem te utjecaj povećane gnojidbe fosforom na antioksidativni mehanizam hrasta praćenjem stupanja lipidne peroksidacije i količine vodikovog peroksida (H₂O₂) u uzorcima lista hrasta. Nadalje, kako bi se odredio utjecaj fosfora i tretmana vode mjerene su i aktivnosti antioksidativnih enzima (superoksid dismutaze (SOD), nespecifičnih peroksidaza (POD), katalaze (CAT) i askorbat-peroksidaze (APOX)) koji sudjeluju u zaštiti biljaka od oksidativnog stresa u uzorcima lista hrasta.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Utjecaj oksidativnog stresa na biljke

S obzirom na rastući utjecaj klimatskih promjena, izazovi s kojima se biljke suočavaju prilikom prilagodbe na nove uvjete okoliša također se povećavaju (Matesanz i Valladares, 2014). Tijekom svojeg života, biljke su izložene raznim abiotičkim i biotičkim stresorima poput ozona, visokih temperatura, visokih koncentracija soli, suša, niskih temperatura, teškim metalima te UV zračenju (slika 1) koji negativno djeluju na produktivnost poljoprivrednih usjeva (Gull i sur., 2019). Povećana koncentracija ozona negativno utječe na rast biljaka, fotosintezu, cvjetanje te osjetljivost na štetnike i patogene. Povećanje temperatura može izazvati promjene u rastu, razvoju i fiziološkim procesima biljaka. Visoka temperatura može izazvati oksidativni stres te promjene u ekspresiji gena za zaštitu od toplinskog stresa. Visoke koncentracije soli mogu dovesti do ionske neravnoteže, oksidativnog stresa i toksičnosti za biljke. Osim toga, solnost tla može utjecati na fotosintezu i oksidativni stres. Nedostatak vode uzrokuje smanjenje rasta, zatvaranje stomata i smanjenje fiksacije CO₂, što dovodi do povećane proizvodnje reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) i oksidativnog stresa. Niske temperature mogu uzrokovati oksidativni stres, razgradnju klorofila i peroksidaciju lipida, što ograničava rast i razvoj biljaka. Visoka razina UV-B zračenja može inhibirati fotosintezu, smanjiti asimilaciju CO₂ i izazvati stanična oštećenja u biljkama (Sharma i sur., 2012).



Slika 1. Stres iz okoliša uzrokuje stvaranje ROS-a, antioksidativnu obranu i smrt stanica u biljci (Xie i sur., 2019)

2.2.Reaktivne kisikove čestice

Reaktivne kisikove čestice (eng. *Reactive Oxygen Species*, ROS) smatraju se grupom reaktivnih molekula i iona koji su nastali iz O_2 (Sharma i sur., 2012). ROS uključuje prirodne nusprodukte aerobnog načina života poput superoksidnog radikala ($O_2^{\cdot-}$), hidroksilnog radikala ($\cdot OH$) ili vodikovog peroksida (H_2O_2) koji se u biljkama stvaraju u različitim staničnim odjeljcima poput peroksisoma, kloroplasta, mitohondrija i plazminoj membrani (Xie i sur., 2019). U povišenim koncentracijama, svi su ROS-ovi štetni za biljke, a posebno kada njihova razina premaši obrambene mehanizme, tj. kada biljka uđe u stanje oksidativnog stresa (Sharma i sur., 2012).

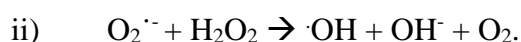
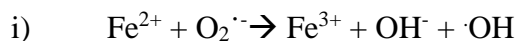
Povećana razina okolišnih stresora dovodi do poremećaja u proizvodnji reaktivnih kisikovih vrsta što ima negativan utjecaj na djelovanje antioksidansa. ROS u stanici izazva niz oštećenja, ima negativan utjecaj na lipide i proteine, dok npr. OH-ioni uništavanjem nukleinskih baza purina i pirimidina izravno oštećuju DNA. Kako bi se biljka obranila od takvih oštećenja, nužna je proizvodnja antioksidansa te uklanjanje reaktivnih kisikovih vrsta (Mehla i sur., 2017). Iako ROS imaju negativno djelovanje na stanicu, oni su također i sekundarni glasnici u nizu staničnih procesa. Jedan od takvih procesa je stvaranje tolerancije na stres iz okoliša (Sharma i sur., 2012).

Samo mali dio O_2 (oko 1 %) od onog kojeg biljke koriste sudjeluje u proizvodnji ROS-a jer je on u svojem osnovnom stanju bezopasna molekula sve dok ne dođe do njegove aktivacije. Do aktivacije O_2 može doći ako se apsorbira dovoljna energija da bi se preokrenuo spin na jednom od dva kisikova nesparena elektrona ili reakcijom stupnjevite monovalentne redukcije. Takav aktivirani 1O_2 može sudjelovati u reakcijama s organiskim molekulama. Zbog zatvaranja stomata, prisutna je ograničena količina CO_2 što pogoduje stvaranju 1O_2 . 1O_2 možemo prigušiti s β -karotenom ili α -tokoferolom (Sharma i sur., 2012).

Kada $O_2^{\cdot-}$ prihvati jedan elektron i dva protona dolazi do nastanka H_2O_2 . H_2O_2 se u stanicama stvara u normalnim i stresnim uvjetima, ali se također u biljnim stanicama stvara putem lanca prijenosa elektrona kloroplasta, mitohondrija, endoplazmatskog retikuluma i plazmine membrane, reakcijama β -oksidacije masnih kiselina, fotorespiracijom i fotooksidacijom. Za razliku od drugih kisikovih radikala, H_2O_2 nema nesparene elektrone i zbog toga može lako

proći kroz membranu i uzrokovati oksidativno oštećenje na mjestu udaljenom od mjesta njegova nastanka. U visokim koncentracijama može provesti reakcije oksidacije cisteinskih (-SH) ili metioninskih (-SCH₃) ostataka. Oksidacijom tiolne skupine može dovesti do inaktivacije enzima Calvinovog ciklusa (Sharma i sur., 2012).

O₂^{·-} i H₂O₂ su umjereno reaktivni, tek njihovim prevrtanjem u reaktivnije vrste uzrokuju oštećenje stanice s reaktivnim kisikovim vrstama. Haber-Weiss reakcija prikazuje generiranje ·OH iz O₂^{·-} i H₂O₂, a sastoji se od dviju reakcija:



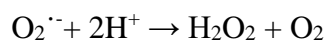
Budući da je brzina nekatalizirane reakcije zanemariva, za ovu je reakciju neophodna metalna kataliza (Sharma i sur., 2012).

Od svih ROS-a, ·OH je najreaktivniji jer može stupiti u interakciju sa svim biološkim molekulama u stanici što uzrokuje peroksidaciju lipida, oštećenje proteina i razaranje membrane. Takva stanična oštećenja mogu dovesti do smrti stanice budući da biljne stanice nemaju enzimski mehanizam za eliminaciju ·OH. ·OH ima jedan nespareni elektron pa može reagirati s kisikom u tripletnom stanju (Sharma i sur., 2012).

2.3. Zaštita od oksidativnog stresa

Antioksidativni obrambeni sustav u biljaka je složen, a sastoji se od neenzimskih i enzimskih komponenti. U organelama poput kloroplasta, mitohondrija i peroksisoma nalaze se specifični sustavi za uklanjanje ROS-a. Enzimске komponente antioksidativnog sustava sastoje se od antioksidativnih enzima poput superoksid dismutaze, katalaze, peroksidaze, askorbat peroksidaze, glutation reduktaze i dr. Neenzimske komponente antioksidativnog sustava sastoje se od glavnih staničnih redoks pufera askorbat (AsA) i glutation (GSH), tokoferola, karotenoida i fenolnih spojeva (Sharma i sur., 2012).

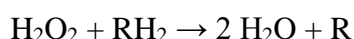
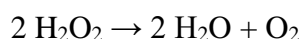
Superoksid dismutaza (SOD) je ključni enzim u obrani od oksidativnog stresa kod svih organizama koji dišu zrak. Ovaj enzim, koji pripada grupi metaloenzima, igra važnu ulogu u pretvaranju superoksidnih radikala (O₂^{·-}) u vodikov peroksid i kisik. Aktivnost SOD-a raste u biljkama koje su izložene raznim okolišnim stresorima, kao što su suša ili toksičnost metala. Povećana aktivnost SOD-a često je povezana s većom otpornošću biljaka na stres iz okoliša (Sharma i sur., 2012).



Ovom reakcijom se smanjuje koncentracija superoksidnih-radikala i rizik stvaranja hidroksil-radikala $\cdot\text{OH}$ (Gill i Tuteja, 2010).

Peroksidaza (POD) je enzim koji katalizira reakciju smanjenja vodikovog peroksida (H_2O_2) u vodu, istovremeno oksidirajući različite supstrate. Za razliku od askorbat-peroksidaze, ima drugačiji niz aminokiselina, različite fiziološke funkcije i manju specifičnost prema supstratima. Preferira aromatske supstrate poput gvajakola i progalola. Aktivnost POD-a varira ovisno o vrsti biljke i povezana je s vitalnim procesima kao što su respiracija, fotosinteza i transpiracija. Također, može biti osjetljiv pokazatelj metaboličke aktivnosti biljke pod utjecajem teških metala (Gill i Tuteja, 2010).

Katalaza (CAT) je prvi identificirani i karakterizirani enzim među antioksidativnim enzimima. To je polipeptidni tetramerni enzim čije podjedinice sadrže atom željeza u aktivnom mjestu. Ima ključnu ulogu u održavanju ravnoteže redoks reakcija tijekom oksidativnog stresa. Njegova glavna funkcija je razgradnja vodikovog peroksida (H_2O_2) putem katalitičke i peroksidazne reakcije, kako je prikazano u reakcijama niže (pri čemu R može biti različiti spoj, kao što su etanol ili metanol) (Sharma i sur., 2012).



Askorbat-peroksidaza (APOX) ima ključnu ulogu u regulaciji unutarstaničnih razina reaktivnih kisikovih vrsta (ROS). Pripada skupini hem-peroksidaza i regulira se redoks signalima i H_2O_2 . APOX katalizira redukciju H_2O_2 uz oksidaciju dvije molekule askorbata, stvarajući dvije molekule vode i dvije molekule monohidroksiaskorbata. Postoje različite izoforme ovog enzima koje se nalaze u različitim staničnim kompartmentima. APOX ima veći afinitet za H_2O_2 u usporedbi s katalazom (CAT), što ga čini učinkovitijim u razgradnji H_2O_2 tijekom stresnih uvjeta (Sharma i sur., 2012).

Glutation-S-transferaze (GST) su enzimi s višestrukim funkcijama, a najpoznatiji su po ulozi u detoksifikaciji toksičnih tvari. Oni kataliziraju vezivanje reduciranog glutationa (GSH) za toksične spojeve, što omogućuje njihovo izlučivanje iz stanice ili katabolizam. Osim toga, GST štiti biljne stanice od oksidativnog stresa izazvanog raznim abiotičkim stresorima i oksidansima. Također mogu sudjelovati u redukciji hidroperoksida na manje štetne alkohole, štiteći proteine od oksidativnih oštećenja (Hossain i sur., 2012).

Glutation reduktaza (GR) je enzim koji sudjeluje u oksidacijsko-redukcijskim ciklusima, djelujući kao antioksidans. On pomaže u održavanju reducirane forme glutaciona (GSH), koja je ključna za regulaciju metaboličkih i antioksidativnih procesa. GR katalizira oksidaciju GSH stvarajući oksidiranu formu glutaciona (GSSG), koja se sastoji od dvije molekule GSH povezane disulfidnim mostom, pri čemu je za ovu reakciju potrebna NADPH (Gill i Tuteja, 2010).

Neenzimatske komponente antioksidativnog sustava, kao što su askorbat (AsA) i glutation (GSH), zajedno s drugim molekulama poput tokoferola, karotenoida i fenolnih spojeva, igraju ključne uloge u obrani biljaka od reaktivnih kisikovih vrsta (ROS). Ovi antioksidansi utječu na različite aspekte rasta i razvoja biljaka, uključujući mitozu, starenje i procese stanične smrti (Sharma i sur., 2012).

2.4. Utjecaj fofora na antioksidativni metabolizam biljaka

Šumsko drveće čini otprilike 82 % kopnene biomase. Iako šumsko drveće pomaže u ublažavanju klimatskih promjena i ima važnu ulogu u ekosustavu, globalne promjene djeluju stresno na njihov rast. U stresnim uvjetima dolazi do povećane proizvodnje ROS-a što posljedično izaziva niz morfoloških i metaboličkih promjena koje utječu na rast i razvoj biljaka (Tariq i sur., 2018).

Biljke su zato razvile strategiju da se mogu prilagoditi takvim uvjetima: smanjena lisna površina, ograničena stomalna vodljivost, smanjena brzina transpiracije, povećana učinkovitost korištenja vode, pojačane aktivnosti antioksidativnih enzima i nakupljanje osmolita (Tariq i sur., 2017).

Fosfor je jedan od 17 esencijalnih elemenata potreban za normalan rast i razvoj biljaka. Nužan je za niz procesa poput stvaranja energije, sinteze nukleinskih kiselina, fotosinteze, glikolize, aktivacije i inaktivacije enzima, redoks reakcije, metabolizam ugljikohidrata i drugo. Iako je fosfor zastupljen u mnogim tlima, uglavnom je nedostupan za korištenje što ograničava rast i razvoj biljke. Biljke mogu unijeti fosfor u obliku ortofosfata (Pi) iz H_2PO_4^- i HPO_4^{2-} koji se nalaze u tlima u niskim koncentracijama. Fosfor se često dodaje u obliku fosfatnih gnojiva kao što su superfosfat i drugi fosfatni spojeve. U kiselim uvjetima fosfor brzo stvara netopljive komplekse s kationima, posebice aluminijem i željezom, te time postaje nedostupan za biljke (Vance i sur., 2003). U usporedbi s ortofosfatima, polifosfati su višenamjenska gnojiva koja

biljke opskrbljuju s dovoljnom količinom fosfora, ali i poboljšavaju dostupnost drugih esencijalnih elemenata poput željeza (Fe), cinka (Zn) i mangana (Mn). Polifosfati čine izvrsni održivi izvor fosfora jer se tijekom razvoja usjeva kondenzirana frakcija polifosfata polako hidrolizira što biljkama omogućava kontinuirani izvor dostupnog fosfora i smanjuje gubitke fosfora iz tla (Loudari i sur., 2023).

Primjena fosfora je pokazala pozitivni učinak na biomasu korijena, tj. na sposobnost izvlačenja vode iz tla. Također, gnojidba fosforom utjecala je i na povećanje relativnog sadržaja vode u lišću, neto stopu fotosinteze i maksimalnu učinkovitost PSII u uvjetima stresa od suše (Tariq i sur., 2017). Nedostatak fosfora izaziva gubitak kloroplastičnih pigmenata i proteina, promjenu membrane i peroksidaciju lipida. Također dolazi i do smanjenja klorofila a i klorofila b. Zbog navedenog dolazi do progresivnog smanjivanja fotosintetskog kapaciteta. U biljaka koje se nalaze u uvjetima nedostatka fosfora zabilježen je porast omjera karotenoida/klorofila. Poznato je da karotenoidi sudjeluju u detoksifikaciji biljke od ROS-a pa povećanje omjera karotenoida/klorofila može imati adaptivnu ulogu na zaštiti biljke od oksidativnog stresa. Produljeno vrijeme nedostatka fosfora povećava nastajanje vodikovog peroksida, lipidnu peroksidaciju, ali i povećava aktivnost antioksidativnih enzima CAT i POD (Kumar Tewari i sur., 2007).

2.5. Utjecaj vode na antioksidativni metabolizam biljaka

Utjecaji ozona i visokih temperatura koje uzrokuju suše vrlo često su zajedno istraživani (Alonso i sur., 2001, Alonso i sur., 2014; Landi i sur., 2019; Pellegrini i sur., 2019; Zalloni i sur., 2019). Kada nastupi dehidracija stanice dolazi do pada turgorovog tlaka, povećane toksičnosti iona i inhibicije fotosinteze. Tijekom sušnog razdoblja biljke adaptiraju svoju morfološku strukturu raspodjelom više ugljika u korijenov sustav te smanjivanjem veličine listova što, u konačnici, uzrokuje povećanu osutost (De Marco i sur., 2014). Na primjer, u slučaju promjene dostupnosti količine vode jedan od načina kako biljka regulira gubitak vode je zatvaranjem puči što sprječava gubitak vode transpiracijom (Landi i sur., 2019). Posljedično, zatvaranjem puči dolazi do smanjenja unosa CO₂ u list time smanjujući fotosintezu i smanjen rast (Hoshika i sur., 2015; McDowell i sur., 2008; Proietti i sur., 2016).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

3.1.1. Biljni materijal za provođenje eksperimenta

Istraživanje se provodi na mladim biljkama (starosti 6 godina) hrasta kitnjaka (lat. *Quercus petraea*) iz provenijencije Karlovac. Uzorci hrasta dostavljeni su sa Šumarskog fakulteta. Uzgoj hrasta kitnjaka bio je kontroliran te su prilikom uzgoja uzorci tretirani različitim dozama fosfora i različitom količinom vode prikazanom u tablici 2.

Tablica 2. Prikaz doze fosfora i količine vode kojom su tretirani uzorci hrasta kitnjaka dostavljeni sa Šumarskog fakulteta.

*(W - uzorci s dodatkom vode, D - uzorci bez dodatka vode, P+ - velika doza fosfora, P- -niska doza fosfora)

Oznaka uzorka	Tretman vodom	Tretman fosforom
1	W	P+
2	W	P-
3	D	P+
4	D	P-

3.1.2. Kemikalije

Popis i podrijetlo kemikalija korištenih u ovom radu za pripremu otopina prikazan je u tablici 1.

Tablica 1. Popis i podrijetlo kemikalija korištenih za pripremu otopina

Ime	Kemijska formula	Proizvođač
bradfordov reagens		Applichem, Njemačka
deionizirana voda	H ₂ O	Hrvatska
etilendiamintetraoctena kiselina (EDTA)	C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₈	Kemika, Hrvatska
gvajakol	C ₆ H ₄ (OH)(OCH ₃)	Acros-Organics, SAD
kalijev dihidrogen fosfat	KH ₂ PO ₄	Kemika, Hrvatska
kalijev hidrogen fosfat	K ₂ HPO ₄	Kemika, Hrvatska
kalijev jodid	KI	Kemika, Hrvatska
L-askorbinska kiselina	C ₆ H ₈ O ₆	Kemika, Hrvatska

metionin	$\text{HO}_2\text{CCH}(\text{NH}_2)\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SCH}_3$	Acros-Organics, SAD
natrijev askorbat	$\text{C}_6\text{H}_7\text{NaO}_6$	T.T.T. d.o.o., Hrvatska
nitro-plavi tetrazolijev klorid (NBT)	$\text{C}_{40}\text{H}_{30}\text{Cl}_2\text{N}_{10}\text{O}_6$	Alfa Aesar, SAD
polivinil – polipirolidon (PVPP)	$(\text{C}_6\text{H}_9\text{NO})_n$	Acros-Organics, SAD
riboflavin	$\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{O}_6$	Kemika, Hrvatska
trikloroctena kiselina (TCA)	Cl_3CCOOH	Hrvatska
tiobarbituratna kiselina (TBA)	$\text{C}_4\text{H}_4\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$	Acros-Organics, SAD
vodikov peroksid (w = 30 %)	H_2O_2	Gram-mol, Hrvatska

3.1.3. Oprema

U ovom radu korištena je sljedeća oprema:

Ime	Proizvođač
Centrifuga	MRC
Digestor	Waldner, Njemačka
Hladnjak	Liebherr ProfiLine, Njemačka
Tresilice	Crux, Hrvatska
Spektrofotometar	TECAN, Infinite 200Pro,
Vaga	Boeco BAS 31 plus, Njemačka

3.2. Metode

3.2.1. Određivanje koncentracije H_2O_2 i lipidne peroksidacije

Za određivanje koncentracije H_2O_2 i lipidne peroksidacije izvršila se ekstrakcija 0,2 g listova hrasta te homogenizira u tarioniku. U homogenizirani materijal dodati otopinu trikloroctene kiseline u vodi. Dobiveni ekstrakt se centrifugira na centrifugi (100 000 rpm, 5 min). Dobiveni supernatant se koristi za određivanje koncentracije H_2O_2 i lipidne peroksidacije, a potrebno ga je čuvati u hladnjaku na $-20\text{ }^\circ\text{C}$ do analize. Analize su provedene u tri paralele.

Određivanje koncentracije vodikovog peroksida

U 0,5 mL supernatanta doda se 0,5 mL 100 mM kalij fosfatni pufer i 1 mL kalijevog jodida. Uzorke 20 minuta staviti na shaker, a zatim izmjeriti apsorbanciju na spektrofotometru pri valnoj duljini 390 nm. Molarni ekstinkcijski koeficijent za H₂O₂ iznosi 0,28 μM cm⁻¹, a količina H₂O₂ izražava se kao μmol po gramu svježe tvari (μmol g⁻¹ svj. tv.). Koncentraciju vodikovog peroksida izračunati prema formuli:

$$c_{H_2O_2} = \frac{c_{MDA} \cdot V}{m} \cdot F \cdot 1000 \quad [\mu\text{mol g}^{-1} \text{FW}]$$

c_{H₂O₂} – koncentracija vodikovog peroksida

c_{MDA} – koncentracija lipidne peroksidacije

V – volumen homogeniziranog uzorka

m – masa uzorka lista

F – faktor razrjeđenja

Određivanje lipidne peroksidacije (LPO)

Za određivanje lipidne peroksidacije određuje se količina nastalog krajnjeg produkta lipidne peroksidacije - malondialdehida (MDA) koji s trikloroetenim kiselinom (TCA) daje obojeni produkt. U 1 mL supernatanta doda se 1 mL 0,5 %-tne tiobarbiturne kiseline (TBA) u 20 %-tnoj trikloroetennoj kiselini (TCA). Reakcijsku smjesu zagrijavati u vodenoj kupelji pri temperaturi 90 °C tijekom 30 min. Slijedi naglo hlađenje u ledenoj kupelji tijekom 10 min. Nakon toga uzorak 10 min centrifugirati na 10 000 rpm te izmjeriti apsorbanciju na valnoj duljini 390 nm. Molarni ekstinkcijski koeficijent nastalog MDA iznosi 155,5 mM⁻¹ cm⁻¹, a količina malondialdehida (MDA) izražava se kao nmol po gramu svježe tvari (nmol g⁻¹ svj. tv.). Analize su provedene u tri paralele.

3.2.2. Određivanje koncentracije ukupnih topljivih proteina po Bradfordu i aktivnosti antioksidativnih enzima

Homogenizaciju biljnog materijala vršiti u tarioniku na ledu uz dodatak polivinil-polipirrolidona i hladnog pufera za ekstrakciju proteina pH = 7,0. Dobiveni ekstrakt centrifugirati te dobiveni supernatant dekantirati i čuvati na -20 °C do analize. Dobiveni supernatant koristiti za određivanje koncentracije proteina po Bradfordu, mjerenje aktivnosti superoksid dismutaze (SOD), nespecifičnih peroksidaza (POD), katalaze (CAT) i askorbat-

peroksidaze (APOX). Analize su provedene u tri paralele.

Određivanje koncentracije ukupnih topljivih proteina po Bradfordu

Ukupni topljivi proteini odredili su se metodom po Bradfordu (Bradford, 1976). U kivetu se otpipetira 2,5 µL ekstrakta, 2,5 µL pufera za ekstrakciju te doda 225 µL Bradfordovog reagensa. Slijedi inkubacija u tamnoj sobi na sobnoj temperaturi tijekom 15 minuta. Nakon 15 minuta uzorke prenijeti u tamnoj posudi do spektrofotometra i izmjeriti apsorbanciju pri 595 nm. Analize su provedene u tri paralele.

Mjerenje aktivnosti superoksid dizmutaze (SOD)

Za mjerenje aktivnosti enzima SOD, prema Ambriović Ristov i sur. (2007), pripremljena su razrjeđenja miješanjem volumena ekstrakta i pufera za ekstrakciju proteina pH = 7,0. U epruvetu je dodano pufer za mjerenje aktivnosti superoksid-dismutaze pH = 7,8, razrjeđeni ekstrakt i otopina riboflavina u vodi. Enzimsku reakciju pokrenuti uključivanjem izvora svijetla od 36 W. Nakon 10 minuta prekinuti reakciju gašenjem izvora svijetla i zamračiti uzorak. Apsorbanciju mjerimo na spektrofotometru pri valnoj duljini 560 nm te je potrebno izraditi krivulju aktivnosti enzima. Analize su provedene u tri paralele.

Aktivnost se izražava kao inhibicija redukcije supstrata:

$$\text{NBT (\%)} = [(A-B)/A] \cdot 100$$

A - apsorbancija izmjerena nakon reakcije bez enzima (najveća vrijednost apsorbancije)

B - apsorbancija izmjerena nakon reakcije s enzimom (smanjenje apsorbancije)

Krivulja aktivnosti enzima izradi se tako da su na apscisi volumeni razrijeđenog enzimskog ekstrakta (1:40) upotrijebljeni za pripremu razrjeđenja (npr. 0, 4; 20; 40 i 80 µL), a na ordinatu nanjeti vrijednosti inhibicije redukcije supstrata NBT (%). Jedinica aktivnosti SOD jednaka je količini enzima potrebnog za 50 % inhibicije NBT u reakcijskoj smjesi. Odredi se volumen enzimskog ekstrakta koji uzrokuje 50 % inhibicije redukcije NBT te iz koncentracije ukupnih proteina izračuna se specifična aktivnost SOD. Aktivnost SOD izražava se u jedinicama enzimske aktivnosti po miligramu ukupnih proteina (U mg⁻¹ P). Analize su provedene u tri paralele.

Mjerenje aktivnosti katalaze (CAT)

Za mjerenje aktivnosti CAT (Ambriović Ristov i sur., 2007) dobiveni ekstrakt se dva puta razrjedi. U kvarcnu kivetu otpipetira se alikvot pufera za mjerenje aktivnosti katalaze te započne reakcija dodatkom alikvota razrijeđenog uzorka. Apsorbancija se mjeri na spektrofotometru pri valnoj duljini 240 nm u određenom vremenskom periodu. Ekstinkcijski koeficijent iznosi $40 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Aktivnost katalaze izražava se kao mmol po min i mg ukupnih proteina ($\text{mmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ P}$). Analize su provedene u tri paralele.

Mjerenje aktivnosti nespecifičnih peroksidaza (POD)

Za mjerenje aktivnosti POD (Ambriović Ristov i sur., 2007) dobiveni ekstrakt se dva puta razrjedi. U kivetu otpipetirati alikvot pufera za mjerenje aktivnosti nespecifičnih peroksidaza i započeti reakciju dodatkom razrijeđenog ekstrakta. Na spektrofotometru pratiti porast apsorbancije u određenom vremenu pri valnoj duljini 470 nm. Molarni ekstinkcijski koeficijent nastalog tetragvajakola iznosi $26,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Aktivnost nespecifičnih peroksidaza izražava se kao mmol po min i mg ukupnih proteina ($\text{nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ P}$). Analize su provedene u tri paralele.

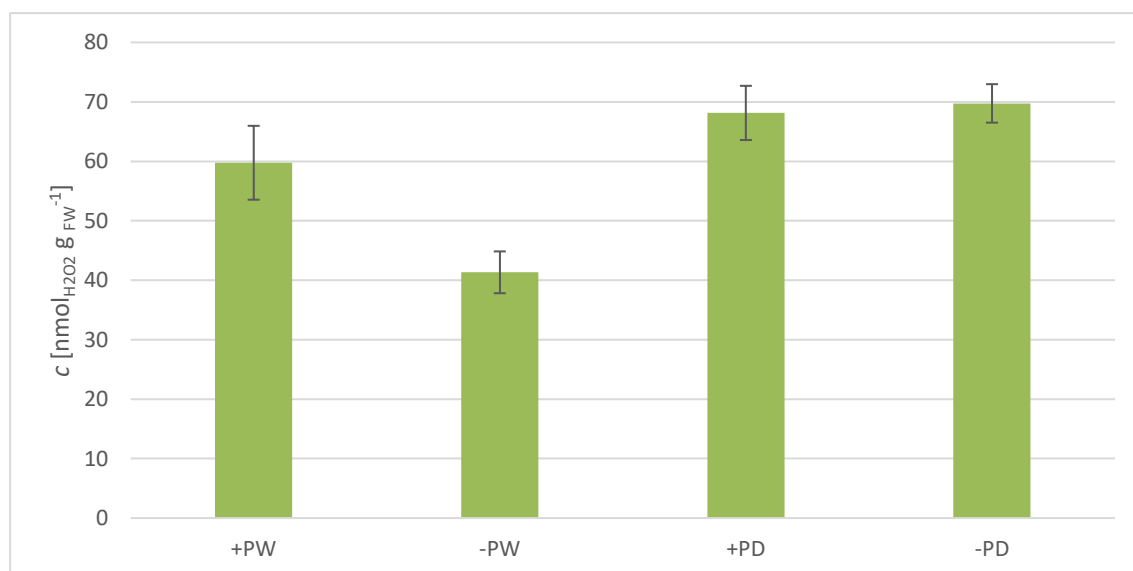
Mjerenje aktivnosti askorbat peroksidaze (APOX)

Za mjerenje aktivnosti APOX (Ambriović Ristov i sur., 2007) dobiveni ekstrakt se dva puta razrjedi. U kvarcnu kivetu otpipetira se alikvot pufera za mjerenje aktivnosti askorbat-peroksidaze, zatim alikvot Na-askorbata i alikvot ekstrakta/supernatanta. Reakcija započinje dodatkom alikvota vodikovog peroksida. Spektrofotometrijski se mjeri pad apsorbancije pri valnoj duljini 290 nm svakih 15 sekundi tijekom 1 minute. Aktivnost askorbat-peroksidaze izražava se kao smanjenje količine askorbata s ekstinkcijskim koeficijentom $2,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Aktivnost askorbat-peroksidaze izražava se kao nmol po min i mg ukupnih proteina ($\text{nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ P}$). Analize su provedene u tri paralele.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Cilj istraživanja bio je ispitati kako različite koncentracije fosfora i vode utječu na antioksidativni mehanizam hrasta, pri čemu su analizirani stupanj lipidne peroksidacije i količina vodikovog peroksida u listovima hrasta. Također, istraživanje je obuhvatilo mjerenje aktivnosti antioksidativnih enzima poput superoksid dismutaze (SOD), nespecifičnih peroksidaza (POD), katalaze (CAT) i askorbat-peroksidaze (APOX) da bi se razumjelo kako se biljke štite od oksidativnog stresa u ovim uvjetima. Rezultati su prikazani na slikama 2.-8. te su grupirani u četiri kategorije: (i) +PW (dodatak visoke koncentracije fosfora i tretman vodom), (ii) -PW (dodatak niske doze fosfora i tretman vodom), (iii) +PD (dodatak visoke doze fosfora i izostanak tretmana vodom), (iv) -PD (dodatak niske doze fosfora i izostanak tretmana vodom).

Za mjerenje vodikovog peroksida i lipidne peroksidacije izvršena je ekstrakcija uzoraka hrasta. Za određivanje lipidne peroksidacije određena je količina malondialdehida (MDA) koji je krajni produkt lipidne peroksidacije. U prisutnosti trikloroetene kiseline (TCA), MDA daje obojeni produkt. Uzorcima je izmjerena apsorbancija na 390 nm i rezultati su prikazani na slici 3. Rezultati određivanja koncentracije H_2O_2 prikazani su na slici 2.

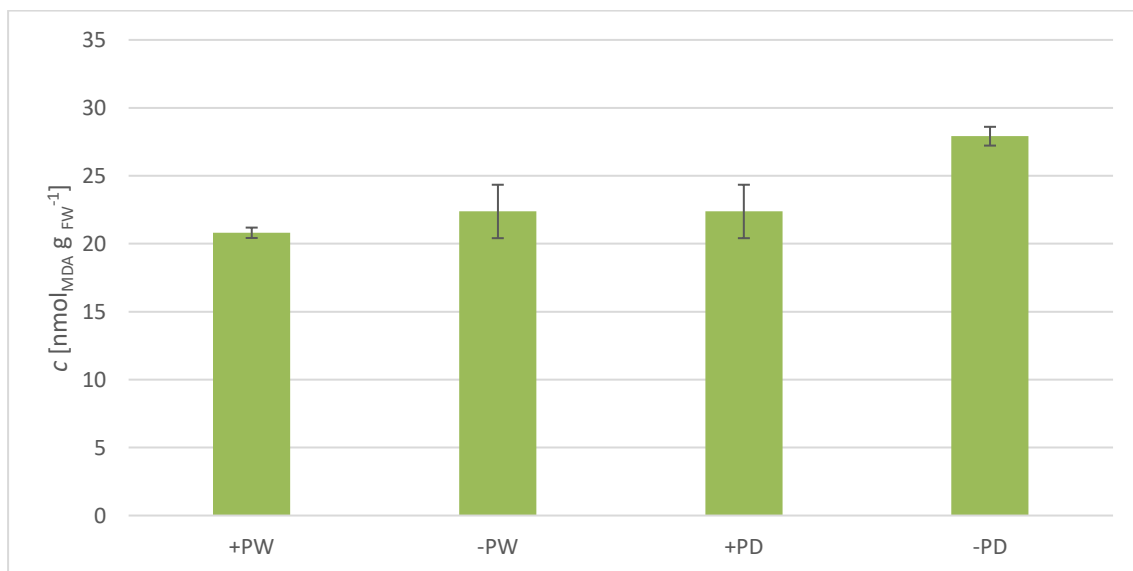


Slika 2. Izmjerene vrijednosti količine vodikovog peroksida (H_2O_2) u uzorcima hrasta nakon uzgoja u tlu s različitim koncentracijama fosfora i vode. Rezultati su srednja vrijednost \pm S.D. (n=3)

*+P-visoka koncentracija fosfora, -P – niska koncentracija fosfora, W-tretman vodom, D-bez tretmana vodom

Na slici 2. prikazana je koncentracija vodikovog peroksida u uzorcima hrasta. Izmjerene vrijednosti koncentracije vodikovog peroksida u uzorcima hrasta iznose od 41,33 do 69,74 $\text{nmol}_{\text{H}_2\text{O}_2} \text{g}_{\text{FW}}^{-1}$. Najbolje rezultate pokazuju zalijevani uzorci tretirani manjom dozom fosfora jer su u tim uzorcima izmjerene najmanje koncentracije vodikovog peroksida. Zalijevani uzorci tretirani manjom dozom fosfora pokazuju niže koncentracije vodikovog peroksida od nezalijevanih uzoraka tretiranih manjom dozom fosfora.

Slično, u provedenom eksperimentu gdje je istraživana utjecaj fosfora na zaštitu biljke od oksidativnog stresa došli su do zaključka da primjena fosfora rezultira nižim razinama O_2^- i H_2O_2 kod biljaka u stresu (Tariq i sur., 2018; Tariq i sur., 2017). Molekula H_2O_2 pri normalnim uvjetima stvara se unutar stanice kao produkt metabolizma stanice i služi kao signalna molekula (Gill i Tuteja, 2010). Prilikom stresnih uvjeta stvara se u prekomjernim količinama i uzrokuje štetu unutar stanice te je jedna od reaktivnih kisikovih čestica koja stvara oštećenja unutar stanice (Sharma i sur., 2012).



Slika 3. Izmjerene vrijednosti razine lipidne peroksidacije (LPO) u listu hrasta kitnjaka nakon uzgoja u tlu s različitim koncentracijama fosfora i vode. Rezultati su srednja vrijednost \pm S.D. (n=3)

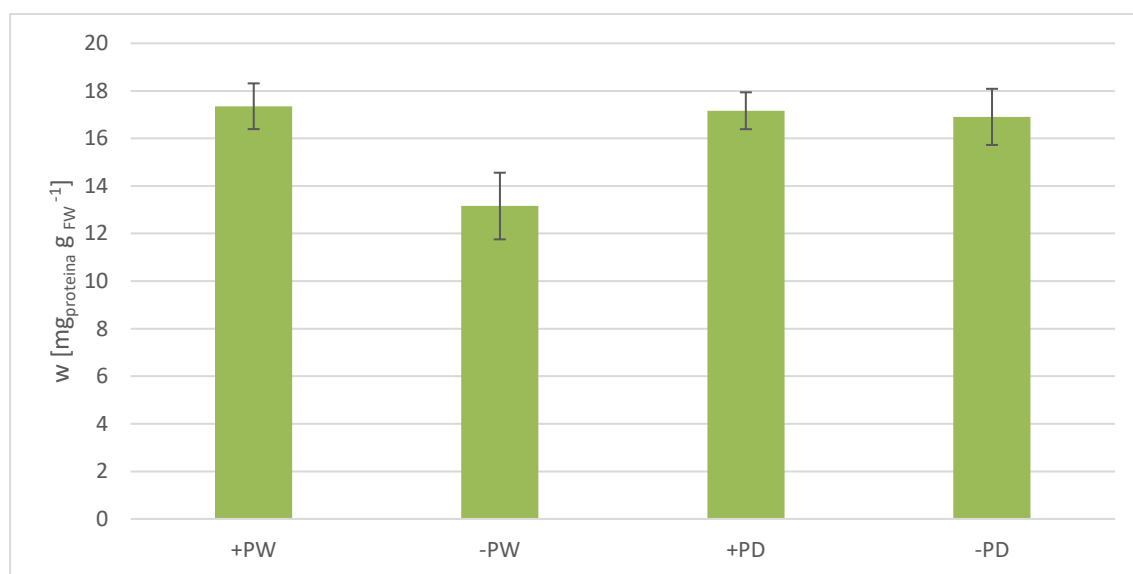
*+P-visoka koncentracija fosfora, -P – niska koncentracija fosfora, W-tretman vodom, D-bez tretmana vodom

Na slici 3. prikazana je koncentracija peroksidacije lipida u uzorcima hrasta. Vrijednosti koncentracije peroksidacije lipida u uzorcima hrasta kitnjaka iznose od 20,81 do 27,91 $\text{nmol}_{\text{MDA}} \text{g}_{\text{FW}}^{-1}$. Najveća izmjerena koncentracija peroksidacije lipida vidljiva je u uzorku

tretiranog manjom dozom fosfora i bez dodatka vode. Kod dobro zalijevanih uzorka koji su tretirani većom dozom fosfora uočena je manja peroksidacija lipida nego kod uzoraka koji su tretirani manjom dozom fosfora.

Slično, Tariq i sur. (2018), koji su istraživali utjecaj vode i fosfora u biljci *Alnus cremastogyne* došli su do zaključka da je koncentracijama MDA viša u biljkama koje nisu zalijevane.

Nadalje, određene su aktivnosti antioksidativnih enzima. Najprije su određeni ukupni proteini. Za određivanje ukupnih proteina homogeniziran je biljni materijal u tarioniku na ledu uz dodatak polivinil-polipirrolidona i hladnog pufera za ekstrakciju proteina. Supernatant dobiven centrifugiranjem ekstrakta korišten je dalje za mjerenje mase ukupnih proteina i za mjerenje aktivnosti antioksidativnih enzima. Rezultati su prikazani na slici 4.



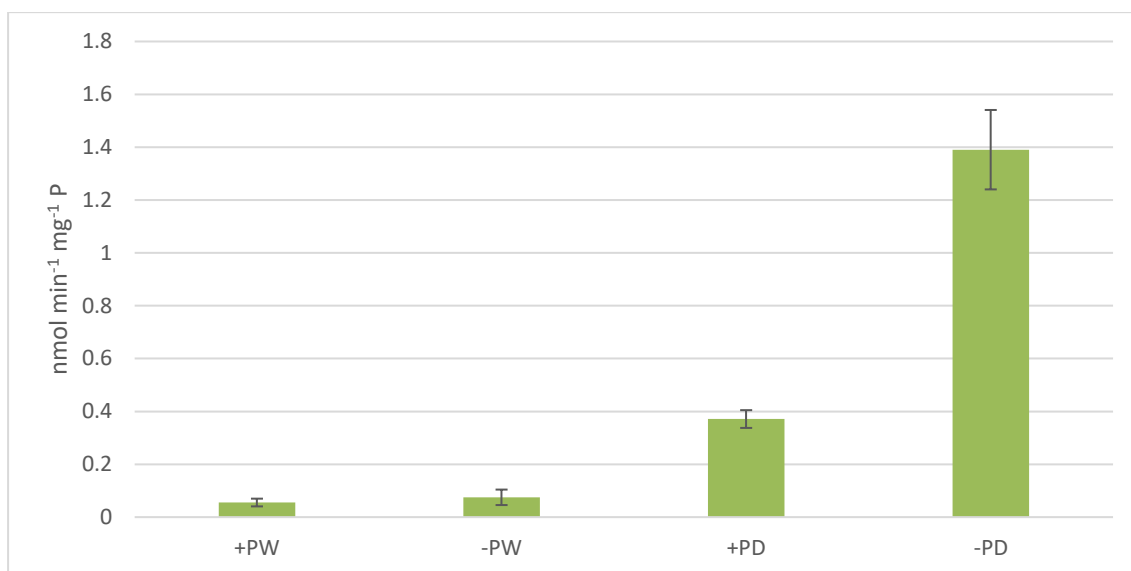
Slika 4. Udio ukupnih proteina u listu hrasta nakon uzgoja u tlu s različitim koncentracijama fosfora i vode. Rezultati su srednja vrijednost \pm S.D. (n=3)

*+P-visoka koncentracija fosfora, -P – niska koncentracija fosfora, W-tretman vodom, D-bez tretmana vodom

Izmjerene mase ukupnih proteina u uzorcima hrasta koji su se nalazili u sušnim uvjetima su manje od mase kod dobro zalijevanih uzoraka. U uzorcima hrasta izmjerene su mase od 13,16 do 17,35 mg_{proteina} g_{FW}⁻¹. U odnosu na tretman fosforom nije vidjiva značajna razlika u masi ukupnih proteina.

Nadalje, antioksidativni enzimi (poput SOD, CAT, POD, APOX) sudjeluju u obrani neutralizirajući ROS-ove te su isti mjereni. Rezultati aktivnosti enzima prikazani su na slikama

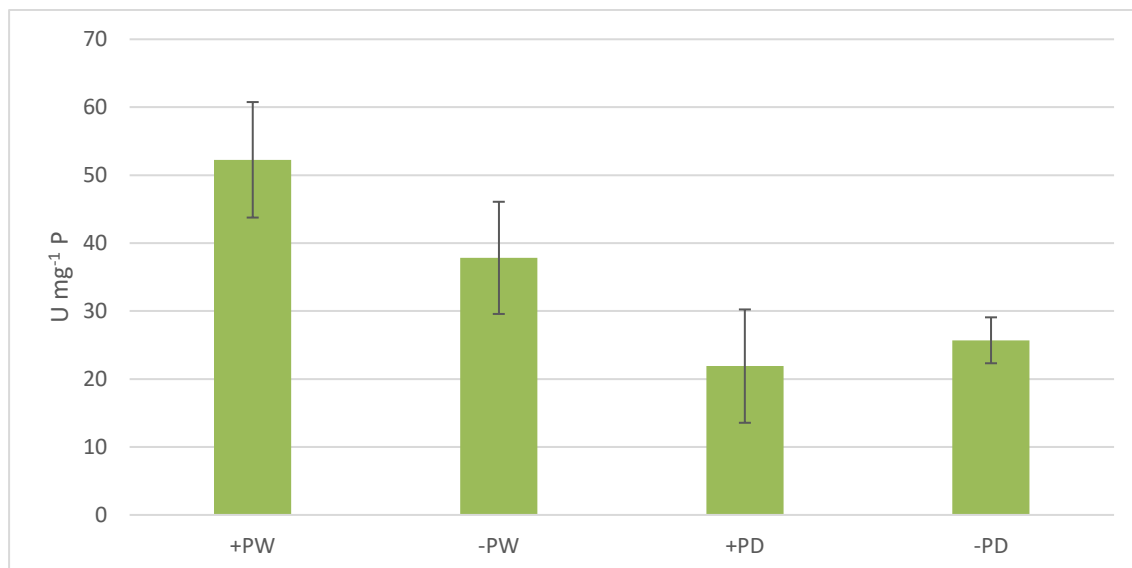
5. - 8.



Slika 5. Antioksidativna aktivnost katalaze (CAT) u uzorcima hrasta nakon uzgoja u tlu s različitim koncentracijama fosfora i vode. Rezultati su srednja vrijednost \pm S.D. (n=3)

*+P-visoka koncentracija fosfora, -P – niska koncentracija fosfora, W-tretman vodom, D-bez tretmana vodom

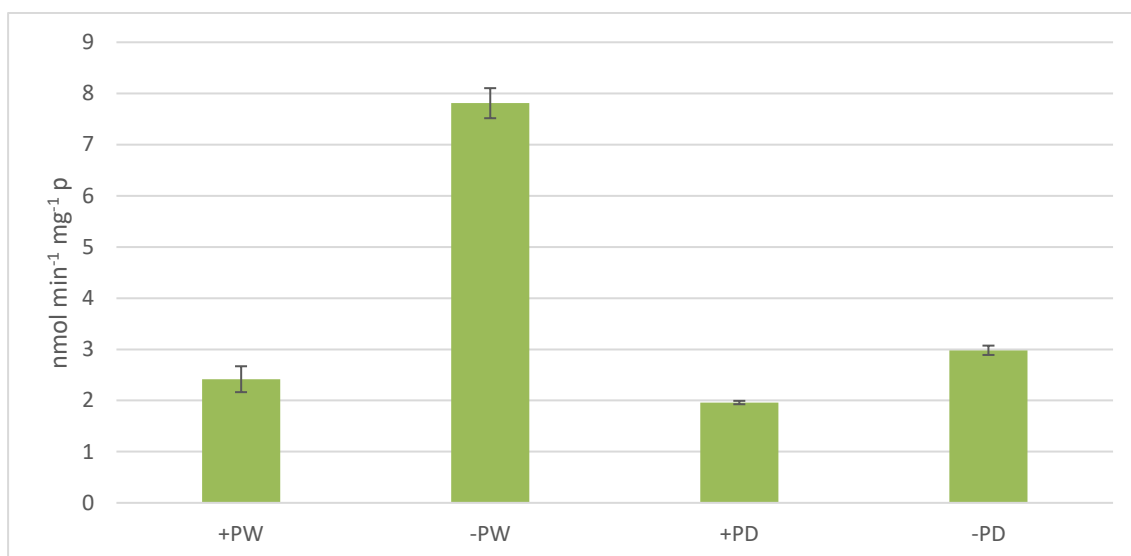
Izmjerena aktivnost enzima katalaze (CAT) u uzorcima hrasta kreće se od 0,06 do 1,4 nmol min⁻¹ mg⁻¹ proteina, s najvećom izmjerenom aktivnosti u uzorku bez dodatka fosfora i vode. Aktivnost enzima CAT je niža u dobro zalijevanim uzorcima nego u uzorcima koji nisu zalijevani što podupire tvrdnju da u stresnim (sušnim) uvjetima dolazi do povećane aktivnosti antioksidativnih enzima. Kod zalijevanih uzoraka tretiranih manjom dozom fosfora uočena je veća aktivnost antioksidativnog enzima, nego kod zalijevanih uzoraka tretiranih većom dozom fosfora.



Slika 6. Antioksidativna aktivnost superoksid-dismutaze (SOD) u uzorcima hrasta nakon uzgoja u tlu s različitim koncentracijama fosfora i vode. Rezultati su srednja vrijednost \pm S.D. (n=6)

*+P-visoka koncentracija fosfora, -P – niska koncentracija fosfora, W-tretman vodom, D-bez tretmana vodom

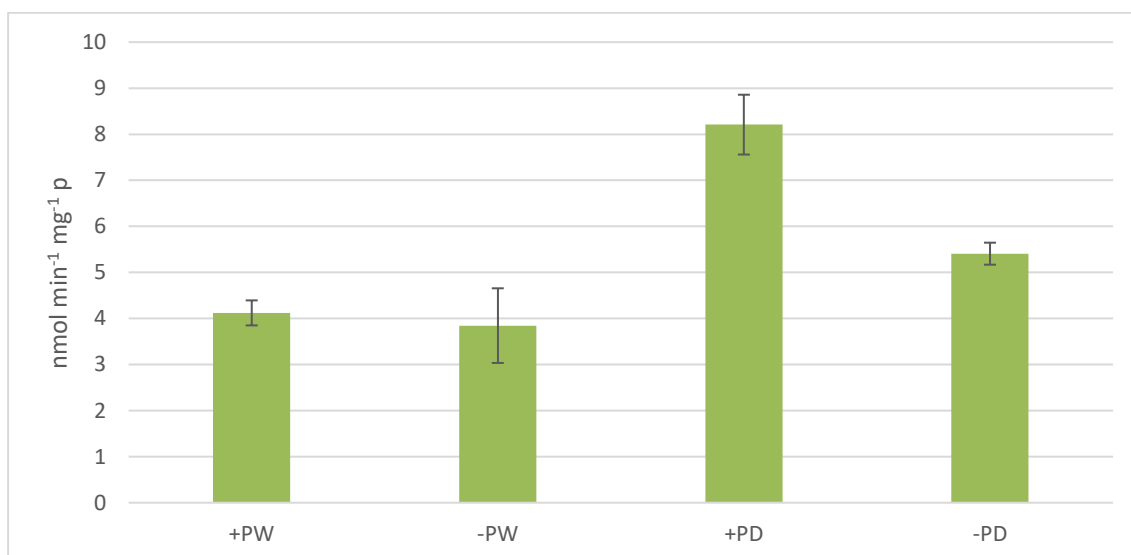
Izmjerena aktivnosti enzima superoksid dismutaze (SOD) kreću se od 52,26 do 21,9 U mg⁻¹ proteina u uzorcima hrasta. Maksimalna izmjerena aktivnost u uzorku hrasta izmjerena je u dobro zalijevanom uzorku s dodatkom fosfora, što je suprotno aktivnosti enzima CAT. Uzorci tretirani većom dozom fosfora pokazuju manju aktivnost u sušnim uvjetima, dok je kod uzoraka tretiranih manjom dozom fosfora uočena veća aktivnost enzima SOD u sušnim uvjetima.



Slika 7. Antioksidativna aktivnost peroksidaze (POD) u uzorcima hrasta nakon uzgoja u tlu s različitim koncentracijama fosfora i vode. Rezultati su srednja vrijednost \pm S.D. (n=3)

*+P-visoka koncentracija fosfora, -P – niska koncentracija fosfora, W-tretman vodom, D-bez tretmana vodom

Izmjerene aktivnosti enzima peroksidaze (POD) u uzorcima hrasta iznose od 1,96 do 7,81 nmol min⁻¹ mg⁻¹ proteina, s najvećom izmjenom vrijednosti u uzorku bez dodatka vode i s dodatkom fosfora. Kod dobro zalijevanih uzoraka tretiranih većom dozom fosfora vidljiva je manja aktivnost antioksidativnog enzima POD. Nije primjećena značajnija razlika prilikom dodatka fosfora u stanju suše i u zalijevanim uzorcima.



Slika 8. Antioksidativna aktivnost askorbat-peroksidaze (APOX) u uzorcima hrasta nakon uzgoja u tlu s različitim koncentracijama fosfora i vode. Rezultati su srednja vrijednost \pm S.D. (n=6)

*+P-visoka koncentracija fosfora, -P – niska koncentracija fosfora, W-tretman vodom, D-bez tretmana vodom

Izmjerene aktivnosti enzima askorbat peroksidaze (APOX) u uzorcima hrasta iznose od 3,85 do 8,21 nmol min⁻¹ mg⁻¹ proteina, s najvećom izmjerenom vrijednosti u uzorku bez dodatka vode i s dodatkom fosfora.

Slično, Tariq i sur. (2017) provodili su istraživanje utjecaja fosfora i vode na biljku *Phoebe zhennan*. Kod nezalijevanih uzoraka hrasta izmjerena je znatno veća aktivnost antioksidativnih enzima peroksidaze (POD), katalaze (CAT) i superoksid dismutaze (SOD) nego kod dobro zalijevanih uzoraka. Međutim, primjena fosfora imala je samo blagi ili zanemariv utjecaj na rast i metabolizam biljaka koje su bile dobro zalijevane. Zaključili su da biljka *P. zhennan* ima sposobnost otpornosti na sušu, dok primjena fosfora većinom olakšava i poboljšava toleranciju na sušu putem fizikalno-biokemijskih prilagodbi, bez obzira na dostupnost vode. Nadalje, u istraživanju utjecaja suše i fosfora na biljku *Alnus cremastogyne*, koje su proveli Tariq i sur. (2018), zaključeno je da je fosfor imao samo blagi ili zanemariv utjecaj na biljke koje su bile dobro zalijevane.

Provedeno istraživanje je imalo za cilj ispitati utjecaj različitih koncentracija fosfora i količine vode na antioksidativni mehanizam hrasta, s analizom stupnja lipidne peroksidacije i količine vodikovog peroksida u listovima hrasta. Rezultati analize koncentracije vodikovog peroksida (H₂O₂) pokazuju da su uzorci zalijevani i tretirani manjom količinom fosfora imali najmanju koncentraciju peroksida. Nadalje, najviša koncentracija peroksidacije lipida zabilježena je u uzorku tretiranom fosforom bez dodatka vode, dok su dobro zalijevani uzorci tretirani većom dozom fosfora pokazali manju peroksidaciju lipida od uzoraka tretiranih manjom dozom fosfora. Što se tiče aktivnosti antioksidativnih enzima u uzorcima hrasta kitnjaka pri kontroliranim uvjetima, rezultati pokazuju da je aktivnost enzima katalaze (CAT) najviša u uzorcima bez dodatka fosfora i vode, s nižom aktivnošću u dobro zalijevanim uzorcima. Aktivnost enzima superoksid dismutaze (SOD) bila je najviša u dobro zalijevanim uzorcima s dodatkom fosfora, dok su uzorci tretirani većom dozom fosfora pokazivali nižu aktivnost u sušnim uvjetima. Aktivnost enzima peroksidaze (POD) bila je najveća u uzorcima bez dodatka vode i s dodatkom fosfora, dok su dobro zalijevani uzorci tretirani manjom dozom fosfora imali nižu aktivnost, a uzorci tretirani većom dozom fosfora pokazivali su veću aktivnost u sušnim uvjetima.

5. ZAKLJUČCI

Na temelju rezultata ostvarenih tijekom ovog istraživanja može se zaključiti slijedeće:

1. Koncentracija vodikovog peroksida (H_2O_2) u listovima hrasta kitnjaka smanjuje se u uzorcima koji su bili zalijevani i tretirani manjom količinom fosfora, što ukazuje na pozitivan učinak ovog tretmana na smanjenje oksidativnog stresa.
2. Peroksidacija lipida u uzorcima hrasta kitnjaka bila je najviša u uzorku tretiranom manjom dozom fosfora bez dodatka vode, dok su dobro zalijevani uzorci tretirani većom dozom fosfora pokazali manju peroksidaciju lipida. Rezultati ukazuju da su voda i fosfor zajedno imali zaštitni učinak protiv oksidativnog oštećenja lipida.
3. Aktivnost enzima katalaze (CAT) bila je najviša u uzorcima bez dodatka fosfora i vode, ali se smanjivala u dobro zalijevanim uzorcima.
4. Aktivnost enzima superoksid dismutaze (SOD) bila je najviša u dobro zalijevanim uzorcima s dodatkom fosfora, dok su uzorci tretirani većom dozom fosfora pokazivali nižu aktivnost u sušnim uvjetima. To ukazuje na složen odnos između vode, fosfora i aktivnosti ovog enzima u zaštiti hrasta kitnjaka od oksidativnog oštećenja.
5. Aktivnost enzima peroksidaze (POD) bila je najmanja u uzorcima bez dodatka vode i s tretmanom veće doze fosfora, dok su dobro zalijevani uzorci tretirani višom dozom fosfora imali nižu aktivnost, a uzorci tretirani manjom dozom fosfora pokazivali veću aktivnost u sušnim uvjetima. Rezultati sugeriraju da je tretman fosforom imao značajan utjecaj na aktivnost enzima POD u obrani hrasta od oksidativnog stresa u sušnim uvjetima.
6. Najviša izmjerena vrijednost aktivnosti enzima askorbat peroksidaze (APOX) zabilježena je u uzorku koji nije bio dodatno zalijevan, već je imao dodatak fosfora. Rezultati ukazuju da prisutnost fosfora pozitivno utječe na aktivnost APOX-a u hrastu kitnjaku, što pomaže u obrani biljke od oksidativnog stresa ili drugih stresnih uvjeta.

6. POPIS LITERATURE

Agathokleous E, Feng Z, Oksanen E, Sicard P, Wang Q, Saitanis CJ, i sur. (2020) Ozone affects plant, insect, and soil microbial communities: A threat to terrestrial ecosystems and biodiversity. *Sci Adv* **6**, 1-17. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abc1176>.

Alonso R, Elvira S, Castillo FJ, Gimeno BS (2001) Interactive effects of ozone and drought stress on pigments and activities of antioxidative enzymes in *Pinus halepensis*. *Plant Cell Environ* **24**, 905–916. <https://doi.org/10.1046/j.0016-8025.2001.00738.x>

Alonso R, Elvira S, González-Fernández I, Calvete H, García-Gómez H, Bermejo V (2014) Drought stress does not protect *Quercus ilex* L. from ozone effects: results from a comparative study of two subspecies differing in ozone sensitivity. *Plant Biol* **16**, 375–384. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/plb.12073>

Ambriović-Ristov A, Brozović A, Bruvo Mađarić B, Četković H, Herak Bosnar M, Hranilović D, Katušić Hećimović S, Meštrović Radan N, Mihaljević S, Slade N, Vujaklija D (2007) Metode u molekularnoj biologiji, 1. izd., Institut Ruđer Bošković, Zagreb.

Dar MI, Naikoo MI, Khan FA, Rehman F, Green ID, Naushin F, Ansari AA (2017) An introduction to reactive oxygen species metabolism under changing climate in plants. In *Reactive Oxygen Species and Antioxidant Systems in Plants: Role and Regulation under Abiotic Stress*, Springer Singapore, str. 25–52, https://doi.org/10.1007/978-981-10-5254-5_2

De Marco A, Proietti C, Cionni I, Fischer R, Screpanti A, Vitale M (2014) Future impacts of nitrogen deposition and climate change scenarios on forest crown defoliation. *Environ Pollut* **194**, 171–180. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.envpol.2014.07.027>

Gill SS, Tuteja N (2010) Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol Biotech* **28**, 909-930. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2010.08.016>

Gull A, Lone AA, Wani NUI (2019) Biotic and abiotic stresses in plants. Abiotic and biotic stress in plants. U: de Oliveira A (ured.), IntechOpen, London, str. 1-19. <https://doi.org/10.5772/intechopen.85832>

Hasanuzzaman M, Nahar K, Alam MM, Roychowdhury R, Fujita M (2013) Physiological, biochemical, and molecular mechanisms of heat stress tolerance in plants. *Int J Mol Sci* **14**, 9643–9684. <https://doi.org/10.3390/ijms14059643>

Hoshika Y, Katata, G, Deushi M, Watanabe M, Koike T, Paoletti E (2015) Ozone-induced stomatal sluggishness changes carbon and water balance of temperate deciduous forests. *Sci Rep* **5**, 9871. <https://doi.org/10.1038/srep09871>

Hossain MA, Piyatida P, Teixeira da Silva JA, Fujita M (2012) Molecular Mechanism of Heavy Metal Toxicity and Tolerance in Plants: Central Role of Glutathione in Detoxification of Reactive Oxygen Species and Methylglyoxal and in Heavy Metal Chelation. *J Bot* **2012**, 1-37. <https://doi.org/10.1155/2012/872875>

Kumar Tewari R, Kumar P, Sharma PN (2007) Oxidative Stress and Antioxidant Responses in Young Leaves of Mulberry Plants Grown Under Nitrogen, Phosphorus or Potassium Deficiency. *J Integr Plant Biol* **49**(3), 313–322. <https://doi.org/10.1111/j.1672-9072.2006.00358>.

Landi M, Cotrozzi L, Pellegrini E, Remorini D, Tonelli M, Trivellini A, Nali C, Guidi L, Massai R, Vernieri P, Lorenzini G (2019) When —thirstyl means —less able to activate the signalling wave triggered by a pulse of ozone: A case of study in two Mediterranean deciduous oak species with different drought sensitivity. *Sci Total Environ* **657**, 379–390. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.12.012>

Loudari A, Latique S, Mayane A, Colinet G, Oukarroum A (2023) Polyphosphate fertilizer impacts the enzymatic and non-enzymatic antioxidant capacity of wheat plants grown under salinity. *Sci Rep* **13**(1), 11212. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-38403-3>

Matesanz S, Valladares F (2014) Ecological and evolutionary responses of Mediterranean plants to global change. *Environ Exp Bot* **103**, 53–67. <https://doi.org/10.1016/J.ENVEXPBOT.2013.09.004>

McDowell N, Pockman WT, Allen CD, Breshears DD, Cobb N, Kolb T, Plaut J, Sperry J, West A, Williams DG, Yezep EA (2008) Mechanisms of plant survival and mortality during drought: why do some plants survive while others succumb to drought? *New Phytol* **178**, 719–739. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2008.02436.x>

Mehla N, Sindhi V, Josula D, Bisht P, Wani SH (2017) An introduction to antioxidants and their roles in plant stress tolerance. In *Reactive Oxygen Species and Antioxidant Systems in Plants: Role and Regulation under Abiotic Stress*, Springer Singapore, str. 1–23. https://doi.org/10.1007/978-981-10-5254-5_1

Pellegrini E, Hoshika Y, Dusart N, Cotrozzi L, Gérard J, Nali C, Vaultier MN, Jolivet Y, Lorenzini G, Paoletti E (2019) Antioxidative responses of three oak species under ozone and water stress conditions. *Sci Total Environ* **647**, 390–399. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.07.413>

Proietti C, Anav A, De Marco A, Sicard P, Vitale M (2016) A multi-sites analysis on the ozone effects on Gross Primary Production of European forests. *Sci Total Environ* **556**, 1–11. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.02.187>

Sharma P, Jha AB, Dubey RS, Pessarakli M (2012) Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions. *J Bot*, 1–26. <https://doi.org/10.1155/2012/217037>

Tariq A, Pan K, Olatunji OA, Graciano C, Li Z, Sun F, i sur. (2017) Phosphorous application improves drought tolerance of phoebe zhennan. *Front Plant Sci* **8**. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01561>

Tariq A, Pan K, Olatunji OA, Graciano C, Li Z, Sun F, i sur. (2018) Phosphorous fertilization alleviates drought effects on *Alnus cremastogyne* by regulating its antioxidant and osmotic potential. *Sci Rep* **8**(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-24038-2>

Vance CP, Uhde-Stone C, Allan DL (2003) Phosphorus acquisition and use: Critical adaptations by plants for securing a nonrenewable resource. *New Phytol* **157**(3), str. 423–447. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2003.00695.x>

Xie X, He Z, Chen N, Tang Z, Wang Q, Cai Y (2019) The Roles of Environmental Factors in Regulation of Oxidative Stress in Plant. *BioMed Res Int* **2019**, 9732325. <https://doi.org/10.1155/2019/9732325>

Zalloni E, Battipaglia G, Cherubini P, Saurer M, De Micco V (2019) Wood Growth in Pure and Mixed *Quercus ilex* L. Forests: Drought Influence Depends on Site Conditions. *Front Plant Sci* **10**, 397. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2019.00397>

Izjava o izvornosti

Ja _____ Maja Balenović _____ izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Maja Balenović
Vlastoručni potpis