

UDK: 582.475.5(497.11)

Izvorni naučni rad *Original scientific paper*

**BIOHEMIJSKI SKRINING TESTOVI KAO INDIKATORI SUŠENJA
SMRČE (*Picea abies* Karst.) NA PLANINI KOPAONIK**

Marko Kebert¹, Bratislav Matović¹, Saša Orlović¹, Branislav Trudić¹, Vanja Vuksanović², Marina Katanić¹, Vladislava Galović¹

Izvod: U cilju rasvetljavanja fenomena sušenja stabala smrče na planini Kopaonik na biohemijskom nivou, primenjeni su antioksidativni parametri procene oksidativnog stresa *in vitro* na četinama zdravih stabala kao i na četinama stabala koji su pokazivali simptome sušenja. Rezultati inhibicije DPPH i ABTS radikala ukazali su da je u četinama suvih stabala došlo do povećanja inhibicije oba radikala, što nadalje ukazuje da je u tim uzorcima povećan antioksidantni kapacitet. Daljim testovima dokazali smo da su sušni uslovi doveli do povećane sinteze ukupnih fenolnih jedinjenja kao i jedinjenja iz grupe flavonoida u četinama stabala zahvaćenih sušom u odnosu na četine zdravih stabala. Dokaz da je suša dovela nesumnjivo i do oksidativnog stresa je i drastično povećan intenzitet peroksidacije lipida,. Takođe, četine smrče su akumulirale u uslovima suše značajno veću koncentraciju slobodnog prolina u poređenju sa zdravim četinama. Svi navedeni rezultati ukazuju da biohemijski parametri mogu da posluže kao izvrstan dijagnostički metod kojim bi se prepoznali rani simptomi sušenja stabla, ali izvršila procena i poređenje jedinki prema otpornosti na sušu.

Ključne reči: suša, smrča, oksidativni stres, prolin, fenolna jedinjenja

**BIOCHEMICAL SCREENING ASSAYS AS DROUGHT INDICATORS IN SPRUCE
(*Picea abies* Karst.) ON MOUNTAIN KOPAONIK**

Marko Kebert¹, Bratislav Matović¹, Saša Orlović¹, Branislav Trudić¹, Vanja Vuksanović²,
Marina Katanić¹, Vladislava Galović¹

¹ Dr Marko Kebert, naučni saradnik, Dr Bratislav Matović, naučni saradnik, Dr Saša Orlović, redovni profesor, master biologije Branislav Trudić, istraživač saradnik, Dr Marina Katanić naučni saradnik, Dr Vladislava Galović, viši naučni saradnik, Institut za nizijsko šumarstvo i životnu sredinu, Novi Sad, Republika Srbija; ² master poljoprivrede Vanja Vuksanović, student doktorskih studija, Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet, Novi Sad, Republika Srbija

¹ Marko Kebert, Research associate, Dr Bratislav Matović, Research associate, Dr Saša Orlović, Full professor, master boil. Branislav Trudić, Research assistant, Dr Marina Katanić, Research associate, Dr Vladislava Galović, Senior research associate, University of Novi Sad, Institute of Lowland Forestry and Environment, Novi Sad, Republic of Serbia; ² master agricul. Vanja Vuksanović, PhD student, University of Novi Sad, Faculty of Agriculture, Novi Sad, Republic of Serbia

Abstract: The aim of this study was to elucidate underlying biochemical mechanisms of drought induced in spruce species on Kopaonik mountain by application of antioxidant assays for estimation of oxidative stress in spruce needles that were characterized as healthy as well as those that exhibit symptoms of severe drought. Results of radical scavenger capacities against DPPH and ABTS radicals, showed increased values in drought affected needles thus exhibiting higher antioxidant properties. With further analysis we proved that drought conditions induced significantly increased biosynthesis of total phenolic compounds (TPC) as well as flavonoids in drought samples comparing to the controls. Drastically elevated level of lipid peroxidation indicated that drought induced oxidative stress. Furthermore, under drought condition free proline accumulation was significantly higher comparing to the healthy controls. All obtained data indicate that application of biochemical assays could serve as a diagnostic tool for recognition of early symptoms of drought and could serve as a criterion for selection of individuals that are more tolerant to drought stress.

Key words: drought, spruce, oxidative stress, proline, phenolic compounds

UVOD

Uticaj dramatičnih klimatskih scenarija, koji prate tekuće klimatske promene i koji su okarakterisani naglim smenama kontrastnih vremenskih obrazaca, najpre smene ekstremno suvih i vlažnih perioda, dovodi do naglog odumiranja i sušenja drveća širom planete, izazivajući pritom velike ekološke katastrofe i značajne ekonomske gubitke (Choat et al., 2012). Posledice globalnih klimatskih scenarija vidljive su i u okviru Nacionalnog parka Kopaonik u Srbiji, gde je primećeno drastično i naglo sušenje smrče (*Picea abies* Karst.). Pored ovih simptoma sušenja i abiotičkog stresa, intenzivni monitoring na teritoriji Kopaonika u predelima okoline Jankove Bare zabeležio je primere intenzivnog širenja raznih štetočina i invazije raznih vrsta potkornjaka (*Ips typographus* L. *Pityogenes chalcographus* L. (Coleoptera, Scolytidae)) (Marković et al., 2004; 2010, Faccoli i Stergulc, 2004). I dalje je pitanje debate i diskusije, da li je povećana osetljivost drvenastih vrsta na sušu i ostale abiotičke faktore stresa koje uzrokuju uslovi staništa i posledično niska sekvestracija ugljenika, zapravo istovremeno i uzrok povećane osetljivosti drvenastih vrsta, pa i smrče na parazite i rizike od biotičkog stresa (McDowell et al., 2008).

S obzirom na veoma slične biohemijske odgovore kod velikog broja vrsta kojima one reaguju na biotički i abiotički stres i njihovo međusobno preplitanje, te aktiviranje sličnih ili istih metaboličkih puteva kojima su pokrenuti odbrambenim mehanizmima kod biljaka, vrlo je teško ustanoviti pravo poreklo tih odgovora i odvojiti ih i pripisati ih shodno uzroku (Sala et al., 2010, 2012). Razlog tome je što je zajednički činilac i biotičkog i abiotičkog stresa (u ovom slučaju suše) zapravo oksidativni stres, koji nastaje kao propratna pojava i sekundarni stres tokom oba, i abiotičkog i biotičkog stresa.

Oksidativni stres predstavlja pojavu nekontrolisane propagacije reaktivnih kiseoničnih vrsta (eng. reactive oxygen species-ROS), koje zbog svoje visoke reaktivnosti imaju sposobnost da izazovu oksidaciju osnovnih biomolekula poput proteina i lipida, ali i nukleinskih kiselina, izazivajući time poremećaj normalnog metabolizma koji za posledicu mogu imati i narušavanje osmotske ravnoteže i

dovesti do sušenja (Štajner et al., 2011). Svakako da pojavi oksidativnog stresa doprinose i mikroklimatski, edafski kao i zemljišni faktori lokaliteta.

U ovom radu, u cilju rasvetljavanja fenomena sušenja stabala smrče na planini Kopaonik primenjeni su biohemijski parametri procene oksidativnog stresa *in vitro*. Tokom ovog istraživanja izvršena je kvantitativna analiza proizvoda sekundarnog metabolizma biljaka u prvom redu sadržaja fenolnih jedinjenja i flavonoida koji se odlikuju izrazito velikom antioksidantnom aktivnošću i koji se smatraju jednim od najvažnijih jedinjenja kojima se biljka bori protiv suše i oksidativnog stresa (Samanata et al., 2011).

Fenolna jedinjenja, zahvaljujući svojoj strukturi i brojnim hidroksidnim grupama kao i sposobnosti rezonantne stabilizacije na prstenu A i B, imaju izrazito jaka antioksidantna svojstva, te mogu da „gase“ i „hvataju“ (eng. scavenge) hidroksilne radikale (OH) kao i superoksid anjon radikal (O_2^-) (Ballizany et al., 2014). Neka od brojnih fenolnih jedinjenja su čak aktivnija i efikasnija od vitamina C koji je poznat po svojoj antioksidantnoj aktivnosti. Takođe, fenolna jedinjenja mogu da stopiraju procese lipidne peroksidacije. Ovaj tip inovativnih istraživanja je vrlo važan, jer sadržaj ovih jedinjenja može poslužiti kao osnovni kriterijum za selekciju onih vrsta, klonova i jedinki koje imaju veću sposobnost preživljavanja u sušnim uslovima, upravo zahvaljujući povećanoj akumulaciji ovih jedinjenja. U zavisnosti od sadržaja ove grupe jedinjenja, možemo doći do podataka koji su od ključnog značaja za procenu adaptibilnosti, plastičnosti i prilagodljivosti vrste na promjenjive uslove životne sredine i klimatskih promena (Shahidi i Chandrasekara, 2010).

Sa druge strane, da bi se biljka odbranila od nepovoljnih klimatskih uslova pre svega suše, dolazi do aktivacije metaboličkih puteva koji doprinose povećanoj biosintezi metabolita koji imaju osmoprotektivnu ulogu i sposobnost da za svoje hidroksilne i druge polarne grupe vezuju molekule vode. Poznata jedinjenja sa osmoprotektivnom ulogom su glicinbetain, alkoholni šećeri, poput ksilitola ili trehaloze, kao i aminokiselinski indikator suše-sadržaj slobodne iminokiseline prolin, pokazuju značajnu akumulaciju u listovima, ali i korenovima u uslovima suše.

Verovatno, zahvaljujući relativno prostoj metodologiji određivanja, slobodan prolin se može smatrati najreferentnijim biomarkerom suše i osmolitom koji štiti makromolekule od štetnog osmotskog uticaja (Hare i Cress, 1997; Kavi Kishor et al., 2005). Do danas, naučnici su pridodali novootkrivene funkcije ovoj proteinogenoj aminokiselini sa izrazitom konformacionom rigidnošću, koja je dosad bila poznata kao jedan od osnovnih odgovora biljke na razne stresove iz životne sredine (od suše, preko zaslanjenosti do uticaja teških metala i UV zračenja (Kebert et al., 2016). Dodatno, dokazano je da prolin ima funkciju molekulskog čaperona i kao signalnog molekula, ali i da je sposoban da zaštiti integritet i održi stabilnost proteina, da vrši modulaciju aktivnosti raznih enzima, utiče na gensku ekspresiju, kao i održavanje redoks statusa u biljci (Szabados i Savoure, 2010). Pored svega toga, prolin je poznat kao efikasan antioksidans koji neutralize ROS, a poznat je i kao aktivator antioksidantnih enzima. Prolin je posebno efikasan u neutralizaciji hidroksilnog radikala kao i gašenju singletnog kiseonika koji može da

doveđe do oštećenja membrane i uzrokuje oksidaciju fotosistema II (PSII), te stoga spreči redukcionu fazu fotosinteze (Matysik et al., 2002).

I mađa je suša jedna od najispitivanijih tema u modernoj biologiji biljaka, s obzirom na kompleksnost prirode ovog fenomena kao i na isprepletane simptome suše i biološke odgovore biljaka na sušu, kako na genetičkom tako i na metaboličkom nivou, mnogi detalji i specifičnosti na nivou vrsta još uvek nisu potpuno istraženi. Pogotovo je mali broj studija u prirodnim uslovima, gde se sam faktor suše ne može lako izolovati. Velike količine generisanih podataka koji potiču iz ispitivanja u prirodnim uslovima, često ne mogu biti pripisani samo uticaju suše, s obzirom da ona koegzistira u prirodi zajedno sa sekundarnim stresovima poput oksidativnog stresa, foto-oksidativnog stresa, osmotskog stresa ili stresa izazvanog viskim temperaturama, što dodatno usložnjava izučavanje fenomena suše u prirodnim uslovima (Rizhsky et al. 2002, Štajner et al., 2011).

Stoga, cilj ovog rada je da se ispita uticaj suše na biohemisjkom nivou kod stabala smrče na kojima su u okviru Nacionalnog parka Kopaonik detektovani ozbiljni simptomi sušenja. Da bi se to postiglo biće ispitane sledeće hipoteze i) da li su četine promenile opšti antioksidantni i redukcionu kapacitet u prisutvu suše u odnosu na zdrave četine ii) da li je u četinama smrče došlo do promene kvantitativnog sadržaja nekih od jedinjenja sa antioksidantnom ulogom poput flavonoida, ali i ukupnih fenolnih jedinjenja iii) da li je suša u četinama smrče izazvala akumulaciju aminokiseline prolin i produkta lipidne peroksidacije, malonildialdehida (MDA).

MATERIAJAL I METODE

Radi provere zadatih hipoteza biljni materijal, četine smrče, je uzorkovan tokom septembra 2016.godine sa 15 zdravih individual, kao i sa 15 stabala koji su pokazivali drastične simptome sušenja, gde su oštećenja zahvatala više od 50% krošnje. Biljni materijal je sakupljen u Gazdinskoj jedinici Samokovska reka, odeljenje 33 (koordinate N43^o 18' 56,7" i E20^o 46' 52,6" nadmorska visina 1530 metara). Nakon uzorkovanja u najkraćem roku biljni materijal je na suvom ledu prenesen na duboko zamrzavanje u laboratorije Instituta za nizijsko šumarstvo i životnu sredinu. Prikupljen biljni materijal je liofilizovan i samleven te su pravljeni trojaki ekstrakti, etanolni za ispitivanje tzv. „skevindžer“ ili „hvatačke“ aktivnosti prema komercijalnim hromoforima, DPPH i ABTS radikalima, kao i za određivanje sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja i flavonoida i za određivanje redukcionu sposobnosti ekstrakta primenom FRAP testa. Puferski ekstrakt korišćen je za određivanje intenziteta lipidne peroksidacije, dok je sadržaj prolina određivan iz biljnog materijala ekstrahovanog i maceriranog sa 3% 5-sulfosalicilnom kiselinom. Ekstrakti su pripremani tako što su odvage od oko 0,1g liofilizovanog materijala macerirani tučkom u avanu sa 2 ml 96% etanola ili 2 ml fosfatnog pufera (0.1 M, pH=7) (odnos biljni materijal rastvarač 1:20) te je macerat centrifugiran na 10000 obrtaja 15 minuta na 4^oC, i odvojeni supernatanti je korišćeni kao ekstrakti.

DPPH test (Soler-Rivas, 2000) je primenjen radi određivanja sposobnost ekstrakata da vrše neutralizaciju stabilne komercijalne slobodno-radikalske

hromofore, 2,2'-difenilpikril hidrazil radikala, gde je spektrofotometrijski na 515 nm praćena promena absorbance radne probe (290 µl DPPH 0.1 M sa dodatih 10 µl ekstrakta) kao i prateće promene boje iz ljubićaste u žutu. Ova promena absorbance je proporcionalna prisustvu jedinjenja sa antioksidantnom aktivnošću u etanolnim ekstraktima smrće. Rezultati sposobnosti neuztalizacije radikala (eng. radical scavenger capacity-RSC) su izraženi procentualni i izračunati po formuli: $RSC = [(Ac - Ax)/Ac] \times 100\%$, gde je **Ac**-absorbanca DPPH rastvora, **Ax**-absorbanca radne probe u odnosu na kontrolu (Ac) koja je sadržala samo rastvor DPPH.

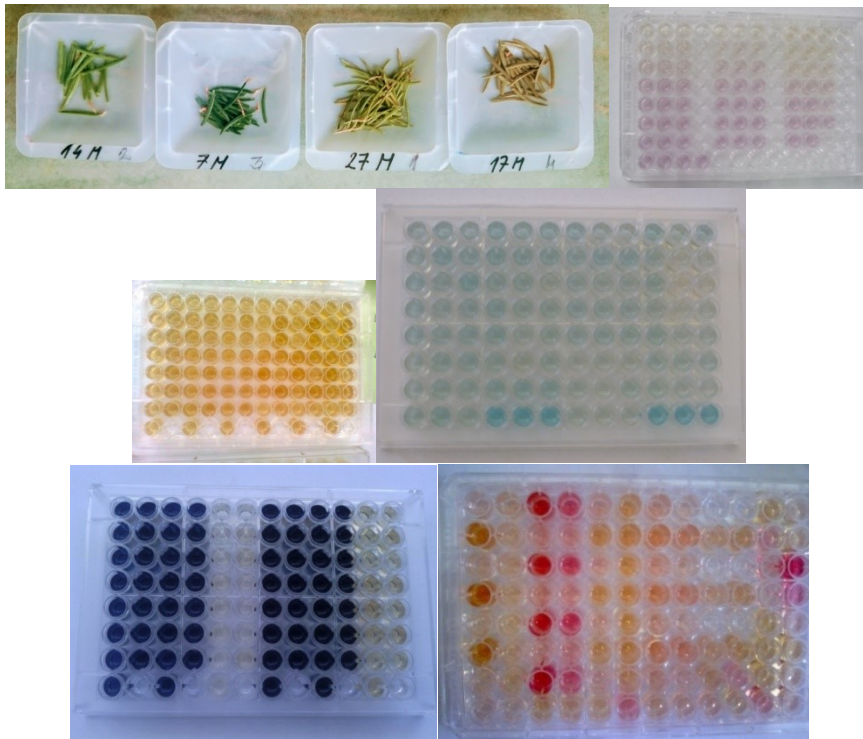
Slično, ABTS test (Arnao et al., 2001) je pratio sposobnost ekstrakta da neutrališe ABTS radikal (2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina), koja je proporcionalna promeni absorbance na 734 nm i vidljiva kao promena boje rastvora iz plavozelene u žutu. Kao kontrola (Ac), korišćen je rastvor ABTS (nastao mešanjem 7 mM rastvora ABTS sa 2.45 nM rastvorom kalijum-persulfata (K₂S₂O₇) 24h pre korišćenja reagensa), dok su se radne probe (Ax) sastojale od 290 µl ABTS reagensa i 10 µl ispitivanog ekstrakta. Procenat inhibicije za ABTS računat je po istoj formuli kao i za DPPH. Radne probe za DPPH su inkubirane 30 minuta pre čitanja absorbanci, dok su za ABTS inkubirane 5 min nakon dodavanja ekstrakta u rastvor sa komercijalnim radikalom.

Ukupni fenoli (eng. total phenolic content-TPC) su određivani merenjem absorbanci radnih proba na 760 nm. Ovaj spektrofotometrijski metod je zasnovan na reakciji etanolnih ekstrakata sa Folin-Ćokalteovim reagensom u baznoj sredini, gde se fenolna jedinjenja boje u plavo. Nakon konstruisanja kalibracione krive dobijene merenjem absorbanci serije razlićitih koncentracija standardnog rastvora galne kiseline, rezultati su ekstrapolisani sa krive i izraženi kao ekvivalenti mg galne kiseline po g suve materije (GAE/g DW) (Singleton et al., 1999).

Ukupni flavonoidi su određivani spektrofotometrijskim testom po Chang et al., (2002), koji je zasnovan na osobini flavonoida da sa jonima aluminijuma grade stabilna žuto obojena kompleksna jedinjenja čija je apsorbancia merena na 415 nm i upoređivana sa apsorbancama serije razblaženja standardnog rastvora kvercetina i čiji je sadržaj izražen kao ekvivalenti mg kvercetina po g suve materije (QE/ g DW).

Intenzitet lipidne peroksidacije (Devasagayam et al., 2003) je meren spektrofotometrijski i predstavljen kao koncentracija malonildialdehida (MDA) kao jednog od krajnjih proizvoda lipidne peroksidacije koji u kiseloj sredini u reakciji sa tiobarbiturnom kislinom daje crveno kompleksno obojenje čija je apsorbancia praćena na 532 nm.

Sadržaj slobodnog prolina je određivan merenjem apsorbance crvenog obojenja koje je ekstrahovano toluolom i koje potiče od jedinjenja koji je proizvod reakcije slobodnog prolina i ninhidrinskog reagensa u kiseloj sredini, kako je opisano od strane Bates et al., (1973). Sve apsorbance su očitavane na čitaću mikrotitar ploća, MutiScan GO, Thermo Scinetific, Germany. Svi dobijeni rezultati su raćeni u tri analitićka i pet bioloških ponavljanja. Rezultatati su prikazani kao srednja vrednost sa standardnom devijacijom.



Slika 1. Različiti uzorci četinina smrče kao i izgled mikrotitar ploča nakon razvijanja boje pri izvođenju različitih spektrofotometrijskih testova
Figure 1. Different samples of spruce needles and microplates after colour development in different spectrometric tests

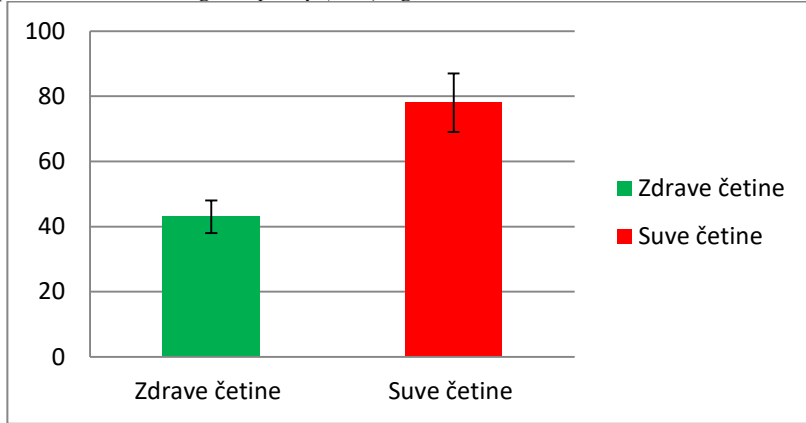
REZULTATI I DISKUSIJA

U skladu sa postavljenim hipotezama, obradom rezultata dobijenih nakon primene biohemijjskih eseja koji prate sposobnost etanolnih ekstrakata da vrše neutralizaciju komercijalnih radikalsih vrsta kao što su DPPH i ABTS, može se primetiti da je procenat inhibicije DPPH kao i ABTS radikala značajno veći u četinama koje su bile izložene suši. Ovaj rezultat ukazuje da se ukupni antioksidantni potencijal i kapacitet smrče povećao tokom suše i da je on najverovatnije posledica sušom aktiviranih biosintetskih puteva koji povećavaju koncentraciju jedinjenja sa antioksidantnom ulogom, u prvom redu iz grupe sekundarnih metabolita. Sličan rezultat povećane ukupne antioksidantne vrednosti procenjene DPPH testom prikazali su i Štajner et al., (2011) ispitujući antioksidantni kapacitet različitih medonosnih drvenastih vrsta poput *Populus alba*, *Robinia pseudoacacia*, *Sophora japonica*, *Euodia hupehensis*, *Tilia sp.*, *Fraxinus sp.* Povećan procenat DPPH skevidžer aktivnosti za 27%, dokazan je i u listovima pirinča izloženog suši i temperaturnom stresu, što je u skladu i sa nalazima u ovom istraživanju (Kang and Saltveit, 2002). Takođe Zhu et al. (2009) su zabeležili

povećanje procenta inhibicije DPPH kod *Bupleurum sp.* pod uslovima suše. Lin et al. (2001), koji su ispitivali inhibitorne koncentracije različitih varijeteta slatkog krompira uz pomoć DPPH testa u uslovima suše i plavljenja dobili su dvojake rezultate, te je varijetet Simon 1 pokazivao povećane vrednosti inhibicije DPPH radikala tokom suše, dok je drugi varijetet Sushu 18 pokazao smanjene vrednosti procenta inhibicije DPPH radikala.

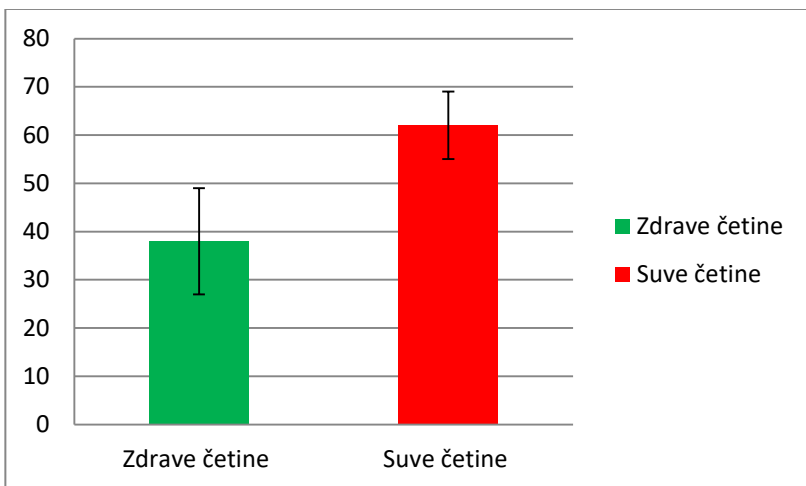
Grafikon 1. Procenat inhibicije DPPH radikala

Graph 1. Radical scavenger capacity (RSC) against DPPH radical



Grafikon 2. Procenat inhibicije ABTS radikala

Graph 2. Inhibition percentage for ABTS radicals

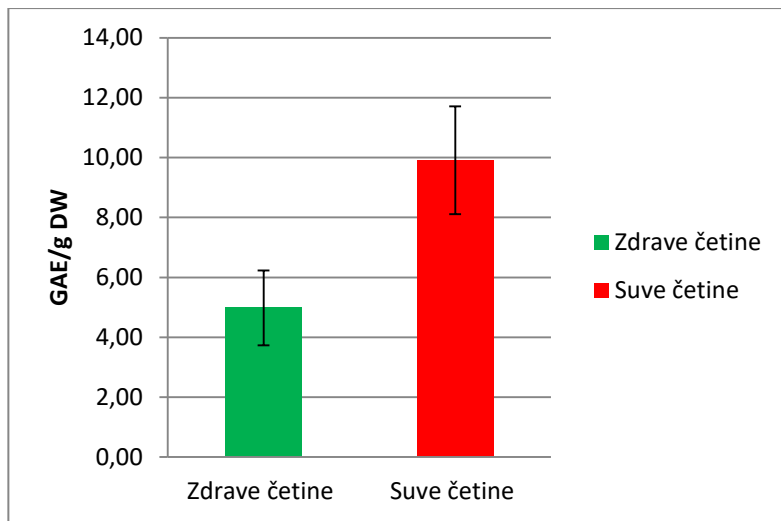


Sposobnost etanolnih ekstrakata smrče da vrše neutralizaciju ABTS radikala je bila značajno viša pod uslovima suše i iznosila je oko 62%, nego u četinama uzorkovanim sa zdravih stabala, gde je iznosila oko 38%. Ovo ukazuje na

povećanje ukupnog antioksidantnog kapaciteta u uslovima suše kod smrče, što se poklapa sa rezultatima Ahmeda et al., (2002) koji su dokazali povećanu antioksidantnu aktivnost procenjenju ABTS testom u listovima *Lepidum sativum* koje su tretirali sa tretmanima suše izazvane dodatkom polietilenglikola (PEG), ali i zaslanjenosti izazvane NaCl u odnosu na kontrole, gde su vrednosti inhibicije ABTS iznosile 57.2% i 73.4%, respektivno. Rice-Evans i Miller, (1996) u svojoj opsežnom ispitivanju su procenili antioksidantne aktivnosti različitih ekstrakata biljnih vrsta i izolovanih jedinjenja iz raznih namirnica primenom ABTS testa i izrazili ih putem troloks ekvivalenata (TEAC), koji predstavlja hidrofilni analog vitamin E često korišćen za kalibraciju i standardizaciju antioksidantnih testova *in vitro*.

Grafikon 3. Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja (mg ekv. galne kiseline/ g sveže mase)

Graph 3. Total phenolic compounds (TPC) content (mg eq. galic acid / g of dry weight)

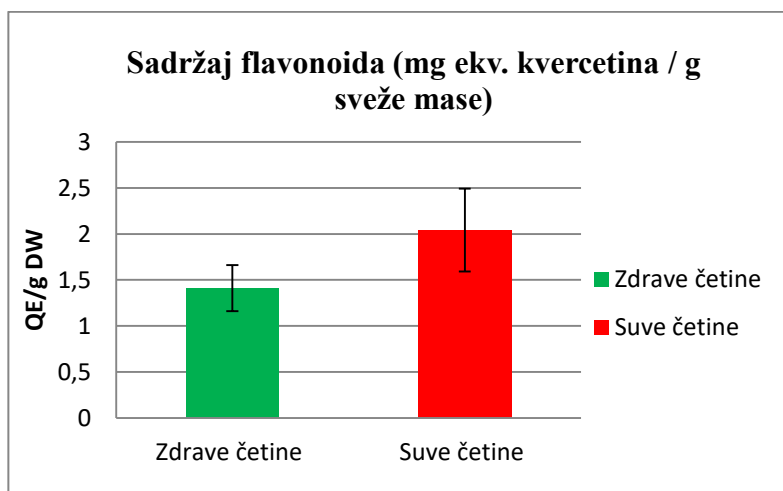


U skladu sa očekivanjima rezultatima, sadržaj fenolnih jedinjenja izraženih kroz ekvivalente galne kiseline (gallic acid equivalents -GAE) je bio skoro dvostruko viši u četinama uzorkovanim sa stabala sa simptomima suše u odnosu na one četine uzorkovanim sa zdravih drveća koji nisu pokazivali simptome sušenja. Ova ispitivanja dodatno potvrđuju prethodna ispitivanja raznih autora gde su dokazane povećane koncentracije fenolnih jedinjenja u uslovima suše. To je potvrdio i Farrant, (2000; 2003), koji je poredio sadržaj fenolnih jedinjenja u različitim vrstama skrivenosemenica pri različitim kombinacijama stresova suše uparene sa stresom izazvanim povećanom temperaturom ili svetlošću, kao i sušu praćenu oporavkom. Povećan sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja primećen je i kod provenijencija bukve koje su se pokazale otpornijim na stres suše, ali i kod različitih medonosnih drvenastih vrsta gde je koncentracija ukupnih fenolnih jedinjenja rasla tokom sušnih lenjih meseci (Štajner et al., 2011, Štajner et al., 2012).

Odbrambena uloga fenolnih jedinjenja pripisuje se njihovim fotoprotektivnim, osmoregulatornim i ponajviše antioksidantnim svojstvima (Gould et al., 2002). Zahvaljujući velikom broju elektron donorskih hidroksilnih grupa, kao i sposobnosti rezonancije elektrona u fenolnom jezgru, ova jedinjenja su sposobna da vrše redukciju skoro svih reaktivnih kiseoničnih i azotovih vrsta, a neki autori navode da su čak efikasniji i od askorbinske kiseline i α -tokoferola (Buckley et al., 1996; Pratico et al., 2001). Drugi predloženi mehanizam njihovog antioksidantnog delovanja se ogleda u sposobnosti fenolnih jedinjenja da vrše helaciju jona gvožđa i bakra i time preče ili smanje njihovo učešće u proizvodnji najreaktivnijeg hidroksilnog radikala u Haber-Weiss-ovoj reakciji (Brown et al., 1998).

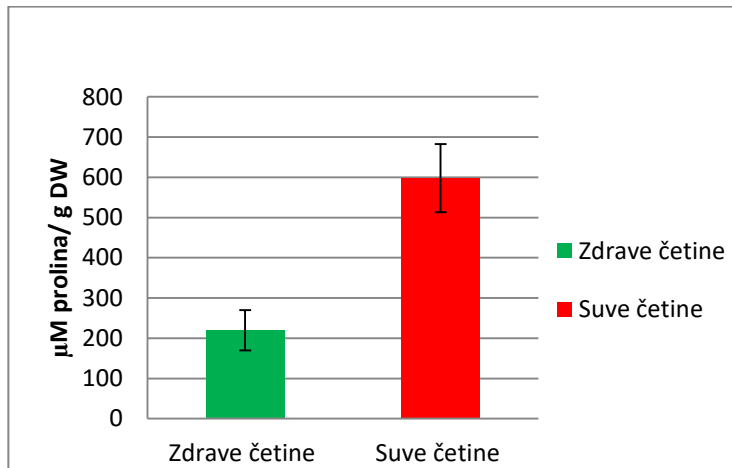
Grafikon 4. Sadržaj flavonoida (mg ekv. kvercetina/ g sveže mase)

Graph 4. Content of flavonoids (mg eq. quercetin / g of dry weight)



Takođe, i sadržaj izmerenih flavonoida je bio viši u četinama sa stabala smrče koji su bili pod uticajem suše, nego u četinama zdravih stabala. Tako je prosečna vrednost u četinama zdravih stabala smrče iznosila 2.04 mg ekvivalenta kvercetina (mg QE) po gramu suve materije, dok je u četinama izloženih suši iznosila za skoro 45% više i iznosila oko 2.04 mg ekvivalenta kvercetina po g suve materije. Tokom svog rada na istraživanju mehanizama otpornosti na sušu kod *Arabidopsis*, Nakabayashi et al., (2014) su putem LC-QTOF-MS analize (tačna hromatografija povezana sa tzv. time of flight i masenom spektroskopskom detekcijom) dokazali da glikozidi kamferola, kvercetina i cijanidina imaju najvažniju ulogu u ublažavanju stresa suše, kao i da genetički modifikovani klonovi kojima su nedostajali neki od pomenutih glikozida flavonoida su pokazivali ekstremnu osetljivost na sušu. Takođe, glikozilovani flavonoidi imaju nižu antioksidantnu aktivnost u poređenju sa svojim aglikonima (Yamasaki et al., 1997).

Grafikon 5. Sadržaj slobodnog prolina ($\mu\text{mol}/\text{g}$ suve mase)
Graph 5. Content of free proline ($\mu\text{mol}/\text{g}$ of dry weight)



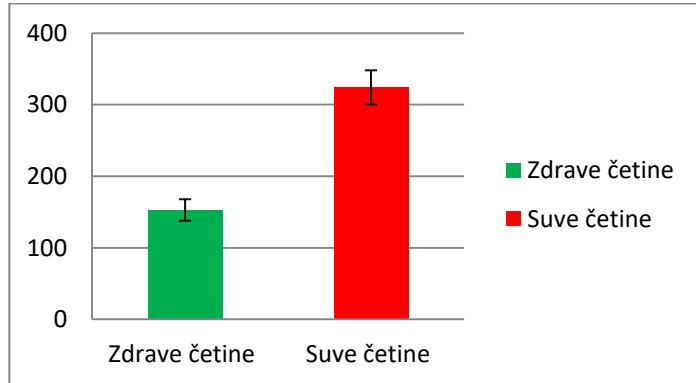
Sadržaj slobodnog prolina je značajno povećan u četinama sa stabala smrče sa simptomima suše (oko 600 $\mu\text{M}/\text{g}$ suve materije) u odnosu na sadržaj prolina u četinama zdravih stabala (220 μM po gramu suve materije). Zanimljivo je da iako je prolin važan za odbranu biljke u uslovima suše i stvaranje tolerancije na sušu (Bray et al., 2000; Cushman i Bohnert, 2000), sadržaj prolina tokom stresa kombinovane suše sa visokim temperaturama je kod *Arabidopsis* zapravo bio smanjen i biosinteza prolina supresovana (Rizhsky et al. 2004). Takođe, postoje i kontradiktorni rezultati, gde su povišene koncentracije prolina zabeležene u varijetetima pirinča otpornog na sušu (Choudhary et al., 2005), ali suprotno očekivanjima prolin nije pokazao nikakve pozitivne korelacije sa otpornošću ječma (*Hordeum vulgare*) na visoke koncentracije soli, niti na otpornost ječma tokom stresa suše u kombinaciji sa stresom zaslanjenosti (Widodo et al, 2009).

U ispitivanim uzorcima smrče uzorkovanim sa stabala zahvaćenih simptomima sušenja, detektovana je više nego dvostruko veća koncentracija malonildialdehida (MDA), koji je jedan od krajnjih produkata lipidne peroksidacije i neposredni indikator oksidativnog stresa kod biljaka. Vrednost malonildialdehida u zdravim četinama se kretala oko 150 nmol MDA po g suve materije dok je u suvim četinama iznosila čak 324 nmol MDA po g suve materije. Ovi rezultati se slažu sa rezultatima Štajner et al. (2011; 2012), koji su detektovali povišene koncentracije MDA u *Fraxinus sp.* tokom sušnih letnjih meseci, kao i u različitim provenijencijama bukve koje su pokazivale veću otpornost na sušu.

Sa druge strane važno je istaći da je u prirodnim uslovima skoro nemoguće izolovati samo jedan faktor stresa, npr. sušu u ovom slučaju. Rezultati skorašnjih istraživanja jasno ističu da u slučaju ispitivanja tretmana koji predstavljaju kombinaciju različitih stresova, na primer suše i toplotnog šoka, biološki odgovor biljke je uvek jedinstven i nikako ne može biti predstavljen ekstrapolacijom oba pojedinačna odgovora na pojedinačno primenjene stresove. Kako su u našem radu

ispitivane smrče koje su tokom čitavog perioda letabile izložene ne samo vodnom deficitu-suši, već i povećanoj osvetljenosti, viskim temperaturama i većoj UV radijaciji izazvanim višom nadmorskom visinom (1500m), dobijeni rezultati nikako ne predstavljaju izolovani odgovor smrče na sušu, nego svakako odgovor na kombinaciju nabrojanih stresova.

Grafikon 6. Intenzitet lipidne peroksidacije (nmol MDA/ g sveže mase)
Graph 6. Intensity of lipid peroxidation (nmol MDA / g of fresh mass)



U svom preglednom radu Mitler et al., (2006), navode istraživanja koja prateći broj povišeno ekspresovanih transkripata, kao i broj akumuliranih metabolita tokom pojedinačno primenjenog stresa suše i toplotnog šoka, kao i u slučaju stresa nastalog kombinacijom ova dva, dokazala da se biološki odgovor i na transkripcionom i metaboličkom nivou razlikuje pri primeni pojedinačnih stresova u odnosu na tretman koji predstavlja kombinaciju stresova. Takođe, Mitler et al., (2006) ističu da je broj zajedničkih metabolita i transkripata vrlo mali, odnosno da se biološki odgovori biljaka na sušu i toplotni stres vrlo razlikuju međusobno, i svakako razlikuju u odnosu na tretman koji je predstavljen kombinacijom ovih različitih abiotičkih faktora (Rizhsky et al., 2002; 2004).

ZAKLJUČAK

Uprkos pojedinim ograničenjima biohemijskih testova za praćenje antioksidantne aktivnosti i kvantifikacije jedinjenja sa visokom antioksidantnom aktivnošću, rezultati ovog rada potvrđuju da ovi parametri mogu biti upotrebljeni za razlikovanje adaptibilnosti, plastičnosti i prilagodljivosti vrste na promenjive uslove životne sredine i klimatske promene. Takođe sumarno gledano, biohemijske analize su pokazale da je suša na Kopaoniku dovela do oksidativnih oštećenja u četinama smrče manifestovanih intenziviranim procesom lipidne peroksidacije, kao i do aktivacijom biosintetskih puteva fenolnih jedinjenja i flavonoida koji imaju za cilj da povećanjem ukupnog antioksidantnog kapaciteta smrče, ublaže posledice sušenja smrče, čemu takođe doprinosi i akumulacija prolina u četinama.

Zahvaljnica

Ovaj rad je realizovan u okviru projekata: „Istraživanje klimatskih promena na životnu sredinu: praćenje uticaja, adaptacija i ublažavanje“ (43007) koji finansira Ministarstvo za prosvetu i nauku Republike Srbije u okviru programa Integrisanih i interdisciplinarnih istraživanja za period 2011-2017. godine.

LITERATURA

- Ahmed, A. R., Ahmed, M. M., Hanan, G., AL – Sayed, M. A., Smetanska, I. (2012): Effect of Drought and Salinity Stress on Total Phenolic, Flavonoids and Flavonols Contents and Antioxidant Activity in in vitro Sprout cultures of Garden cress (*Lepidiumsativum*). Journal of Applied Sciences Research, 8(8): 3934-3942.
- Arnao, M. B., Cano, A., Acosta, M. (2001): The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. Food Chemistry 73: 239-244.
- Ballizany, W.L., Hofmann, R.W., Jahufer, M. Z. Z., Barrett, B. A. (2014): Variation for constitutive flavonols and morphological traits in a new white clover population. Environ. Exp. Bot. 105, 65–69.
- Bates, L. S., Waldren, R. P., Teare, I. K. (1973): Rapid determination of free proline for water stress studies. Plant Soil 39:205–208. doi:10.1007/BF00018060
- Bray, E. A., Bailey-Serres, J., Weretilnyk, E. (2000): Responses to abiotic stresses. In: W Grissem, B., Buchannan, R., Jones, eds, Biochemistry and Molecular Biology of Plants. American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD, pp. 1158–1249.
- Brown, J. E. (1998): Structural dependence of flavonoid interactions with Cu²⁺ ions: implications for their antioxidant properties, Biochem. J. 33: 1173-1197.
- Buckley, C., Bund, S. J., McTaggart, F. (1996): Oxidized low-density lipoproteins inhibit endothelium dependent relaxations in isolated large and small rabbit coronary arteries. J. Auton. Pharmacol.16: 261-267.
- Chang, C., Yang, M., Wen, H., Chern, J. (2002): Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. J. Food Drug Analysis 10: 178-182.
- Choat, B., Jansen, S., Brodribb, T. J., Cochard, H., Delzon, S., Bhaskar, R., Bucci, S. J., Feild, T. S., Gleason, S. M., Hacke, U. G., Jacobsen, A. L., Lens, F., Maherali, H., Martinez - Vilalta, J., Mayr, S., Mencuccini, M., Mitchell, P. J., Nardini, A., Pittermann, J., Pratt, R. B., Sperry, J. S., Westoby, M., Wright, I. J., Zanne, A. E. (2012): Global convergence in the vulnerability of forests to drought. Nature 491: 752–755.
- Cushman, J. C., Bonnert, H. J. (2000): Genomic Approaches to Plant Stress Tolerance, Curr. Opin. Plant Biol., vol. 3, pp. 117–124.
- Devasagayam, T.P.A., Tilak, J. C., Bloor, K.K., Ketaki Sane, S., Saroj, S., Ghaska dbi, Lele, R. D. (2004): Review article.

- Free Radicals and Antioxidants in Human Health: Current Status and Future Prospects. Japi; 52.
- Faccoli, M., Stergulc, F. (2004): *Ips typographus* (L.) pheromone trapping in south Alps: spring catches determine damage thresholds. *Journal of Applied Entomology*, 128, 307–311.
- Farrant, J. M. (2000): A comparison of mechanisms of desiccation tolerance among three angiosperm resurrection plant species. *Plant Ecol.* 151: 29-43.
- Farrant, J. M. (2003): An investigation into the role of light during desiccation of three angiosperm resurrection plants. *Plant Cell Environ.* 26: 1275-1291.
- Gould, K. S., Neill, S. O., Vogelmann, T. C. (2002): A unified explanation for anthocyanins in leaves? In: *Anthocyanins in Leaves. Advances in Botanical Research*, vol. 37, Gould, K. S., Lee, D. W. Eds., Academic Press, Amsterdam, 167.
- Hare, P. D. (1997): Cress, Metabolic implications of stress-induced proline accumulation in plants, *Plant Growth Regul.* 21 79e102.
- Kang H. M., Salveit M. E. (2002): Antioxidant Enzymes and DPPH-Radical Scavenging Activity in Chilled and Heat-Shocked Rice (*Oryza sativa* L.) Seedlings Radicles *J. Agric. Food Chem.* 50: 513–518.
- Kavi Kishor, P. B. et al. (2005): Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: its implications in plant growth and abiotic stress tolerance. *Curr. Sci.* 88: 424– 438.
- Kebert, M., Rapparini, F., Neri, L., Bertazza, G., Orlović, S., Biondi, S. (2016): Copper-induced responses in poplar clones are associated with genotype- and organ-specific changes in peroxidase activity and proline, polyamine, ABA, and IAA levels" *Journal of Plant Growth regulation* DOI 10.1007/s00344-016-9626-x.
- Lin, K. H., Chao, P. Y., Yang, C. M., Cheng, W. C., Lo, H. F., Chang, T. R. (2006): The effects of flooding and drought stresses on the antioxidant constituents in sweet potato leaves, *Botanical Studies* 47: 417-426.
- Markovic, Č., Jančić, G., Milanović, S. (2004): Bark beetle *Ips typographus* (L.), *Pityogenes chalcographus* (L.) and *Xyloterus lineatus* (Oliv.) (Coleoptera, Scolytidae) outbreak on Mt. Stara Planina. *Biljni Lekar* 2:144–149.
- Marković, C., Stojanović, A. (2010): Differences in bark beetle (*Ips typographus* and *Pityogenes chalcographus*) abundance in strict spruce reserve and surrounding spruce forest of Serbia. *Phytoparasitica* 38 (1):31-37.
- Matysik, J. et al. (2002): Molecular mechanisms of quenching of reactive oxygen species by proline under stress in plants. *Curr. Sci.* 82, 525–532.
- McDowell, N. G., Allen, C. D., Marshall, L. (2010): Growth, carbon-isotope discrimination, and drought-associated mortality across a *Pinus ponderosa* elevational transect. *Global Change Biol.* 16: 399–415.
- McDowell, N., Pockman, W. T., Allen, C. D., Breshears, D. D., Cobb, N., Kolb, T., Plaut, J., Sperry, J., West, A., Williams, D. G., Yezzer, E. A. (2008): Mechanisms of plant survival and mortality during drought: why do some plants survive while others succumb to drought? *New Phytol.* 178: 719–739.

- Mittler, R. (2002): Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci* 9: 405–410.
- Mittler, R. (2006): Abiotic stress, the field environment and stress combination. *Trends Plant Sci* 11:15–19.
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M., Van Breusegem, F. (2004): Reactive oxygen gene network of plants. *Trends Plant Sci.* 9: 490-498.
- Nakabayashi, Mori, T., Saito, K. (2014): Alternation of flavonoid accumulation under drought stress in *Arabidopsis thaliana* *Plant Signaling & Behavior* 9, e29518.
- Pratico, D., Lawson, J. A., Rokach, J., Fitzgerald G. A. (2001): Theisoprostanes in biology and medicine. *Trends Endocrinol. Metab.*12: 243-247, proline for water stress studies. *Plant Soil* 39: 205–208. doi:10.
- Rice - Evans C. A., Miller N. J., Paganga G. (1996): Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Biol. Med.*20: 933-944.
- Rice - Evans, C. E., Miller, N. J. (1996): Antioxidant activities of flavonoids as bioactive components of food. *Biochem. Soc. Trans.* 24: 790-795.
- Rizhsky, L. et al. (2002): Double antisense plants with suppressed expression of ascorbate peroxidase and catalase are less sensitive to oxidative stress than single antisense plants with suppressed expression of ascorbate peroxidase or catalase. *Plant J.* 32(3): 329-342.
- Rizhsky, L., Liang, H., Shuman, J., Shulaev, V., Davletova, S., Mittler R. (2002): When defense pathways collide. The response of *Arabidopsis* to combination of drought and heat stress. *Plant Physiol* 134:1683–1696.
- Sala, A. (2009): Lack of direct evidence for the carbon-starvation hypothesis to explain drought-induced mortality in trees. *Proc Natl AcadSci USA* 106: E68; author reply E69 Sala, A., Piper, F., Hoch, G. (2010): Physiological mechanisms of drought-induced tree mortality are far from being resolved. *New Phytol* 186: 274–280.
- Samanta, A., Ganguly S., Myneni R. B. (2011): MODIS enhanced vegetation index data do not show greening of Amazon forests during the 2005 drought, *New Phytol.* 189(1): 12–15.
- Shahidi, F., Chandrasekara, A. (2010): Hydroxycinnamates and their in vitro and in vivo antioxidant activities. *Phytochem. Rev.* 9: 147–170.
- Singleton, V. L., Orthofer, R., Lamuela-Raventos, R. M. (1999): Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol.* 299: 152-178.
- Soler-Rivas, C., Espin, J. C., Wichers, H. J. (2000): An easy and fast test to compare total free radical scavenger capacity of foodstuffs. *Phytochem. Anal.*11: 330-338.
- Szabados, L., Savoure, A. (2010): Proline: a multifunctional amino acid. *Trends Plant Sci* 15:89–97. doi:10.1016/j.tplants.2009.11.009
- Štajner, D., Orlović, S., Popović, B. M., Kebert, M., Galić, Z. (2011): Screening of drought oxidative stress tolerance in Serbian melliferous plant species. *Afr. J. Biotechnol.* 10: 1609-1614.

- Štajner, D., Orlović, S., Popović, B. M., Kebert, M., Stojnić, S., Klačnja, B. (2013): Chemical parameters of oxidative stress adaptability in beech. *J. Chem.* 4: 1-8.
- Widodo et al. (2009): Metabolic responses to salt stress of barley (*Hordeum vulgare* L.) cultivars, Sahara and Clipper, which differ in salinity tolerance. *J. Exp. Bot.* 60: 4089–4103.
- Yamasaki, H., Sakihama, Y., Ikehara, N. (1997): Flavonoid-peroxidase reaction as a detoxification mechanism of plant cells against H₂O₂. *Plant Physiol.* 115:1405.
- Zhu, Z., Liang, Z., Han, R. (2009): Saikosaponin accumulation and antioxidative protection in drought-stressed *Bupleurum chinense* DCX. *Plants Environ. Exp. Bot.* 66: 326-333.

Summary

BIOCHEMICAL SCREENING ASSAYS AS DROUGHT INDICATORS IN SPRUCE (*Picea abies* Karst.) ON MOUNTAIN KOPAONIK

Marko Kebert, Bratislav Matović, Saša Orlović, Branislav Trudić, Vanja Vuksanović, Marina Katanić, Vladislava Galović

The aim of this study was to elucidate underlying biochemical mechanisms of drought induced in spruce species on Kopaonik mountain by application of antioxidant assays for estimation of oxidative stress in spruce needles that were characterized as healthy as well as those that exhibit symptoms of severe drought. Results of radical scavenger capacities against DPPH and ABTS radicals, showed increased values in drought affected needles thus exhibiting higher antioxidant properties. With further analysis we proved that drought conditions induced biosynthesis of compounds with high antioxidant properties, therefore amounts of total phenolic compounds (TPC) as well as flavonoids was found to be significantly increased in drought samples comparing to the controls. Amount of phenolics in healthy needles were about 4.98 mM gallic acid (GAE equivalents per g of DW), while in needles under drought were almost doubled. Similarly, flavonoid content in dry needles was for 70 % higher than in the healthy ones. Drastically elevated level of lipid peroxidation measured by quantification of its end product malonyl-dialdehyde (MDA) indicated that drought induced oxidative stress, so concentration of MDA in needles under drought was about 324 nmol/g DW, while in healthy needles was around 153 nmol/g DW. Furthermore, under drought condition free proline accumulation (around 600 μ mol/ g DW) was significantly higher comparing to the healthy controls (220 μ mol/ g DW). To sum up, accumulation of free proline followed by increased amounts of flavonoids and total phenolics represents one of the main mechanisms how spruce cope with drought and mitigate oxidative stress caused by drought. All obtained data indicate that application of biochemical assays could serve as a diagnostic tool for recognition of early symptoms of drought and could serve as a criterion for selection of individuals that are more tolerant to drought stress.

Key words: drought, spruce, oxidative stress, proline, phenolic compounds