

Биохемијски одговор биљака кукуруза на поплаву

Тања Трифковић¹, Наташа Лукић², Невена Шушкало³,
Биљана Давидовић-Плавшић¹, Биљана Кукавица^{1*}

¹Универзитет у Бањој Луци, Природно-математички факултет,
Република Српска, Босна и Херцеговина, tanjatrifkovic77@gmail.com;
biljana.davidovic-plavsic@pmf.unibl.org; biljana.kukavica@pmf.unibl.org

²Универзитет у Хоенхајму, Институт за пејзажну екологију и екологију биљака,
Штутгарт, Њемачка

³Универзитетски клинички центар Републике Српске, Босна и Херцеговина

Сажетак. Посљедњих деценија у Босни и Херцеговини, поплаве су биле један од главних узрока губитка приноса житарица. С друге стране, учешће кукуруза у укупној производњи житарица на нашем подручју износи 71%. Због тога је испитивање утицаја поплаве на биљке кукуруза изузетно важно за разумијевање механизма адаптивних одговора и селекцију отпорних хибрида. Иако поплава доводи до анаеробних услова за раст биљака она индукује повећану производњу реактивних врста кисеоника (ROS) у биљним ћелијама. ROS оксидативно оштећују ћелијске макромолекуле и на крају могу довести до смрти ћелије. Да би се заштитиле од ROS, биљке активирају антиоксидативни метаболизам (ензимски антиоксиданси: супероксид дисмутаза, (SOD), каталаза (CAT) и пероксидазе Класе III (POX) и неензимски антиоксиданси као што су фенолна једињења (PhOH). Циљ нашег рада је био да се испита биохемијски одговор два хибрида кукуруза (ЗП 555 и ЗП 606) на

Цитирање: Трифковић Т, Лукић Н, Шушкало Н, Давидовић Плавшић Б, Кукавица Б (2023) Биохемијски одговор биљака кукуруза на поплаве. У: Јакуповић Е, Говедар З (уредници) Значај климатских промјена за животну средину. Академија наука и умјетности Републике Српске, Бања Лука, Зборник радова: 17–46

Cite as: Trifković T, Lukić N, Šuškalo N, Davidović Plavšić B, Kukavica B (2023) Biochemical response of maize plants to short-term flooding. In: Jakupović E, Govedar Z (eds) Significance of forest ecosystems for the environment. Academy of Sciences and Arts of the Republic of Srpska, Banja Luka, Proceedings: 17–46

поплаву изазвану дјелимичним потапањем биљака током 72 h. Праћене су промјене оксидативних (H_2O_2 и малондиалдехида (MDA)) и антиоксидативних (SOD, CAT, POX и PhOH) параметара током трајања поплава, као и разлике у одговору хибрида. Резултати су показали да промјене концентрације оксидативних параметара нису биле значајне између третираних и контролних биљака код оба хибрида током трајања поплаве, што указује на снажан одговор антиоксидативног метаболизма. Међутим, уочене су разлике у антиоксидативном одговору између хибрида: ЗП 606 је имао јачи ензимски одговор, док је хибрид ЗП 555 имао јачи неензимски одговор. Иако наши резултати указују да су оба хибрида отпорна на краткотрајну поплаву, да би се окарактерисали као толерантни хибриди, потребна су додатна истраживања у смислу испитивања утицаја развојног стадијума биљака и трајања поплаве.

Кључне ријечи: ЗП 555 и ЗП 606 хибриди, антиоксидативни метаболизам, липидна пероксидација, хипоксија, реактивне врсте кисеоника

1. Увод

Биљке су у току свог животног циклуса изложене дејству различитих фактора спољашње средине који негативно утичу на њихов раст и развој, распрострањење и продуктивност (Стикић и Јовановић, 2012; Кукавица и сар. 2017). Један од најчешћих фактора средине који негативно утиче на биљке су поплаве. На глобалном нивоу, поплаве представљају веома велику пријетњу, јер доводе до смањења и квалитета и квантитета приноса, а очекују се још озбиљнији плавни сценарији у блиској будућности (Jia et al. 2021). Може се разликовати неколико нивоа поплаве код биљака: (1) поплављен је само коријен, (2) поплављен је коријен и мањи дио изданка (дјелимична поплава) и (3) поплављен је коријен и изданак са листовима (потпуна поплава) (Jia et al. 2021).

Убрзо, као посљедица поплава, долази до смањења концентрације кисеоника прво у земљишту, а затим и у коријењу биљака (Сарон et al. 2009). Дефицит кисеоника (хипоксија) или његово потпуно одсуство (аноксија) доводи до оштећења коријења, смањеног раста и приноса биљака. Спорија дифузија кисеоника, мања растворљивост (Gambrell et al. 1991) и пораст активности микроорганизама не само да смањују концентрацију кисеоника у земљишту, него доводе до ослобађања токсичних органских и неорганских материја у земљиште (Jia et al. 2021). Одговор биљака на хипоксију и аноксију, изазваним поплавама, зависе од различитих фактора, као што су дужина трајања стреса, биљна врста, животни циклус биљака и слично.

Како би преживјеле стрес изазван поплавом, биљке су развиле различите морфолошко-анатомске адаптације: формирају паренхим испуњен водом (аеренхим) обезбјеђујући на тај начин резервоар ваздуха, затим генеришу адвентивно коријење (McNamara and Mitchell, 1989) и формирају баријере које спрјечавају губитак кисеоника (Pan et al. 2021). Аеренхим представља биљно ткиво које је прожето великим интерцелуларима. Интерцелуларни простор омогућава стварање резервног пута за размјену гасова између коријења који се налази у условима хипоксије и аеробног изданка (Jackson and Armstrong, 1999). Са друге стране, адвентивно коријење може да замијени примарно коријење, одржавајући метаболички циклус и омогућавају нормалан раст и развој (Xu et al. 2016; Eysholdt-Derzso and Sauter, 2019).

Осим морфолошко-анатомских, биљке активирају и физиолошко-биохемијске адаптације у одговору на поплаву. Физиолошко-биохемијске промјене се дешавају у метаболизму биљних ћелија: процесима фотосинтезе и дисања, синтези одређених хормона, као и синтези антиоксиданаса (Jia et al. 2021; Pan et al. 2021).

Дефицит кисеоника, као електрон акцептора, доводи до изостанка аеробне респирације те преласка на анаеробни метаболизам, како би се обезбиједила довољна количина енергије за раст и развој биљака. Анаеробни метаболизам за посљедицу има акумулацију етанола, лактата, аланина, γ -аминобутерне киселине (GABA), сукцината и малата (Fan et al. 1997). Алкохолна и млијечна ферментација заједно са повећаном концентрацијом H^+ и хидролизом АТФ доводе до смањења рН цитоплазме (Gout et al. 2001). Смањена синтеза АТФ и смањени рН цитоплазме су у директној вези са редукцијом раста и приноса биљака (Ooume et al. 2009). Такође, многе биљке акумулирају и аланин који регулише рН у условима хипоксије и аноксије (de Sousa and Sodek, 2003; Miyashita et al. 2007).

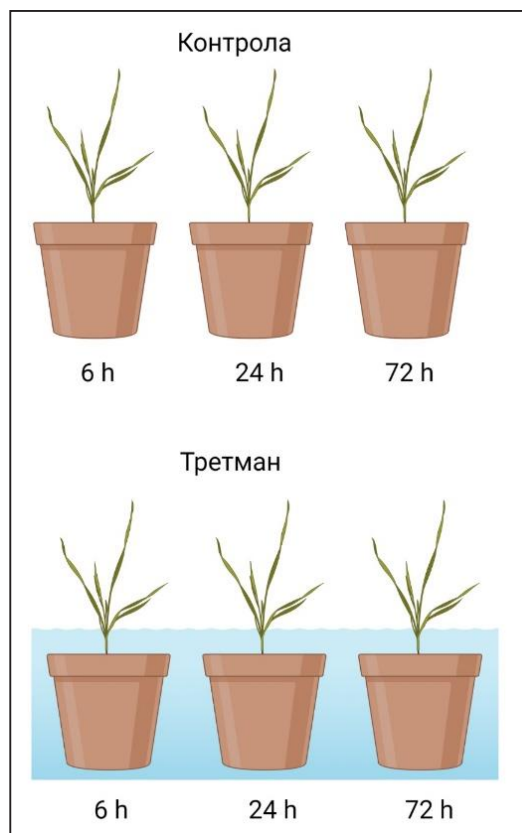
Осим тога, поплава за посљедицу има акумулацију штетних молекула, као што су реактивне врсте кисеоника (*reactive oxygen species*, ROS) од који су најзначајнији супероксид анион радикал ($O_2^{\cdot-}$) водоник пероксид (H_2O_2), и хидрокил радикал (OH^{\cdot}) (Mittler, 2002; Choudhury et al., 2017). Реактивне врсте кисеоника су производи метаболизма у физиолошким условима, а при утицају различитих врста стреса из спољашње средине на биљке концентрација ROS може бити повећана. При нижим концентрацијама ROS дјелују као сигнални молекули и омогућавају регулацију ћелијског одговора на различите врсте стреса док су при вишим концентрацијама штетне за ћелију. Повећана концентрација реактивних врста у ћелији се означава као оксидативни стрес (Jia et al. 2021). У условима оксидативног стреса ROS могу изазвати оштећења биомолекула, а као крајњи резултат доводе до оштећења ћелија и ткива. Инхибиција фотосинтетичког електротранспортног ланца, при поплави, директ-

но доводи до пораста концентрације ROS и оксидативног стреса (Ashraf 2009). Повећана концентрације, посебно OH^{\bullet} и H_2O_2 , има за последицу директно оштећење мембранских липида. Као производ липидне пероксидације настаје велика концентрација малондиалдехида (MDA) (Ahmed et al. 2002; Hossain et al. 2009). Осим липида, поплава доводи до деградације протеина и инактивације ензима преко SH група (Sairam et al. 2005). Као одговор на оштећења настала дејством ROS, биљке стимулишу синтезу и активацију ензимских (супероксид дисмутазе (SOD), пероксидазе класе III (POX), каталазе (CAT)) и неензимских (фенолиних једињења, каротеноида, токоферола, флавоноида и слично) антиоксиданата који чине антиоксидативни механизам заштите ћелије (Caverzan et al. 2016). Антиоксиданти уклањају штетне молекуле или их преводе у мање штетне облике и на тај начин омогућавају нормално функционисање ћелије. Супероксид дисмутазе су ензими који катализују разградњу супероксид анион радикала до водоник пероксида и воде, док каталаза преводи водоник пероксид у воду и кисеоник. Пероксидазе класе III катализују уклањање водоник пероксида уз потрошњу фенолних једињења као редуктаната. Као неензимски антиоксиданси, фенолна једињења своју антиоксидативну активност остварују способношћу да донирају водоникове атоме реактивним врстама кисеоника формирајући мање реактивне феноксил радикале (Кукавица и сар. 2017) у директним реакцијама или као супстрати POX. У условима поплаве, концентрација ROS се повећава и биљке активирају антиоксидативну ензимску и неензимску заштиту у циљу одржања редокс хомеостазе неутралисањем ROS и/или штетних ефеката ROS (Zhang et al. 2007; Bin et al. 2010; Doupis et al. 2017; Hasanuzzaman et al. 2020). Ефикасност антиоксидативног метаболизма зависи од биљне врсте, развојног стадијума биљке као и интензитета и дужине трајања стреса (Pan et al. 2021).

Када су у питању досадашња истраживања поплаве, већина истраживања су као модел организме користили биљке из влажних подручја, као што су рижа, *Arabidopsis sp.* и *Rumex sp.*, док је мања пажња посвећена биљкама терестричних подручја, као што су пшеница, кукуруз, јечам, парадајз или соја (Jia et al. 2021). Истраживања ових пољопривредних култура је веома важно, а нарочито проучавање адаптација на поплаву различитих хибрида исте врсте, у циљу идентификације хибрида толерантних на поплаве. Овакве студије могу обезбиједити информације неопходне за хибридизацију врста и креирање генотипова отпорних на поплаву. Осим тога, пошто поплаве доводе до акумулације токсичних материја као што су ROS и MDA, проучавање промјена у оксидативном и антиоксидативном механизму биљака изложених поплави је од круцијалног значаја. Давањем одговора на претходно поменута питања ће омогућити боље разумијевање механизма аклиматизације биљака на поплаву, те омогућити ефикаснију селекцију

нових хибрида који су резистентни на поплаву. Циљ нашег рада је био да се испита утицај краткотрајне поплаве (у трајању од 72 сата) на оксидативне и антиоксидативне параметре у листовима два хибрида кукуруза (ЗП 555 и ЗП 606). Промјене оксидативних и антиоксидативних параметара би могле указати на осјетљивост/толерантност хибрида на краткотрајну поплаву као и на разлике у одговору на услове поплаве између хибрида.

2. Материјал и методе



Слика 1. Шематски приказ поставке експеримента: контролне биљке и биљке изложене поплави (третман). Шема је израђена помоћу програма Biorender.com.

Figure 1. Scheme of experiment setup: control plants and plants exposed to flood (treatment). Created with BioRender.com

За експеримент су кориштени хибриди кукуруза (ЗП 606 и ЗП 555) са Института за кукуруз "Земун Поље", Београд. Експеримент је урађен у експерименталној просторији Природно-математичког факултета Универзитета у Бањој Луци. У експерименту су кориштена два хибрида кукуруза: ЗП 606 (у даљем тексту означен као Х606) и ЗП 555 (у даљем тексту означен као Х555). Сјемења су наклијана, а затим посијана у саксије (12 L, 10 саксија) напуњене супстратом Klasman TS3 Deliman (Њемачка). У једну саксију је посађено 10 биљка у размаку од 5 cm. За сваки хибрид је посађено 100 биљка кукуруза. Након 28 дана раста у контролисаним условима (температура 25 °C, свјетлосни режим 16/8 (свјетло/мрак) при јачини од 2200 lux уз наводњавање у оптималној количини чесменске воде) биљке су подијељене у експерименталне групе: контролна група (К) и група изложена поплави у трајању од 6, 24 и 72 часа (Т) (Слика 1). Поплава је изазвана постављањем саксија са засадима кукуруза у велике базене (70 L) напуњене водом која је

допирала до 15 cm од нивоа земљишног супстрата (Слика 2). На тај начин је коријенов систем кукуруза и дио стабљике био изложен условима хипоксије (недостатак кисеоника). Узорковање листова кукуруза (контролне и експерименталне групе) је извршено након 6, 24 и 72 сата.

А)



Б)



Слика 2. Контролне биљке (А) и биљке изложене поплави (Б) гајене у лабораторисјким условима

Figure 2. Control plants (A) and plants exposed to flood (B) grown under laboratory conditions

Одређивање параметара оксидативног стреса

За одређивање концентрације MDA и H_2O_2 хомогенизовано је 1 g биљног ткива са 7 mL 0,1% TCA (трихлорсирћетна киселина). Хомогенат је центрифугиран на 10000 rpm, 20 минута на 4°C. За одређивање концентрације малондиалдехида (MDA) кориштен је метод Heath и Packer (1968), мијешањем 0,5 mL супернатанта и 1 mL 0,5% TBA (тиобарбитурна киселина) у 20% TCA (трихлорсирћета киселина). Узорци су потом загријавани 30 минута у воденом купатилу на 95 °C, охлађени и центрифугирани на 10000 rpm, 10 минута на 4 °C. Апсорбанца је мјерена на 532 и 600 nm. Концентрација је изражена у $\mu\text{mol g}^{-1}\text{FW}$ (FW-fresh weight, свјежа маса).

Израчунавање концентрације MDA:

$$c\text{MDA} = \frac{\Delta A_{532-600}}{\epsilon} \times \frac{V}{g\text{FW}}$$

cMDA- концентрација MDA

$\Delta A_{532-600}$ - разлика апсорбанци мјерених спектрофотометријски на 532 и 600 nm

ϵ – екстинкциони коефицијент MDA (155 mM^{-1})

V – запремина екстракта

g – маса свјежег биљног ткива

Концентрација је изражене у $\mu\text{mol g}^{-1}\text{FW}$

Спектрофотометријско одређивање концентрације водоник пероксида је рађено по методи Sergiev и сарадници (1997). Концентрација водоник пероксида је одређена мијешањем 0,5 mL супернатанта и 0,5 mL 10 mM Na-фосфатног пуфера pH 6,8 и 1 mL 1 M раствора KJ у трипликату. Смјеша је хомогенизована на вортексу и мјерена је апсорбанца на таласној дужини од 390 nm. Концентрација водоник пероксида је изражена у $\mu\text{mol g}^{-1}$ свјеже масе.

2.1. Екстракција солубилних протеина

У 0,5 грама уситњеног биљног ткива, оба хибрида, додато је 4 mL екстракционог пуфера (0,1 M Na-фосфатног пуфера pH 6,4 који садрже 1 mM PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride), 1% PVP (polivinilpirolidon) и 0,2% TWEEN 20 (нејонски детерџент, Polioksietilen Sorbitan естар). Хомогена смјеша је центрифугирана на 10000 rpm (обртаја по минути), 10 минута на 4°C и добијени супернатант је кориштен за одређивање концентрације протеина, активности каталазе (CAT), пероксидаза класе III (POX) и раздвајања изоформи пероксидаза класе III (POX) и супероксид дисмутаза (SOD) нативном и модификованом SDS (sodium dodecyl sulfate) електрофорезом.

2.2. Одређивање концентрације протеина

Одређивање концентрације протеина одређена је методом по Лорију (Lowry et al. 1951) мјерењем апсорбанце на 550 nm. Концентрација протеина је израчуната помоћу једначине правца калибрационе криве за BSA (говеђи серум албумин), $y=1,476x-0,0056$ и изражена је као $\text{mg g}^{-1}\text{FW}$.

2.3. Одређивање активности каталазе

Активност каталазе је одређена методом (Aebi, 1984). Реакциона смјеша (1 mL) за одређивање активности каталазе садржи 10 mM Na-фосфатни пуфер pH 6,8, 3% H_2O_2 и 35 μL екстракта. Мјерење активности је извршено спектрофотометријски, у трипликату, на таласној дужини 240 nm.

Израчунавање:

$$\text{САТ активности} = \frac{\Delta A_{t_0-t60} \times R}{\epsilon(\text{H}_2\text{O}_2) \times [\text{протеина}] \frac{\text{mg}}{\text{mL}}}$$

при чему су:

ΔA_{t_0-t60} - разлика апсорбанце 240 nm након 0 и 60 секунди

R- разблажење износи 28,57

ϵ - екстинкциони коефицијент за водоник пероксид ($40 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$)

Активност каталазе је изражена у $\mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ протеина.

2.4. Одређивање активности пероксидаза класе III

Активност пероксидазе Класе III је одређена методом (Teisseire, 2000). Реакциона смјеша (1 mL) за одређивање активности пероксидаза садржи 0,1 M Na-фосфатни пуфер рН 6,4 загријан на 37 °C, 0,5 M пирогалол, 1 M водоник пероксид и 30 μL екстракта листа кукуруза. Мјерење активности је извршено спектрофотометријски, у трипликату, на таласној дужини 430 nm.

$$\text{РОХ активност} = \frac{\Delta A_{t60-t0} \times R}{\epsilon(\text{пурпуригалин}) \times [\text{протеина}] \frac{\text{mg}}{\text{mL}}}$$

при чему су:

ΔA_{t60-t0} - разлика апсорбанце на 60 и 0 секунди

R- разблажење износи 33,33

ϵ – екстинкциони коефицијент за пурпуригалин ($12 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$);

Активност пероксидаза је изражена у $\mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ протеина

2. 5. Нативна електрофореза: визуелизација активности и одређивање изоформи пероксидаза класе III и супероксид дисмутаза

Раздвајање изоформи РОХ и SOD рађено је нативном електрофорезом на дисконтинуалном полиакриламид гелу (PAGE) при чему је кориштен 5% гел за концентровање и 10% гел за раздвајање.

Прије наношења на гел, узорци су помијешани са пуфером за узорке (50 mM Tris рН 6,8, 10% глицерол и 0,01% бромфенол плаво) у односу 2:1 и наношено је по 10 μg протеина за РОХ и SOD. Кориштен је пуфер за електрофорезу рН

8,3 (7,2 g глицина и 1,5 g Tris-a је растворено у 0,5 L дестиловане воде). По завршетку електрофорезе, гел је специфично обојен на активност пероксидазе Класе III и супероксид дисмутаза.

Специфично бојење пероксидаза Класе III

Раствор за бојење пероксидаза Класе III садржи 5 mg α -хлоронафтола, 5 mL метанола, 45 mL 0,1 M Na-фосфтног пуфера pH 6,4 и 50 μ L 30% водоник пероксида.

Специфично бојење супероксид дисмутаза

Раствор за бојење супероксид дисмутаза садржи 8 mg NBT (nitrobluetetrasolium), 2 mg рибофлавина, 40 mL 0,1 M Tris pH 7,8, 320 μ L 250 mM EDTA и 12 μ L TEMED. Гелови су због фотоосјетљивости заштићени фолијом и остављени на мјешалици 30 минута.

Након инкубације гелови су испрани дестиловном водом и освијетљени до појаве бијелих трака на љубичастом гелу. Након бојења гелови су скенирани, а интензитет изоформи POX и SOD су обрађени у програму TotalLab.

2.6. Модификована SDS електрофореза

Одређивање приближних молекулских маса POX изоформи у нативном облику је урађено примјеном модификоване SDS електрофорезе према Mika и Lühje (2003). Кориштена је вертикална дисконтинуална електрофореза са 5% гелом за концентровање и 12% гелом за раздвајање. Оба гела су садржавала 1% SDS. Узорци су прије наношења на гел помијешани са пуфером за узорке који садржи 0,05 M Tris pH 6,8, 1% SDS, 10% глицерол и 0,001% боје бромфенол плаво. Наношено је по 10 μ g протеина узорка за оба хибрида. Потом су гелови пренешени у каду за електрофорезу која је испуњена пуфером за електрофорезу (3 g Tris, 14,4 g глицина, 10 mL 10% SDS растворено је у 1 L дестиловане воде). Кориштена су два специфична бојења гела, бојење са алфа-хлоронафтолом и 3,3 диаминобензидином.

Специфично бојење POX са α -хлоронафтолом

Раствор за бојење α -хлоронафтолом садржи 10 mg нафтола, 10 mL метанола, 90 mL 0,1 M NaPi пуфера pH 6,4 и 100 μ L 30% H₂O₂ (додат непосредно пред бојење).

Специфично бојење POX са 3,3 диаминбензидином (DAB)

Раствор за бојење 3,3 диаминбензидином садржи 21,43 mg DAB, 99,9 mL 0,1 M Na-фосфатног пуфера pH 6,4 и 100 μ L 30% H₂O₂ (додат непосредно пред бојење).

Приближне молекулске маса изоформи у нативном облику су одређене на основу одговарајућих Rf вриједности у програму TotalLab, помоћу калибрационе криве за протеине стандарда, која је добијена цртањем графика електрофоретске мобилности протеинских изоформи (Rf) у односу на $\log M_w$.

2.7. Спектрофотометријско одређивање концентрације фенолних једињења

Одређивање концентрације фенолних једињења (PhOH) је урађено по методи Singleton и Rossi, (1965). Екстракт за одређивање концентрације фенолних једињења добијен је хомогенизацијом 0,5 g свјеже масе листа кукуруза са 5 mL 80% метанола. Хомогенат је центрифугиран 10 минута на 10000 rpm и добијени супернатант, 100 μ L, је помијешан са 450 μ L Фолин-Чикалтеовог реагенса (разблажен у односу 1:2 са дестилованом водом). Смјеша је инкубирана 5 минута на тамном, а потом је додато 450 μ L 1 M Na₂CO₃, измијешано на вортексу и инкубирано 60 минута на тамном.

Након инкубације мјерена је апсорбанца на 724 nm.

Израчунавање:

Квантификација концентрације фенолних једињења је извршена на основу једначине правца калибрационе криве за галну киселину ($y=0,613x - 0,0161$) и изражена је као еквивалент галне киселине (GAE) по граму свјеже масе.

2.8. Спектрофотометријско одређивање концентрације фотосинтетичких пигмената

За одређивање концентрације фотосинтетичких пигмената кориштен је екстракт добијен хомогенизацијом 0,5 g свјеже масе листа кукуруза са 5 mL 80% метанола. Хомогенат је центрифугиран 10 минута на 10000 rpm и добијени супернатант (екстракт) је кориштен за одређивање концентрације фотосинтетичких пигмената. Концентрација фотосинтетичких пигмената хлорофил А и хлорофил Б добијене су мјерењем апсорбанце на таласним дужинама 660 nm (хлорофил А, Chl A) и 652 nm (хлорофил Б, Chl B). Екстракт листа кукуруза (100 μ L) је разблажен са 2900 μ L метанола, а затим су мјерене апсорбанце на одговарајућим таласним дужинама.

Израчунавање:

$$c(\text{Chl A}) = 15,65 \times A_{660} - 7,34 \times A_{653}$$

$$c(\text{Chl B}) = 27,05 \times A_{653} - 11,21 \times A_{660}$$

Резултати су изражени у mg/gFW, те је за прерачунавање истих кориштена сљедећа формула:

$$c = \frac{c_x \times V \times R}{m \times 1000} \text{ [mg/gFW]}$$

c_x – концентрација пигмената

V – запремина екстракта

R – разблажење износи 30

m – маса биљног ткива

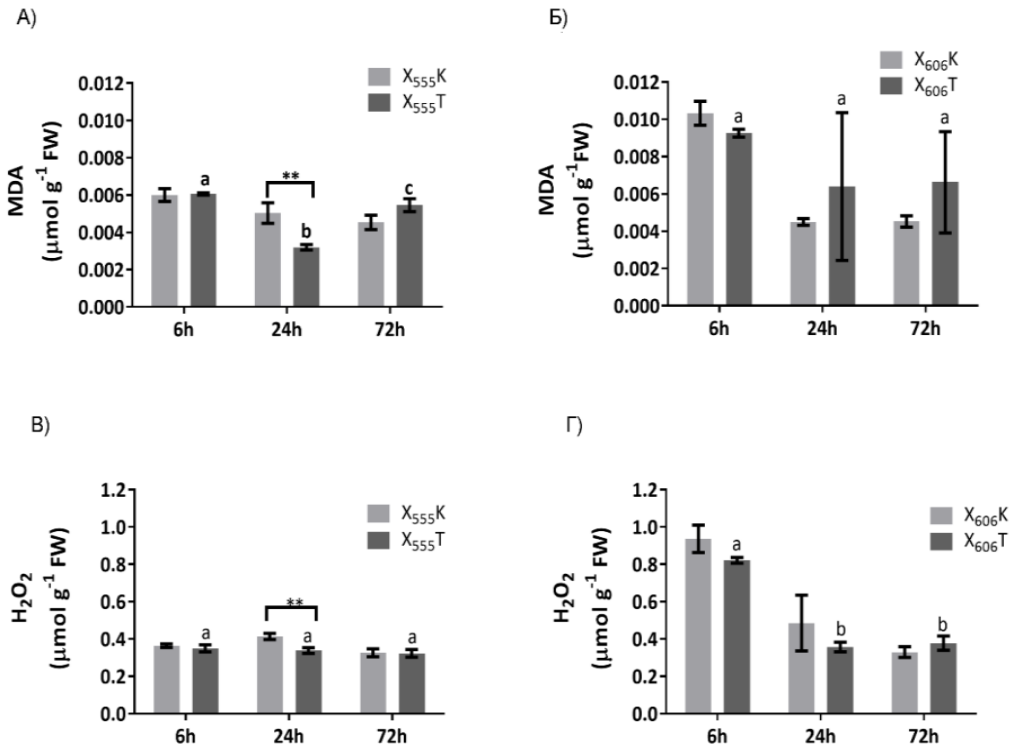
2.9. Статистичка обрада података

Резултати су приказани као средња вриједност \pm стандардна девијација. Подаци су обрађени коришћењем два програма GraphPad Prism и Jamovi. Одређивање статистички значајних разлика мјерених параметара током трајања поплаве, као и поређење контролних биљака и биљака изложених поплави оба хибрида, је урађено коришћењем Two-way ANOVA. Одређивање Пирсонових коефицијената корелације између мјерених параметара је одређено помоћу програма Jamovi.

3. Резултати и дискусија

3.1. Параметри оксидативног стреса

Наши резултати показују да се концентрација MDA током краткотрајне хипоксије изазване поплавом, у трајању од 72 часа, смањује и да је најнижа концентрација измјерена након 24 часа код оба хибрида: 0,0064 $\mu\text{mol g}^{-1}$ FW код хибрида Х606 и 0,0032 $\mu\text{mol g}^{-1}$ FW код хибрида Х555 (Слика 3А и 3Б). У односу на контролне биљке, концентрација MDA код оба хибрида је на крају поплаве порасла, +47% код хибрида Х606 односно +20% код хибрида Х555. Сличан тренд је присутан и код концентрације H_2O_2 која опада током трајања поплаве код оба хибрида. Најнижа концентрација H_2O_2 је измјерена на крају поплаве и износи 0,3779 $\mu\text{mol g}^{-1}$ FW код хибрида Х606, односно 0,3229 $\mu\text{mol g}^{-1}$ FW код хибрида Х555 (Слика 3В и 3Г). У односу на контролне биљке, концентрација H_2O_2 на почетку поплаве је нешто нижа, осим на крају третмана, гдје је измјерен пораст концентрације (+15%) код хибрида Х606, иако та разлика није статистички значајна. Jamei и сарадници (2008) указују да је повећана концентрација H_2O_2 и MDA у односу на контролне биљке нарочито изражена након 96 часова поплаве и да са трајањем поплаве концентрација наведених параметара оксидативног стреса расте.



Слика 3. Утицај поплаве на концентрацију малондиалдехида (MDA) код хибрида Х555 (А) и хибрида Х606 (Б) и на концентрацију водоник пероксида (H₂O₂) код хибрида Х555 (В) и хибрида Х606 (Г). Резултати су приказани као средња вриједност ± СД (стандардна девијација). Мала слова означавају статистички значајну разлику вриједности параметара хибрида у односу на трајање поплаве изражене у сатима. Звјездице представљају статистички значајну разлику вриједности параметара хибрида у односу на контролне биљке, при чему број звјездица има одговарајућу р вриједност.

Figure 3. Effect of flood on the concentration of malonyl-dialdehyde (MDA) in hybrid H555 (A) and hybrid H606 (B) and on the concentration of hydrogen peroxide (H₂O₂) in hybrid H555 (V) and hybrid H606 (G).

Results are presented as mean ± SD. Small letters indicate a statistically significant difference in the values of the hybrid parameters in relation to the duration of the flood expressed in hours. Asterix represent a statistically significant difference in the values of hybrid parameters compared to control plants, where the number of asterisks has the corresponding p value.

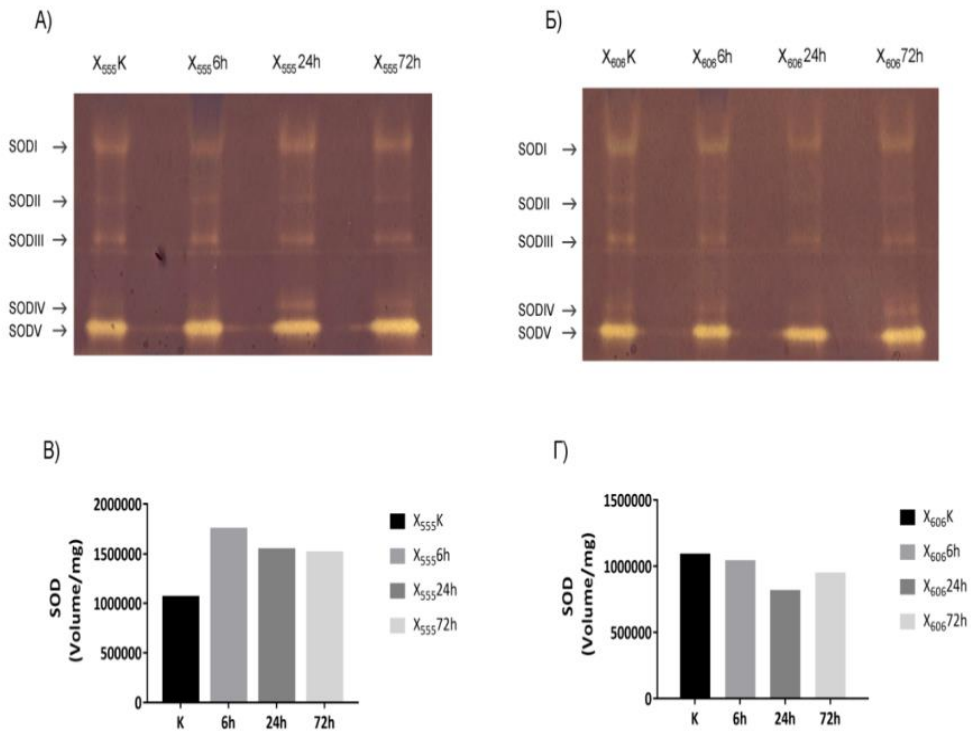
* p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001, **** p < 0,0001

Дужина трајања поплаве могла би бити разлог за разлике у односу на наше резултате. Утицај поплаве на биљке кукуруза манифестује се оштећењем липидног двослоја што за посљедицу има промјене у пермеабилности мембрана. Индикатор који показује да је дошло до оштећења ћелијске мембране је повећана концентрација малондиалдехида који се акумулира у ћелији (Jamei et al. 2008). Према томе, MDA се користи као индикатор оксидативног оштећења и мјерењем његове концентрације одређује се степен оштећења ћелијске мембране. Истраживања утицаја поплаве на биљке кукуруза показују да се концентрација MDA током трајања поплаве повећава, нарочито током дуготрајне поплаве у трајању од 144 и 192 часа (Jamei et al. 2008; Lukić et al. 2021). Пораст концентрације MDA током трајања поплаве је забиљежена и у другим биљним врстама (Anee et al. 2019). Повећану концентрацију MDA је пратила повећана концентрација H_2O_2 и супероксид анион радикала (Jamei et al. 2008; Anee et al. 2019). Jamei и сарадници (2008) су показали позитивну корелацију између акумулације H_2O_2 и концентрације MDA, указујући на везу између прекомјерне производње ROS и оксидативног оштећења липида, а самим тим и ћелијске мембране. Овакав резултат потврђују и наши резултати, односно позитивна корелација између концентрације H_2O_2 и MDA за хибрид X606 (Табела 1). Наши резултати указују на ниску концентрацију MDA и H_2O_2 , током хипоксије изазване поплавом, код оба хибрида, у трајању од 72 часа. Узимајући у обзир везу између концентрације ROS и MDA, можемо доћи до закључка да краткотрајна поплава, у нашем случају, није изазвала прекомјерну производњу ROS која би за резултат имала и повећану концентрацију MDA, као производа липидне пероксидације.

3.2. Ензимска антиоксидативна заштита

3.2.1. Активност и изоформе супероксид дисмутазе

У првој линији одбране аеробних организама од оксидативног стреса налази се ензим SOD који катализује разградњу супероксид анион радикала, као веома активне врсте кисеоника, до кисеоника и водоник пероксида (Gill and Tuteja, 2010, Sharma et al. 2012). Одређивање активности, као и броја изоформи SOD одређено је нативном електрофорезом, при чему је у контролним биљкама оба хибрида детектовано пет изоформи (Слика 4А и 4Б). Током трајања поплаве број изоформи код хибрида X555 је остао непромијењен, док код хибрида X606 изоформа SODII није детектована на почетку поплаве, током 6 и 24 часа. Активности свих изоформи за оба хибрида су сабране и изражене као укупне активности SOD (Слика 4В и 4Г). У односу на контролне биљке, активност SOD током трајања поплаве код хибрида X555 је повећана, при чему је активност на крају поплаве (72 часа) порасла +42% у односу на контролу (Слика 4В).



Слика 4. Утицај поплаве на изоформе супероксид дисмутаза (SOD), у контролним и третираним биљкама, код хибрида Х555 (А) и хибрида Х606 (Б). Укупна SOD активност хибрида Х555 (В) и хибрида Х606 (Г). Резултати су приказани као укупна вриједност активности свих изоформи, током трајања хипоксије, изражена као Volume/mg протеина

Figure 4. Effect of flood on superoxide dismutase (SOD) isoforms, in control and treated plants, in hybrid H555 (A) and hybrid H606 (B). Total SOD activity of hybrid H555 (V) and hybrid H606 (G). The results are presented as the total value of the activity of all isoforms, during the duration of hypoxia, expressed as Volume/mg proteins.

Активност SOD током трајања поплаве, код хибрида Х606, у односу на контролне биљке опада и на крају поплаве (72 часа) њена активност је нижа за -13% у односу на контролу (Слика 4Г). Као што можемо видјети из добијених резултата, активност SOD се током трајања поплаве различито мијења у зависности о типу хибрида. Код хибрида Х555 њена активност расте, док код хибрида Х606 њена активност опада. На различиту активност SOD поред трајања хипоксије изазване поплавом може да утиче и врста хибрида која се испитује, јер различити хибриди могу да имају различите механизме антиоксидативне заштите. Kumutha и сарадници (2009) су показали да је активност SOD изоформи код генотипа *Cajanus cajan* L. отпорнијег на плавлeње

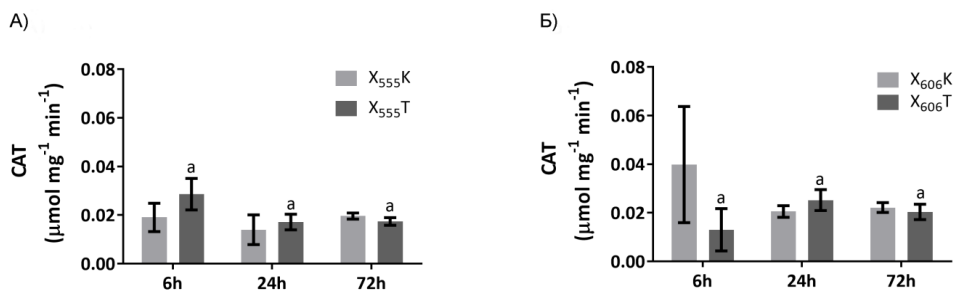
већа у односу на генотип осјетљивији на плављења до 80%. Такође, аутори су показали и да је код генотипа отпорнијег на плављења активност SOD расла током трајања поплаве (6 дана), док је код генотипа осјетљивијег на плављење измјерено смањење активности SOD након четвртог дана трајања поплаве. Уап и сарадници (1996) указују да краткотрајна поплава није имала штетан утицај на биљке кукуруза, те да се након петог дана поплаве јављају повреде биљака кукуруза као и смањена активност ензима SOD, односно повећање концентрације супероксид анион радикала. Сличан тренд промјене активности SOD добили су Лукић и сарадници (2021), који су измјерили пораст активности SOD током првих сати поплаве (до 72 часа), док је смањење активности SOD измјерено након 144 часа код оба генотипа кукуруза (ЗП 555 и ЗП 606). На основу добијених резултата, као и радова других аутора можемо закључити да краткотрајна поплава може довести до повећане активности SOD, а да до смањења активности долази са продужетком трајања поплаве.

3.2.2. Активност каталазе

У односу на контролне биљке, већа активност каталазе (CAT) код хибрида Х555 је измјерена након 6 (+50%) и 24 часа (+23%) поплаве, а код хибрида Х606 након 24 часа (+23%) поплаве. На крају третмана (72 часа) измјерена је нижа активност каталазе, код оба хибрида, у односу на контролне биљке (Слика 5А и 5Б). Код хибрида Х555 активност се смањила за -11%, а код хибрида Х606 -8%. Ипак, наведене разлике у активности каталазе, између третираних и контролних биљака кукуруза оба хибрида нису биле статистички значајне.

Повећање активности каталазе током првих сати поплаве измјерили су Јамеј и сарадници (2008). Аутори указују да краткотрајна поплава у трајању од 48 часова индукује активност каталазе, пошто је у том периоду активност каталазе била виша у биљкама кукуруза изложеним поплави, него у контролним биљкама. Значајано смањење у активности каталазе аутори су забиљежили након 96 часова трајања поплаве, при чему је смањење активности CAT са продужавањем третмана било све израженији. О значају каталазе у заштити од оксидативног стреса, током првих сати поплаве, говори и рад Chugh и сарадника (2012). Аутори указују да повећана активност ензима SOD, CAT и APX има значајну улогу у заштити биљака кукуруза од дјеловања краткотрајне поплаве.

Наши резултату су у складу са наведеним истраживањима, на основу којих можемо рећи да CAT има значајну улогу у антиоксидативној заштити хибрида Х555 и Х606 током првих сати хипоксије изазване поплавом када је њен допринос антиоксидативној заштити највећи.



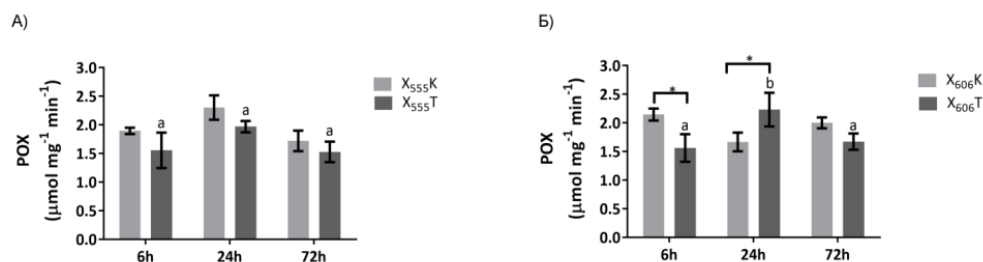
Слика 5. Утицај поплаве на ензимску активност каталазе (CAT) у контролним и третираним биљкама, код хибрида Х555 (А) и Х606 (Б).

Figure 5. Effect of flood on catalase enzyme activity (CAT) in control and treated plants for hybrids H555 (A) and H606 (B).

3.2.3. Активност пероксидаза класе III са пирогалолом као супстратом

У односу на контролне биљке активност POX је нижа, осим за хибрид Х606 након 24 часа поплаве гдје је измјерен пораст активности POX за +39%, што је и статистички значајна разлика ($p=0,0293$). Најнижа активност POX, код оба хибрида, измјерена је након 6 часова поплаве, а потом је активност благо расла и највише вриједности су након 24 часа поплаве (Слика 6). Пораст активности POX након 24 часа трајања поплаве, у односу на почетак (6 h), код хибрида Х555 износи +27% односно +49% код хибрида Х606 ($p=0,0093$).

Поплава, као врста стреса, доводи до повећане пермеабилности ћелијске мембране чиме се садржај MDA и H_2O_2 повећава (Lin et al. 2006). Аутори су добили негативну корелацију ($p=0,0001$; $R=-0,9686$) између садржаја MDA и активности POX током трајања поплаве, што указује на значај POX током превенције липидне пероксидације. Bin и сарадници (2012) су показали да поплава у трајању од 96 сати, индукује пораст активност POX у листовима кукуруза, док са продужетком хипоксије изазване поплавом активност опада. Yadav и Srivastava (2017) су измјерили пораст активности POX током поплаве која је трајала 6 дана, с тим да је већа активност ензима измјерена у хибриду који је отпорнији на поплаву. Наши резултати указују да поплава у трајању од 72 часа није изазвала значајне разлике у активности POX мјерене са пирогалолом као супстратом током трајања поплаве.



Слика 6. Утицај поплаве на ензимску активност пероксидазе класе III (POX) у контролним и третираним биљкама, код хибрида Х555 (А) и Х606 (Б). Резултати су приказани као средња вриједност \pm СД. Мала слова означавају статистички значајну разлику вриједности параметара хибрида у односу на трајање поплаве изражене у сатима. Звјездице представљају статистички значајну разлику вриједности параметара хибрида у односу на контролне биљке, при чему број звјездица има одговарајућу p вриједност.

Figure 6. Effect of flood on the enzymatic activity of peroxidase class III (POX) in control and treated plants, for hybrids H555 (A) and H606 (B).

Results are presented as mean \pm SD. Small letters indicate a statistically significant difference in the values of the hybrid parameters in relation to the duration of the flood expressed in hours. Asterisk represent a statistically significant difference in the values of hybrid parameters compared to control plants, where the number of asterisk has the corresponding p value.

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$

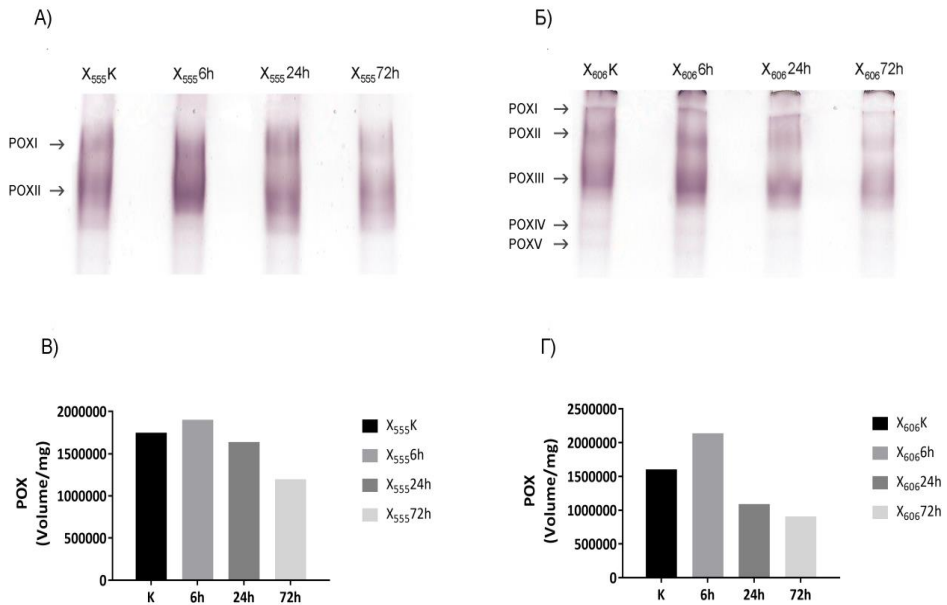
3.2.4. Активност и изоформе пероксидаза класе III са супстратом хлоронафтолом

Нативном електрофорезом детектовали смо пет POX изоформи код хибрида Х606, односно двије код хибрида Х555 са α -хлоронафтолом као супстратом (Слика 7А и 7Б). Активности свих изоформи за оба хибрида су сабране и изражене као укупне активности POX у односу на α -хлоронафтолом као супстрат (Слика 7А и 7Б). У односу на контролне биљке, укупна активност POX на почетку поплаве (након 6 часова) је порасла код оба хибрида. Пораст активности код хибрида Х555 износила је +8% (Слика 7В), а код хибрида Х606 +33% (Слика 7Г). Са наставком третмана, активност изоформи POX се смањила и најнижа активност је измјерена на крају поплаве, након 72 часа.

Смањење активности изоформи POX, током трајања поплаве, у складу је са резултатима до којих су дошли Риуанга и сарадници (2015). Аутори су измјерили смањење активности већег броја изоформи POX током изложености врсте *Poa pretensis* L. поплави, али и повећање активности двије изоформе за које сматрају да имају значајну улогу у уклањању ROS током трајања поплаве. Наши резултати такође указују да се поједине изоформе издвајају по својој актив-

ности од осталих, а то су изоформа POXIII, код хибрида Х606 (Слика 7Б), односно изоформа POXII код хибрида Х555 (Слика 7А). Иако се њихова активност током трајања поплаве смањује, сматрамо да имају значајну улогу у почетној фази поплаве.

Наши резултати такође показују да се тренд промјена активности POX у третираним биљкама разликује у односу на кориштени тип супстрата: пирогалол и α -хлоронафтолом. Код пирогалол POX активност је најнижа током 6 часова поплаве, а потом расте (Слика 6), док је код α -хлоронафтол POX активност највиша током 6 часова поплаве, а потом опада (Слика 7В и 7Г).



Слика 7. Утицај поплаве на изоформе пероксидаза класе III (POX) у контролним и третираним биљкама, код хибрида Х555 (А) и хибрида Х606 (Б) и на активност изоформи код хибрида Х555 (В) и хибрида Х606 (Г). Резултати су приказани као укупна вриједност активности свих изоформи током трајања поплаве, изражена као Volume/mg протеина.

Figure 7. Effect of flood on isoforms of class III peroxidase (POX) in control and treated plants for hybrid H555 (A) and hybrid H606 (B) and on the activity of isoforms in hybrid H555 (V) and hybrid H606 (G). The results are presented as the total value of the activity of all isoforms, during the duration of flood, expressed as Volume/mg proteins

3.2.5. Приближне молекулске масе изоформи пероксидаза класе III

Модификованом SDS електрофорезом су раздвојене изоформе POX у узорцима листа оба хибрида у циљу одређивања приближних молекулских маса изоформи у њиховој 3Д конформацији при чему су као супстрати кориштени α -хлоронафтол (Слика 8А и 8Б) и диаминобензидин (DAB) (Слика 8В и 8Г).

Са α -хлоронафтолом као супстратом у контролним биљкама хибрида Х606 детектоване су 4 POX изоформе са приближним молекулским масама: POXI 229,08 kDa; POXII 138,04 kDa; POXV 79,4 kDa и POXVIII 47,86 kDa. С друге стране, у контролним биљкама хибрида Х555 детектована је једна POX изоформа са приближним молекулском масом POXII 134,9 kDa. Код оба хибрида, као вид антиоксидативне заштите, индукована је синтеза нових изоформи POX, при чему се након 72 часа поплаве детектује седам изоформи (Слика 8А и 8Б).

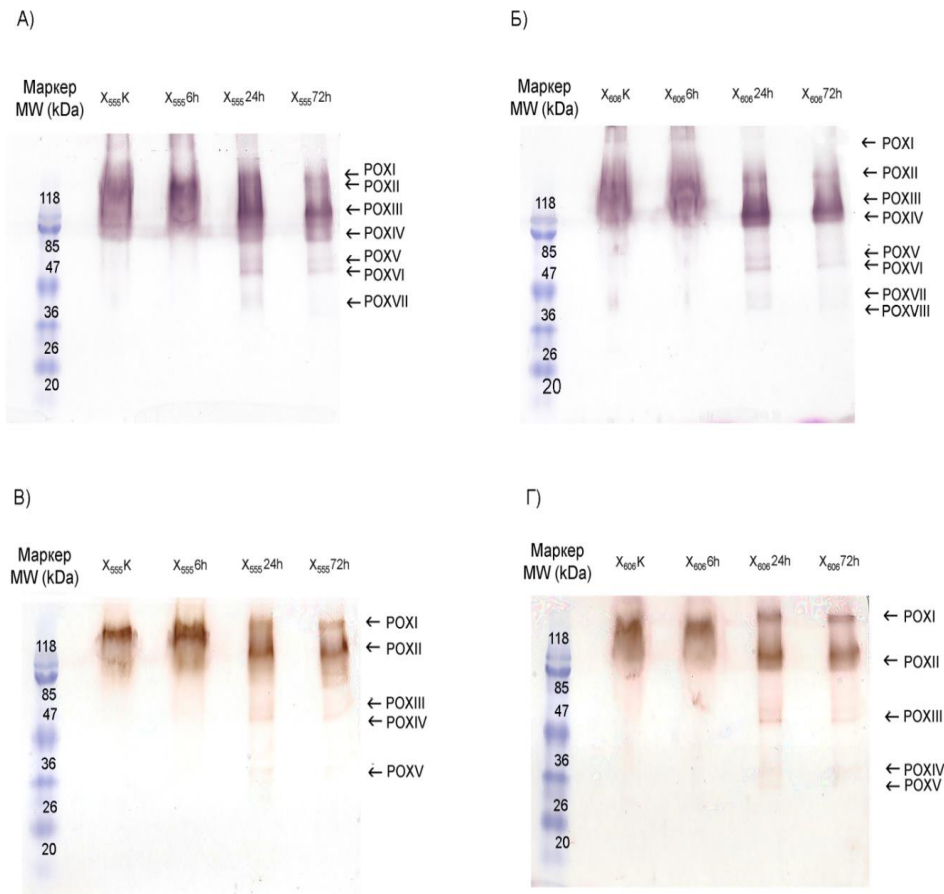
Са диаминобензидином као супстратом, у контролним биљкама хибрида Х606 детектована је једна POXI приближне молекулске масе 134,9 kDa. Такође, и у контролним биљкама хибрида Х555 је детектована једна изоформа POXI приближне молекулске масе 128,82 kDa.

Најмањи број изоформи је детектован на почетку поплаве, код оба хибрида. Са продужетком поплаве број изоформи се повећао и највећи број је детектован након 24 часа, код оба хибрида (Слика 8В и 8Г).

Број изоформи POX са α -хлоронафтолом и диаминбензидином се разликује. Са α -хлоронафтолом као супстратом, код хибрида Х606 индукована је синтеза изоформи POXIII, POXIV, POXVI, а код хибрида Х555 синтеза POXI, POXIII, POXIV, POXV, POXVI и POXVII. С друге стране, са диаминбензидином као супстратом, поплава је код оба хибрида индуковала синтезу изоформи POXII, POXIII, POXIV и POXV.

Такође, поплава је узроковала и инхибицију активности појединих изоформи, али у много мањем обиму него у случају синтезе. Са α -хлоронафтолом као супстратом, код хибрида Х606 инхибирана је активност изоформе POXI, а код хибрида Х555 активност изоформе POXII. Са диаминбензидином као супстратом, код хибрида Х606 инхибирана је активност изоформе POXV, а код хибрида Х555 активност изоформи POXIV и POXV.

Бојењем гелова α -хлоронафтолом, детектовано је више изоформи POX, у контролним биљкама, као и у биљкама изложених поплави, у оба генотипа кукуруза. Ипак, оно што је заједничко за оба супстрата јесте индукција синтезе нових изоформи POX током трајања поплаве у односу на контролне биљке.



Слика 8. Визуелизација изоформи POX, бојењем са α -хлоронафтолом хибрида X555 (А) и X606 (Б) и бојењем са диаминбензидином (DAB) у контролним и третираним биљкама хибрида X555 (В) и X606 (Г) добијених модификованом SDS електрофорезом.

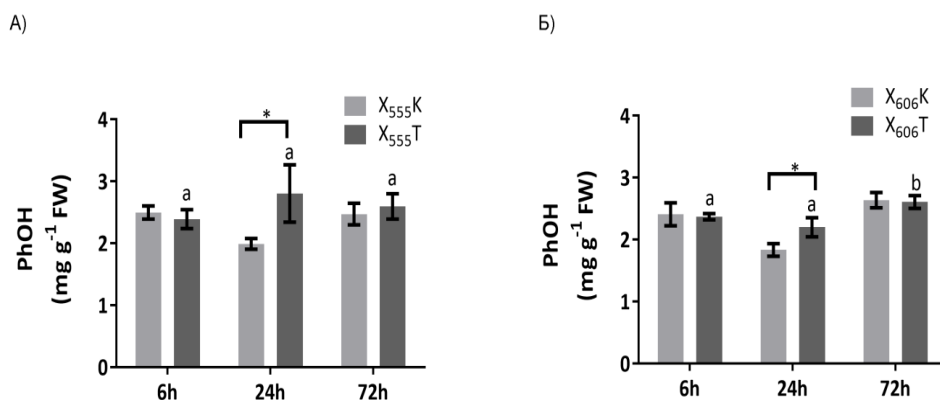
Figure 8. Visualization of POX isoforms, by staining with α -chloronaphthol of hybrids H555 (A) and H606 (B) and by staining with diaminebenzidine (DAB) in control and treated plants of hybrids H555 (V) and H606 (G) obtained by modified SDS electrophoresis.

Наши резултати указују да су POX важна карика антиоксидативног одговора биљака кукуруза у условима краткотрајне поплаве. Такође, резултати указују да се у одговору на поплаву активирају специфичне POX изоформе као и да је улога супстрата изузетно важна за активацију специфичних POX.

3.2.6. Концентрација фенолних једињења

Концентрација фенолних (PhOH) једињења у третираним биљкама оба генотипа кукуруза се разликује статистички значајно у односу на контролне биљке у другој тачки поплаве (након 24 часа) гдје је забиљежен пораст концентрације фенолних једињења у биљкама изложеним поплави (Слика 9).

Пораст концентрације фенолних једињења након 24 часа у односу на контролне биљке, код хибрида Х555 износи 41% ($p=0,0111$), односно 20% ($p=0,0372$) код хибрида Х606. Концентрација фенолних једињења, код третираних биљака оба хибрида, на почетку (6 сати) и на крају поплаве (72 сата) се нису разликовале значајно од контролних биљака.



Слика 9. Утицај поплаве на концентрацију фенолних једињења (PhOH) у контролним и третираним биљкама кукуруза, код хибрида Х555 (А) и Х606 (Б).

Резултати су приказани као средња вриједност \pm СД (стандардна девијација). Мала слова означавају статистички значајну разлику вриједности параметара хибрида у односу на трајање поплаве изражене у сатима. Звјездице представљају статистички значајну разлику вриједности параметара хибрида у односу на контролне биљке, при чему број звјездица има одговарајућу p вриједност.

Figure 9. Effect of flood on the concentration of phenolic compounds (PhOH) in control and treated maize plants, in hybrids H555 (A) and H606 (B).

Results are presented as mean \pm SD. Small letters indicate a statistically significant difference in the values of the hybrid parameters in relation to the duration of the flood expressed in hours. Asterix represent a statistically significant difference in the values of hybrid parameters compared to control plants, where the number of asterisks has the corresponding p value.

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$

Поједини аутори указују да поплава доводи до повећане концентрације фенолних једињења током изложености биљака кукуруза поплави (Alla et al. 2002). Alla и сарадници (2002) указују да је концентрација фенолних једињења била већа у коријењу биљака кукуруза изложених поплави него у контролним биљкама. Пораст концентрације фенолних једињења измјерен је и у *Hypericum brasiliense* током поплаве у трајању од 15 дана, што представља дуготрајну поплаву (Abreu and Mazzafera, 2005). Такође, поједини аутори указују да поплава изазива смањење концентрације фенолних једињења. Lin и сарадници (2006) су испитивали утицај краткотрајне поплаве (три дана) у листовима парадајза и измјерили су ниже концентрације фенолних једињења у третираним биљкама. Разлика у концентрацији фенолних једињења на коју указују радови наведених аутора би могла бити узрокована различитим трајањем поплаве као и биљном врстом и њеним развојним стадијумом.

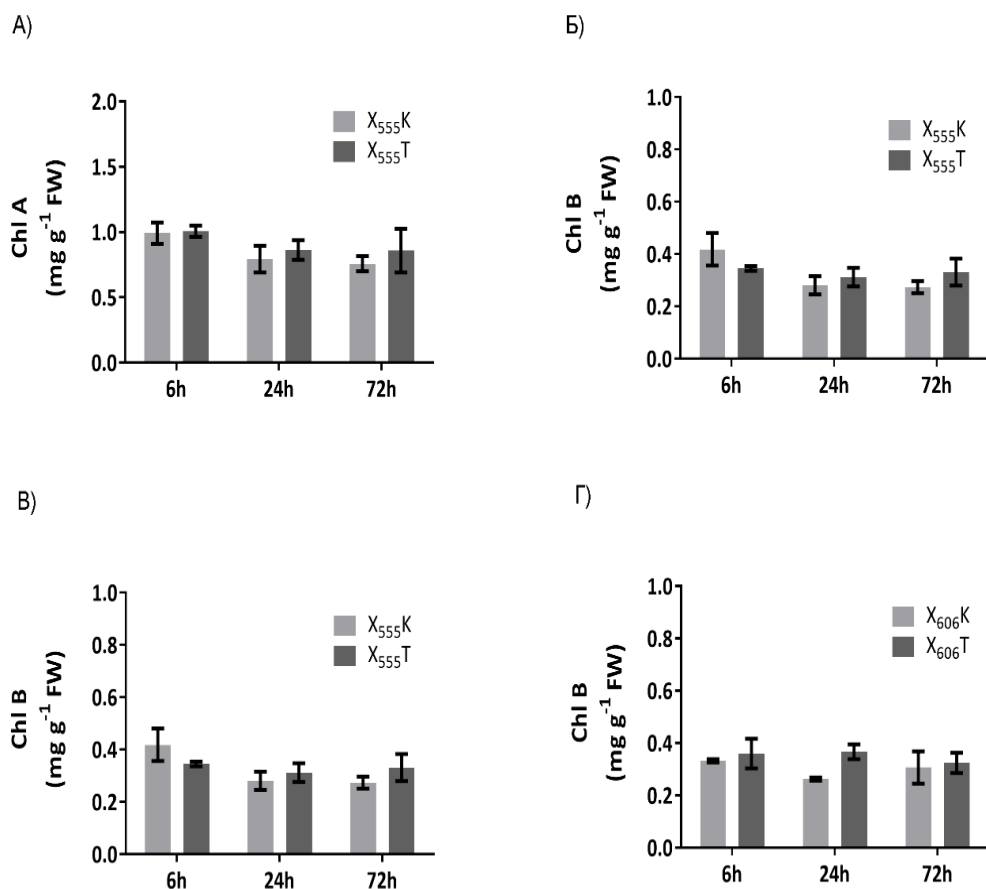
Наши резултати указују да краткотрајна поплава у трајању од 72 часа није утицала значајно на промјену концентрације фенолних једињења, у биљкама оба хибрида изложених поплави.

3.2.7. Концентрација фотосинтетичких пигмената

Концентрација фотосинтетичких пигмената, хлорофил А и Б, у односу на контролне биљке се не разликује статистички значајно (Слика 10). Иако није статистички значајно, измјерен је благи пораст концентрације фотосинтетичких пигмената на крају поплаве у односу на контролне биљке код оба хибрида. Пораст концентрације хлорофила А, код хибрида Х555 износио је 13%, а код хибрида Х606 5%. Пораст концентрације хлорофила Б, код хибрида Х555 износио је 21%, а код хибрида Х606 износи 6%.

Смањење концентрације хлорофила А и Б током изложености биљака кукуруза поплави, у трајању од 96 часова, измјерили су Zhu и сарадници (2013). Аутори су такође показали да већу концентрацију хлорофила А и Б, у биљкама изложеним поплави, има отпорнији генотип кукуруза. Ипак поплава је довела до смањења концентрације пигмената, код оба генотипа кукуруза (Zhu et al. 2013). Lukić и сарадници (2021) су показали да је поплава у трајању од 144 часа довела до повећане синтезе пигмената у односу на контролне биљке. Слично као и код фенолних једињења, разлика у тренду промјене концентрације пигмента могла би да буде узрокована дужином трајања поплаве, али и генотипом кукуруза.

Наши резултати указују да поплава у трајању од 72 часа није значајно утицала на промјену концентрације фотосинтетичких пигмената, односно да према садржају фотосинтетичких пигмената није нарушен процес фотосинтезе.



Слика 10. Утицај поплаве на концентрацију фотосинтетичких пигмената у контролним и третираним биљкама кукуруза, хлорофил А (Chl A) код хибрида Х555 (А) и Х606 (Б) и хлорофил Б (Chl B) код хибрида Х555 (В) и Х606 (Г)

Figure 10. The effect of flood on the concentration of photosynthetic pigments in control and treated maize plants, chlorophyll A (Chl A) in hybrids H555 (A) and H606 (B) and chlorophyll B (Chl B) in hybrids H555 (V) and H606 (G)

3.2.8. Корелације између мјерених параметара

У Табели 1 су представљени Пирсонови коефицијенти корелације између мјерених параметара за хибрид Х606.

- Добијена је позитивна корелација између POX и CAT ($R=0,486$; $p=0,041$) што указује на њихово синергистичко дјеловање у ензимској антиоксидативној заштити биљака кукуруза хибрида Х606.

- Добијена је позитивна корелација између концентрације H_2O_2 и MDA ($R=0,506$; $p=0,038$), што указује да је тренд промјене концентрације једног параметра праћен истим трендом код другог параметра.
- Добијена је позитивна корелација између концентрације MDA и активности CAT ($R=0,639$; $p=0,006$) што би се могло објаснити тиме да активност CAT не утиче директно на уклањање ROS који доводе до настанка MDA.

Табела 1. Пирсонови коефицијенти корелације између мјерених параметара за хибрид Х606
 Table 1. Pearson's correlation coefficients between the measured parameters for the H606 hybrid

		CAT	пирогалол POX	MDA	H_2O_2	Фенолна једињења
CAT	Pearson's r	—				
	p-value	—				
пирогалол POX	Pearson's r	0,486	*	—		
	p-value	0,041		—		
MDA	Pearson's r	0,639	**	0,187	—	
	p-value	0,006		0,472	—	
H_2O_2	Pearson's r	0,208		-0,125	0,506	*
	p-value	0,407		0,622	0,038	—
Фенолна једињења	Pearson's r	0,182		-0,010	0,140	-0,082
	p-value	0,470		0,967	0,592	0,745

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

У Табели 2 су представљене Пирсонови коефицијенти између мјерених параметара за хибрид Х555:

- Добијена је негативна корелације између активности CAT и POX ($R=-0,494$; $p=0,044$) што указује на њихово антагонистичко дјеловање.
- Позитивна корелација између H_2O_2 и POX ($R=0,682$; $p=0,002$) указује да POX нема значајну улогу у уклањању H_2O_2 код хибрида Х555 током трајања поплаве.
- Негативна корелација између H_2O_2 и концентрације фенолних једињења ($R=-0,532$; $p=0,023$) указује да неензимски антиоксидативни систем има значајну улогу у антиоксидативној заштити хибрида Х555 током трајања поплаве.

Табела 2. Пирсонови коефицијенти корелације између мјерених параметара хибрида за Х555
Table 2. Pearson's correlation coefficients between the measured parameters for the H555 hybrid

		CAT	пирогалол РОХ	H ₂ O ₂	MDA	Фенолна једињења
CAT	Pearson's r	—				
	p-value	—				
пирогалол РОХ	Pearson's r	-0,494 *	—			
	p-value	0,044	—			
H ₂ O ₂	Pearson's r	-0,399	0,682 **	—		
	p-value	0,112	0,002	—		
MDA	Pearson's r	0,384	-0,280	0,102	—	
	p-value	0,143	0,277	0,698	—	
Фенолна једињења	Pearson's r	-0,095	-0,344	-0,532 *	-0,302	—
	p-value	0,716	0,163	0,023	0,238	—

* p < ,05, ** p < ,01, *** p < ,001

5. Закључци и будући циљеви

У ћелији, H₂O₂ има двоструку улогу тј. у зависности од концентрације у којој је присутан може да има улогу сигналне молекуле или да изазове оксидативни стрес. С обзиром да је у хибридима које смо испитивали измјерена ниска концентрација H₂O₂ сматрамо да H₂O₂ имао улогу сигналне молекуле. Ниску концентрацију H₂O₂ је пратила и ниска концентрација MDA из чега произилази и низак ниво оксидативног стреса.

Низак ниво оксидативног стреса код испитиваних хибрида забиљежен током 72 сата поплаве може бити показатељ отпорности испитиваних хибрида на краткотрајну поплаву.

Оно што утиче да ли ће неки генотип да буде отпоран или не на одређену врсту абиотичког стреса јесте и његова антиоксидативна заштита односно ниво ензимских и неензимских антиоксиданата.

Наше истраживање показује да краткотрајна поплава (72 часа) није изазвала оксидативни стрес и оштећење ћелијских мембрана захваљујући антиоксидативном одговору који је обезбиједио хомеостазу нивоа ROS.

Будућа истраживања ће бити у смјеру испитивања утицаја дужине трајања поплаве на интензитет оксидативног стреса, као и праћење механизма антиоксидативне заштите који се активирају током поплаве. Такође, циљ је

проналазак отпорнијих генотипова кукуруза који би могли што дуже да опстану у условима оксидативног стреса изазваног поплавом, како би се крајњи принос житарице сачувао.

Литература

- Abdi AM (2020) Land cover and land use classification performance of machine learning algorithms in a boreal landscape using Sentinel-2 data. *GIScience & Remote Sensing*, 57(1): 1–20.
- Aebi H (1984) Catalase in vitro. In *Methods in enzymology*, Vol. 105 pp. 121-126. Academic press
- Ahmed S, Nawata E, Hosokawa M, Domae Y, Sakuratani T (2002) Alterations in photosynthesis and some antioxidant enzymatic activities of mungbean subjected to waterlogging. *Plant Science*, 163(1), 117-123.
- Alla MMN, Younis ME, El-Shihaby OA, El-Bastawisy ZM (2002) Kinetin regulation of growth and secondary metabolism in waterlogging and salinity treated *Vigna sinensis* and *Zea mays*. *Acta Physiologiae Plantarum*, 24(1): 19-27.
- Anee TI, Nahar K, Rahman A, Mahmud JA, Bhuiyan TF, Alam MU, Hasanuzzaman M (2019) Oxidative damage and antioxidant defense in *Sesamum indicum* after different waterlogging durations. *Plants*, 8(7): 196.
- Ashraf M (2009) Biotechnological approach of improving plant salt tolerance using antioxidants as markers. *Biotechnol Adv*, 27(1):84-93.
- Bin T, Xu SZ, Zou XL, Zheng YL, Qiu FZ (2010) Changes of antioxidative enzymes and lipid peroxidation in leaves and roots of waterlogging-tolerant and waterlogging-sensitive maize genotypes at seedling stage. *Agricultural Sciences in China*, 9(5): 651-661.
- Capon SJ, Jamesb CS, Williams L, Quinnc GP (2009) Responses to flooding and drying in seedlings of a common Australian desert floodplain shrub: *Muehlenbeckia florulenta* Meisn. *Environmental and Experimental Botany*, 66: 178-185.
- Caverzan A, Casassola A, Patussi Brammer P (2016) Antioxidant responses of wheat plants under stress. *Genet Mol Biol.*, 39(1): 1–6.
- Choudhury F, Rivero R, Blumwald E, Mittler R (2017) Reactive oxygen species, abiotic stress and stress combination. *Plant Abiotic Stress*, 90(5): 856-867.
- Chugh V, Gupta AK, Grewal MS, Kaur N (2012) Response of antioxidative and ethanolic fermentation enzymes in maize seedlings of tolerant and sensitive genotypes under short term waterlogging. *Indian Journal of Experimental Biology*, pp 557-582.
- De Abreu IN, Mazzafera P 2005. Effect of water and temperature stress on the content of active constituents of *Hypericum brasiliense* Choisy. *Plant Physiology and Biochemistry*, 43(3): 241-248.

- De Sousa CAF, Sodek L (2003) Alanine metabolism and alanine aminotransferase activity in soybean (*Glycine max*) during hypoxia of the root system and subsequent return to normoxia. *Environmental and Experimental Botany*, 50(1): 1-8.
- Doupis G, Kavroulakis N, Psarras G, Papadakis I (2017) Growth, photosynthetic performance and antioxidative response of 'Hass' and 'Fuerte' avocado (*Persea americana* Mill.) plants grown under high soil moisture. *Photosynthetica* 55: 655–663.
- Eysholdt-Derzso E, Sauter M (2019) Hypoxia and the group VII ethylene response transcription factor HRE2 promote adventitious root elongation in *Arabidopsis*. *Plant Biol.* 21: 103–108.
- Fan TW-M, Higashi RM, Frenkiel TA, Lane AN (1997) Anaerobic nitrate and ammonium in flood-tolerant rice coleoptiles. *Journal of Experimental Botany*, 48: 1655-1666.
- Gambrell RP, DeLaune RD, Patrick WH (1991) Redox processes in soils following oxygen depletion. In: Jackson MB, Davies DD, Lambers H (Eds) *Plant life under oxygen deprivation: ecology, physiology and biochemistry*, pp. 55-105. SPB Academic, The Hague, Netherlands.
- Gill SS, Tuteja N (2010) Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant physiology and biochemistry*, 48(12): 909-930.
- Gout E, Boisson AM, Aubert S, Douce R, Bligny R (2001) Origin of the cytoplasmic pH changes during anaerobic stress in higher plant cells. Carbon-13 and phosphorous-31 nuclear magnetic resonance studies. *Plant Physiology*, 125: 912-925.
- Hasanuzzaman M, Bhuyan M, Zulfiqar F, Raza A, Mohsin SM, Mahmud JA (2020) Reactive oxygen species and antioxidant defense in plants under abiotic stress: revisiting the crucial role of a universal defense regulator. *Antioxidants* 9:681
- Heath RL, Packer L (1968) Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of biochemistry and biophysics*, 125(1): 189-198.
- Hossain Z, Lopez-Climent MF, Arbona V, Pérez-Clemente RM, Gómez-Cadenas A (2009) Modulation of the antioxidant system in citrus under waterlogging and subsequent drainage. *Journal of Plant Physiology*, 13: 1391–1404.
- Jackson MB, Armstrong W (1999) Formation of aerenchyma and the processes of plant ventilation in relation to soil flooding and submergence. *Plant Biology*, 1(3): 274-287.
- Jamei R, Heidari R, Khara J, Zare S (2009) Hypoxia induced changes in the lipid peroxidation, membrane permeability, reactive oxygen species generation, and antioxidative response systems in *Zea mays* leaves. *Turkish Journal of Biology*, 33(1): 45-52.
- Jia W, Ma M, Chen J, Wu S (2021) Plant morphological, physiological and anatomical adaption to flooding stress and the underlying molecular mechanisms. *International journal of molecular sciences*, 22(3): 1088.
- Kukavica B, Topalić-Trivunović Lj, Šuškalo N, Hasanagić D, Kukrić Z, Janjić N, Savić A, Samelak I (2017). *Metabolički odgovor drvenastih biljaka na ekološke uslove u urbanim sredinama*. Prirodno matematički fakultet, Univerzitet u Banjoj Luci.

- Kumutha D, Ezhilmathi K, Sairam RK, Srivastava GC, Deshmukh PS, Meena RC (2009) Waterlogging induced oxidative stress and antioxidant activity in pigeonpea genotypes. *Biologia Plantarum*, 53(1): 75-84.
- Lin KH, Chao PY, Yang CM, Cheng WC, Lo HF, Chang TR (2006) The effects of flooding and drought stresses on the antioxidant constituents in sweet potato leaves. *Botanical Studies*, 47(4): 417-426.
- Lin KH, Chao PY, Yang CM, Cheng WC, Lo HF, Chang TR (2006) The effects of flooding and drought stresses on the antioxidant constituents in sweet potato leaves. *Botanical Studies*, 47(4): 417-426.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of biological chemistry*, 193: 265-275.
- Lukić N, Trifković T, Kojić D, Kukavica B. (2021) Modulations of the antioxidants defence system in two maize hybrids during flooding stress. *Journal of plant research*, 134(2): 237-248.
- McNamara ST, Mitchell CA (1989) Differential flood stress resistance of two tomato genotypes. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 114: 976-980.
- Mika A, Lühthe S (2003) Properties of Guaiacol Peroxidase Activities Isolated from Corn Root Plasma Membranes. *Plant Physiology*, 132: 1489-1498.
- Mittler R (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci*, 7(9): 405-10
- Miyashita Y, Dolferus R, Ismond KP, Good AG (2007) Alanine aminotransferase catalyses the breakdown of alanine after hypoxia in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 49(6): 1108-11.
- Ooume K, Inoue Y, Soga K, Wakabayashi K, Fujii S, Yamamoto R, Hoson T (2009) Cellular basis of growth suppression by submergence in azuki bean epicotyls. *Annals of Botany*, 103: 325–332.
- Pan J, Sharif R, Xu H, Chen H (2021) Mechanisms of Waterlogging Tolerance in Plants: Research Progress and Prospects. *Front. Plant Sci*, 11:627331.
- Puyang X, An M, Xu L, Han L, Zhang X (2015) Antioxidant responses to waterlogging stress and subsequent recovery in two Kentucky bluegrass (*Poa pratensis* L.) cultivars. *Acta Physiologiae Plantarum*, 37: 1-12.
- Rocha M, Licausi F, Araujo WL, Nunes-Nesi A, Sodek L, Fernie AR, van Dongen JT (2010) Glycolysis and the tricarboxylic acid cycle are linked by alanine aminotransferase during hypoxia induced by waterlogging of *Lotus japonicus*. *Plant Physiology*, 152(3): 1501-1513.
- Sairam RK, Srivastava GC, Agarwal S, Meena RC (2005) Differences in antioxidant activity in response to salinity stress in tolerant and susceptible wheat genotypes. *Biologia Plantarum*, 49(1), 85.
- Sergiev I, Alexieva V, Karanov E (1997) Effect of spermine, atrazine and combination between them on some endogenous protective systems and stress markers in plants. *Compt Rend Acad Bulg Sci*, 51(3): 121-124.

- Sharma P, Jha AB, Dubey RS, Pessarakli M (2012) Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *Journal of botany*.
- Singleton VL, Rossi JA (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents, *American journal of Enology and Viticulture*, 16(3): 144-158.
- Stikić R, Jovanović Z (2012) Fiziologija stresa biljaka. Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet, str. 58-100.
- Teisseire H, Guy V (2000) Copper-induced changes in antioxidant enzymes activities in fronds of duckweed (*Lemna minor*). *Plant Science*, 153(1): 65–72.
- Xu X, Ji J, Ma X, Xu Q, Qi X, Chen X (2016) Comparative proteomic analysis provides insight into the key proteins involved in cucumber (*Cucumis sativus* L.) adventitious root emergence under waterlogging stress. *Front. Plant Sci*, 7:1515.
- Yadav DK, Srivastava JP (2017) Temporal changes in biochemical and antioxidant enzymes activities in maize (*Zea mays* L.) under waterlogging stress during early growth stage. *Int J Curr Microbiol Appl Sci*, 6: 351-362.
- Yan B, Dai Q, Liu X, Huang S, Wang Z (1996) Flooding-induced membrane damage, lipid oxidation and activated oxygen generation in corn leaves. *Plant and soil*, 179: 261-268.
- Zhang G, Tanakamaru K, Abe J, Morita S (2007) Influence of waterlogging on some antioxidative enzymatic activities of two barley genotypes differing in anoxia tolerance. *Acta Physiol. Plant*, 29: 171–176.
- Zhu M, Li FH, Shi ZS (2016) Morphological and photosynthetic response of waxy corn inbred line to waterlogging, *Photosynthetica*, 54(4): 636-640.

Biochemical response of maize plants to short-term flooding

Tanja Trifković, Nataša Lukić, Nevena Šuškalo,
Biljana Davidović-Plavšić, Biljana Kukavica

Summary

In recent decades in Bosnia and Herzegovina, a flood has been one of the main causes of crop yield loss. On the other hand, the percentage of maize production in the total crops is 71%. Therefore, examining the impact of floods on maize plants is extremely important for understanding the mechanisms of adaptive responses and the selection of resistant hybrids. Although, flood leads to anaerobic conditions for plant growth, it induces the formation of reactive oxygen species (ROS) in plant cells. ROS oxidatively damage cellular macromolecules and may ultimately lead to cell death. In order to protect themselves from ROS, plants activate antioxidant metabolism (enzymatic antioxidants: superoxide dismutase, (SOD), catalase (CAT) and Class III peroxidases (POX) and non-enzymatic antioxidants such as phenolic compounds (PhOH)). The aim of our work was to examine the biochemical response of two maize hybrids (ZP 555 and ZP 606) to flood induced by the partial submergence of plants for 72 h. Changes in oxidative (H_2O_2 and malondialdehyde (MDA)) parameters and antioxidants (SOD, CAT, POX and PhOH) were monitored during the duration of the flood, as well as differences in the response of hybrids. The results showed that changes in the concentration of oxidative parameters were insignificant between treated and control plants in both hybrids, indicating a strong response of antioxidant metabolism. However, differences were observed in the antioxidant metabolism response of hybrids: ZP 606 had a stronger enzymatic response, while hybrid ZP 555 had a stronger non-enzymatic response. Even though our results showed that both hybrids tolerate short-term flooding, in order to characterize them as flood-tolerant hybrids, additional research is needed that includes different developmental stages of plants and different duration of flooding.

Keywords: hybrids ZP 555 and ZP 606, antioxidant metabolism, lipid peroxidation, hypoxia, reactive oxygen species