

**Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Sveučilište u Dubrovniku
Institut Ruđer Bošković u Zagrebu**

**Poslijediplomski interdisciplinarni sveučilišni studij
*Molekularne bioznanosti***

Antonela Markulj Kulundžić, mag. ing. agr.

**Biokemijski mehanizmi regulacije učinkovitosti fotosustava II u
listovima suncokreta pod utjecajem okolišnog stresa**

Doktorska disertacija

Osijek, 2019.

Doktorska disertacija izrađena je na Odjelu za oplemenjivanje i genetiku industrijskog bilja i Agrokemijskom laboratoriju Poljoprivrednog instituta Osijek te u Laboratoriju poslijediplomskog interdisciplinarnog sveučilišnog studija Molekularne bioznanosti Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, pod mentorstvom prof. dr. sc. Hrvoja Lepeduša i prof. dr. sc. Vere Cesar u sklopu znanstvenih projekata Ministarstva znanosti, obrazovanja i športa RH: „Stabilnost genotipova suncokreta na važna agronomska svojstva i kakvoću ulja“ (073-0000000-3538) voditelja dr. sc. Miroslava Krizmanića i „Utjecaj oksidativnog stresa na organizaciju i funkciju biljnih stanica i tkiva“ (073-0731674-1673) voditelja prof. dr. sc. Hrvoja Lepeduša.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Sveučilište u Dubrovniku
Institut Ruder Bošković
Poslijediplomski interdisciplinarni sveučilišni
studij Molekularne bioznanosti

Doktorska disertacija

Znanstveno područje: Interdisciplinarno područje znanosti
Znanstvena polja: Poljoprivreda, Biologija

Biokemijski mehanizmi regulacije učinkovitosti fotosustava II u listovima suncokreta pod utjecajem okolišnog stresa

Antonela Markulj Kulundžić, mag. ing. agr.

Disertacija je izradena na: Poljoprivrednom institutu Osijek (Odjel za oplemenjivanje i genetiku industrijskog bilja i Agrokemijski laboratorij) i u Laboratoriju poslijediplomskog interdisciplinarnog sveučilišnog studija Molekularne bioznanosti, Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Mentor/i: Prof. dr. sc. Hrvoje Lepeduš, redovit profesor
Prof. dr. sc. Vera Cesar, redovita profesorica u trajnom zvanju

Kratki sažetak doktorske disertacije:

Istraživanje je provedeno na listovima osam hibrida suncokreta u poljskim uvjetima tijekom faze cvatnje sa svrhom utvrđivanja razlika u fotosintetskoj učinkovitosti i biokemijskim parametrima stresa. Cilj je bio istražiti razlike u mehanizmima regulacije učinkovitosti fotosustava II između dva hibrida odabrana na temelju klaster analize različitih fizioloških i biokemijskih karakteristika u uvjetima okolišnog stresa uzrokovanog povišenom temperaturom i suviškom svjetlosti. Iz provedenih analiza utvrđene su statistički značajne razlike između istraživanih hibrida suncokreta pri čemu su hibridi pokazali različitu osjetljivost na okolišni stres uzrokovan povišenim temperaturama i suviškom svjetlosti kao i različit genetski potencijal za rodnost. Porast temperatura i intenziteta svjetlosti u ranim poslijepodnevnim satima doveli su do promjena u fluorescenciji klorofila *a* na svih osam testiranih hibrida što je rezultiralo sa smanjenjem učinkovitosti fotosintetskog aparata. Iz prikazanih rezultata sinergijskog djelovanja toplinskog i svjetlosnog stresa za odabrana dva hibrida može se zaključiti da je hibrid 7 osjetljiviji u odnosu na hibrid 4. Prikazani rezultati ovog istraživanja mogu se koristiti za potrebe provođenja oplemenjivanja suncokreta pri povećanju tolerancije genotipova na abiotičke stresore.

Broj stranica: 147

Broj slika: 27

Broj tablica: 7

Broj literaturnih navoda: 292

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: *Helianthus annuus* L., fluorescencija klorofila *a*, stres, temperatura, svjetlost, urod zrna

Datum obrane: 15. siječnja 2019.

Stručno povjerenstvo za obranu:

1. **Dr. sc. Aleksandra Sudarić**, znanstvena savjetnica u trajnom zvanju Poljoprivrednog instituta Osijek, predsjednica;
2. **Izv. prof. dr. sc. Janja Horvatić**, izvanredna profesorica Odjela za biologiju Sveučilišta J. J. Strossmayera u Osijeku, član;
3. **Dr. sc. Marija Viljevac Vuletić**, znanstvena suradnica Poljoprivrednog instituta Osijek, član;
4. **Dr. sc. Ivna Štolfa Čamagajevac**, docentica Odjela za biologiju Sveučilišta J. J. Strossmayera u Osijeku, zamjena člana

Disertacija je pohranjena u: Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici Zagreb, Ul. Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb; Gradskoj i sveučilišnoj knjižnici Osijek, Europska avenija 24, Osijek; Sveučilištu Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Trg Sv. Trojstva 3, Osijek

BASIC DOCUMENTATION CARD

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek
University of Dubrovnik
Ruđer Bošković Institute
University Postgraduate Interdisciplinary Doctoral Study of
Molecular Biosciences

PhD thesis

Scientific Area: Interdisciplinary Area of Science

Scientific Fields: Agriculture, Biology

Biochemical regulatory mechanisms of photosystem II efficiency in sunflower leaves affected by the environmental stress

Antonela Markulj Kulundžić, M Eng. Agriculture

Thesis performed at: Agricultural Institute Osijek (Department for Breeding and Genetics of Industrial Plants and Agrochemical Laboratory) and Laboratory of University Postgraduate Interdisciplinary Doctoral Study of Molecular Biosciences, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek

Supervisor: Hrvoje Lepeduš, PhD, Full Professor
Vera Cesar, PhD, Full Professor

Short abstract:

The research was conducted in field conditions on leaves of eight sunflower hybrids during flowering with the purpose of determining the differences in the photosynthetic efficiency and biochemical stress parameters. The aim was to investigate the differences in the regulatory mechanisms of the photosystem II efficiency between two hybrids with different physiological and biochemical characteristics which were subjected to environmental stress caused by elevated temperatures and excess light. Two tested hybrids were chosen by the cluster analysis. Statistically significant differences were observed between the investigated sunflower hybrids which demonstrated differences in sensitivity to environmental stress caused by elevated temperatures and excess light as well as differences in genetic potential for yield. Elevated temperatures and excess light in the early afternoon hours have led to changes in the chlorophyll *a* fluorescence on all eight tested hybrids resulting in reduction in efficiency of the photosynthetic apparatus. The results of the synergistic effects of heat and light stress on the two selected hybrids lead to the conclusion that hybrid 7 is more sensitive than hybrid 4. The results of this study can be used for sunflower breeding programmes aiming to increase the tolerances of genotypes to abiotic stresses.

Number of pages: 147

Number of figures: 27

Number of tables: 7

Number of references: 292

Original in: Croatian

Key words: *Helianthus annuus* L., chlorophyll *a* fluorescence, stress, temperature, light, seed yield

Date of the thesis defense: January 15 2019

Reviewers:

1. Aleksandra Sudarić, PhD, Senior Scientific Advisor, Agricultural Institute Osijek;
2. Janja Horvatić, PhD, Associate Professor, Department of Biology, J. J. Strossmayer University of Osijek;
3. Marija Viljevac Vuletić, PhD, Scientific Associate, Agricultural Institute Osijek;
4. Ivna Štolfa Čamagajevac, PhD, Assistant Professor, Department of Biology, J. J. Strossmayer University of Osijek

Thesis deposited in: National and University Library in Zagreb, Ul. Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb; City and University Library of Osijek, Europska avenija 24, Osijek; Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Trg Sv. Trojstva 3, Osijek

„Nastupit će vrijeme kada će brižna višestoljetna istraživanja iznijeti na svjetlost dana ono što je sada još skriveno. Doći će vrijeme kada će naši potomci biti zapanjeni spoznajama koje mi danas ne znamo, a njima su jasne same po sebi. Mnoga su otkrića čuvana za vremena koja tek dolaze, za godine u kojima će sjećanja na nas već izbledjeti. Naš bi svijet bio ubogo mjesto kada svakoj epohi ne bi imao ponuditi nešto za istraživanje... priroda ne otkriva svoje tajne odjednom i svima.“

Lucije Enej Seneka

Doktorsku disertaciju posvećujem svojim roditeljima, ocu Frani koji nas je prerano napustio i majci Milki, koji su mi omogućili školovanje i odgojili me u ljubavi i poštenju.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Suncokret	5
1.1.1. Značaj suncokreta.....	5
1.1.2. Taksonomija, genom i porijeklo suncokreta.....	6
1.2. Utjecaj abiotičkih čimbenika na uzgoj biljaka	7
1.2.1. Toplinski stres.....	10
1.2.2. Svjetlosni stres.....	13
1.2.3. Utjecaj temperature i svjetla na morfologiju suncokreta.....	15
1.3. Fotosinteza i fluorescencija klorofila <i>a</i>	17
1.3.1. Fotosinteza.....	17
1.3.2. Fluorescencija klorofila <i>a</i>	19
1.4. Agronomska svojstva suncokreta	22
1.4.1. Urod zrna.....	22
2. CILJEVI I HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA	24
2.1. Ciljevi istraživanja	25
2.2. Hipoteze	25
3. MATERIJALI I METODE	26
3.1. Biljni materijali	27
3.2. Opis eksperimenta	28
3.2.1. Poljski pokus.....	28
3.2.2. Agrotehnika pokusa.....	28
3.3. Klima i vremenski uvjeti tijekom istraživanja	30
3.3.1. Klima istočne Slavonije.....	30
3.3.2. Vremenske prilike za lokaciju Osijek.....	30
3.4. Laboratorijske analize i određivanje fotosintetske učinkovitosti biljaka	33
3.4.1. Određivanje relativnog sadržaja vode.....	33
3.4.2. Određivanje razine lipidne peroksidacije.....	34
3.4.3. Određivanje aktivnosti enzima gvajakol peroksidaze.....	34
3.4.3.1. Ekstrakcija topljivih proteina.....	34
3.4.3.2. Određivanje aktivnosti gvajakol peroksidaze.....	35
3.4.4. Određivanje udjela suhe tvari.....	35
3.4.5. Određivanje koncentracije fotosintetskih pigmenata.....	36
3.4.6. Mjerenje polifaznog rasta fluorescencije klorofila <i>a</i>	37
3.4.7. SDS elektroforeza topljivih i membranskih proteina i imunodetekcija.....	38
3.4.7.1. Ekstrakcija topljivih i membranskih proteina.....	38
3.4.7.2. SDS elektroforeza u poliakrilamidnom gelu (SDS – PAGE).....	39
3.4.7.3. <i>Western blot</i> analiza i imunodetekcija.....	39
3.5. Urod zrna	41
3.5.1. Određivanje uroda zrna.....	41
3.6. Statistička obrada podataka	42
4. REZULTATI	43

4.1.	Relativni sadržaj vode.....	44
4.2.	Razina lipidne peroksidacije.....	45
4.3.	Ukupna aktivnost enzima gvajakol peroksidaze.....	46
4.4.	Specifična aktivnost enzima gvajakol peroksidaze.....	47
4.5.	Koncentracija topljivih proteina.....	48
4.6.	Udio suhe tvari.....	49
4.7.	Koncentracija fotosintetskih pigmenata.....	50
4.7.1.	Klorofil <i>a</i>	50
4.7.2.	Klorofil <i>b</i>	51
4.7.3.	Ukupni klorofil <i>a</i> i <i>b</i>	52
4.7.4.	Omjer klorofila <i>a</i> i <i>b</i>	53
4.7.5.	Ukupni karotenoidi.....	54
4.7.6.	Omjer ukupnih klorofila <i>a</i> i <i>b</i> i ukupnih karotenoida.....	55
4.8.	Fotosintetska učinkovitost.....	56
4.8.1.	Maksimalni kvantni prinos fotosustava II.....	56
4.8.2.	Indeks fotosintetske učinkovitosti.....	57
4.9.	Urod zrna suncokreta.....	58
4.10.	Klaster analiza istraživanih hibrida suncokreta.....	59
4.11.	OJIP porast fluorescencije klorofila <i>a</i>	61
4.12.	Fluorescencija klorofila <i>a</i>	63
4.12.1.	Parametri OJIP porasta fluorescencije klorofila <i>a</i>	63
4.12.2.	Učinkovitost fotosustava II.....	65
4.12.3.	Prijenos energije po aktivnom reakcijskom središtu.....	66
4.12.4.	Indeks fotosintetske učinkovitosti i njegove komponente.....	68
4.13.	Relativna akumulacija fotosintetskih proteina Lhcb2, D1, citokroma <i>f</i> i Rubisco LSU.....	70
5.	RASPRAVA.....	71
5.1.	Utjecaj toplinskog i svjetlosnog stresa na parametre utvrđene laboratorijskim metodama.....	72
5.2.	Fotosintetska učinkovitost tijekom utjecaja toplinskog i svjetlosnog stresa.....	79
5.3.	Utjecaj toplinskog i svjetlosnog stresa na fotosintetske proteine.....	85
5.4.	Urod zrna suncokreta pod djelovanja toplinskog i svjetlosnog stresa.....	88
6.	ZAKLJUČAK.....	89
7.	POPIS LITERATURE.....	94
8.	SAŽETAK.....	120
9.	SUMMARY.....	123
10.	PRILOZI.....	126
11.	ŽIVOTOPIS.....	132

POPIS KRATICA

ABS	engl. <i>absorption</i> – apsorpcija
ADP	adenozin difosfat
ANOVA	engl. <i>analysis of variance</i> – analiza varijance
ATP	adenozin trifosfat
BSA	engl. <i>Bovine Serum Albumin</i> – albumin goveđeg seruma
Car	karotenoidi
CBB	engl. <i>Coomassie Brilliant Blue</i> – Coomassie briljant plavo
Chl a	klorofil a
Chl a+b	ukupni klorofil a i b
Chl b	klorofil b
Chl a/b	omjer klorofila a i b
Chl a+b/Car	omjer ukupnih klorofila a i b i karotenoida
CS	engl. <i>excited Cross Section</i> – ekscitirana površina
Cyt b6f	citokrom b6f
Cyt f	citokrom f
DHMZ	Državni hidrometeorološki zavod
DI	engl. <i>dissipation</i> – rasipanje suvišne energije
DNA	engl. <i>deoxyribonucleic acid</i> – deoksiribonukleinska kiselina
DTT	ditiotreitol
DW	engl. <i>dry weight</i> – suha tvar
EDTA	engl. <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i> – etilendiamintetraoctena kiselina
ET	engl. <i>electron transport</i> – transport elektrona
F₀	minimalni intenzitet fluorescencije
Fd	feredoksin
F_m	maksimalni intenzitet fluorescencije
F_v/F_m	maksimalni kvantni prinos fotosustava II
FW	engl. <i>fresh weight</i> – svježa tvar
GPOD	engl. <i>guaiacol peroxidase</i> – gvajakol peroksidaza
LHC	engl. <i>light harvesting complex</i> – kompleksi za prikupljanje svjetlosti
LHCI	engl. <i>light harvesting complex of photosystem I</i> – kompleksi za prikupljanje svjetlosti fotosustava I
LHCII	engl. <i>light harvesting complex of photosystem II</i> – kompleksi za prikupljanje svjetlosti fotosustava II
LSD	engl. <i>least significant difference</i> – najmanja značajna razlika
LSU	engl. <i>large subunit</i> – velika podjedinica Rubisco-a
MDA	malondialdehid
NADP⁺	nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (oksidirana forma)
NADPH	nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (reducirana forma)
NZ	nije značajno
OEC	engl. <i>oxygen evolving center</i> – kompleks koji katalizira oksidaciju vode

OJIP	porast fluorescencije od O do P faze
PEA	engl. <i>Plant efficiency analyzer</i> – analizator učinkovitosti fotosinteze
PC	plastocijanin
PI_{ABS}	engl. <i>performance index</i> – indeks fotosintetske učinkovitosti
PIO	Poljoprivredni institut Osijek
PUFA	engl. <i>polyunsaturated fatty acids</i> – višestruko nezasićene masne kiseline
PVP	polivinil pirolidon
PQ	plastokinona
PQH₂	plastohidrokinon
Q_A	vezani plastokinon
Q_B	slabo vezani plastokinon
RC	engl. <i>reaction center</i> – reakcijsko središte
RNA	engl. <i>ribonucleic acid</i> – ribonukleinska kiselina
ROS	engl. <i>reactive oxygen species</i> – reaktivne kisikove jedinke
Rubisco	ribuloza-1,5-bisfosfat karboksilaza/oksigenaza
RuBP	ribuloza-1,5-fosfat
RWC	engl. <i>relative water content</i> – relativni sadržaj vode
SDS	engl. <i>sodium dodecyl sulphate</i> – natrij dodecil sulfat
SDS-PAGE	engl. <i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i> – denaturirajuća diskontinuirana elektroforeza u poliakrilamidnom gelu
SOD	engl. <i>superoxide dismutase</i> – superoksid dismutaza
TBA	tiobarbituratna kiselina
TBARS	engl. <i>thiobarbituric acid reactive substances</i> – supstance koje reagiraju s tiobarbiturnom kiselinom
TBST	pufer koji se sastoji od Tris NaCl pufera i polisorbata 20 (poznat kao Tween 20)
TCA	trikloroetena kiselina
Tris	tris(hidroksimetil)aminometan
TR	engl. <i>trapping</i> – hvatanje ekscitona
TW	engl. <i>turgid weight</i> – turgidna masa
V_J	engl. <i>relative variable fluorescence at J step</i> – varijabilna fluorescencija na J koraku
V_I	engl. <i>relative variable fluorescence at I step</i> – varijabilna fluorescencija na I koraku

1. UVOD

Suncokret (*Helianthus annuus* L.) je visokovrijedna i naširoko rasprostranjena uljarica koja se smatra vrlo značajnom sirovinom za proizvodnju ulja (Pospišil, 2013), ali se koristi i za proizvodnju brojnih drugih prehrambenih i neprehrambenih proizvoda (Onemli, 2012). Njegovi proizvodi svojom hranidbenom i ljekovitom vrijednošću doprinose prevenciji kardiovaskularnih bolesti (Nandha i sur., 2014).

Suncokret je jedna od kultiviranih biljaka koje imaju sposobnost prilagodbe na stresne uvjete uzgoja (Škorić, 2009, García-López i sur., 2014) pri čemu se stresorom smatra svaka tvar ili nepovoljno stanje koje ometa normalnu metaboličku funkciju biljnog organizma, odnosno utječe na rast i razvoj biljaka te njihovu produktivnost (Lichtenthaler, 1998). Nepovoljni abiotski čimbenici često su ograničavajući za poljoprivrednu proizvodnju u cijelom svijetu (Roy i sur., 2011, Gourdj i sur., 2013, Mustafa i sur., 2017), negativno utječu na kvalitetu većine gospodarskih usjeva (Mishra i sur., 2012) kao i na rast i razvoj biljaka (Mustafa i sur., 2017) te izazivaju varijacije uroda zrna brojnih kultura (Dolferus i sur., 2011, Mondal i sur., 2013). Također, abiotski čimbenici su vrlo bitni za produktivnost, preživljavanje i reprodukciju biljaka (Redondo-Gómez, 2013). Znanstvenici sugeriraju da će u mnogim regijama svijeta uslijed sve učestalijih nepovoljnih vremenskih prilika doći do sve većeg gubitka usjeva. Neke od spomenutih vremenskih prilika su sve prisutnije, kao što su nedostatak vode (Anjum i sur., 2011), loše distribuirane oborine (Donatelli i sur., 2015) i visoke temperature (Ayranci i sur., 2014) praćene suviškom svjetlosti u kritičnim fazama razvoja biljaka. Globalne klimatske promjene vode do povećanja dnevnih, sezonskih i godišnjih srednjih temperatura koje biljke doživljavaju, a izazvane su intenzivnim Sunčevim zračenjem. Budući da su biljke sesilni organizmi i ne mogu se maknuti iz nepovoljnih okolišnih uvjeta, njihova sposobnost da se prilagode varijabilnim temperaturama okoliša i intenzitetu svjetlosti bitna je za njihov opstanak (Yamori i sur., 2014).

Toleranciju na stres biljke postižu fiziološko-biokemijskim mehanizmima koje reguliraju brojni produkti aktivnih gena ili neke druge molekule (Vukadinović i sur., 2014) pri čemu različiti uzročnici abiotskog stresa mogu izazvati iste fiziološke mehanizme obrane (Atienza i sur., 2004). Kod biljaka, odnosno genotipova koji nemaju razvijenu toleranciju na stresne uvjete, nastaju poremećaji stanične homeostaze i poremećaji u aktivnosti metabolizma koji neposredno mogu narušiti njegovu normalnu funkciju uzrokovanu prekomjernom proizvodnjom reaktivnih kisikovih jedinki (engl. *reactive oxygen species* – ROS). Suprotno tome, pojedine biljne vrste i genotipovi unutar vrste mogu stvoriti toleranciju na date uvjete putem mehanizama obrane (Madhava Rao, 2006). Učinak stresa na biljku ovisi o njenim mogućnostima preživljavanja, odnosno akumulaciji biomase ili procesu asimilacije koji su usko povezani s rastom biljke. Utjecaj okolišnih čimbenika na biljku ovisi o duljini njihovog djelovanja na biljku, fazi razvoja biljke i njenoj tolerantnosti (Pevalek-Kozlina, 2003). Primarni okolišni čimbenici koji utječu na razvoj biljaka su uvjeti okoline koji podrazumijevaju utjecaj temperature, svjetla, vlage, oborina, sastav tla, ugljičnog dioksida i brojni drugi.

Fiziološki i biokemijski mehanizmi koji dovode do smanjene produktivnosti biljke u svojoj osnovi imaju oksidacijski stres, kojeg uzrokuje prekomjerno stvaranje ROS-ova. Veliki broj istraživanja nedvojbeno je pokazao kako su kloroplasti jedno od glavnih mjesta proizvodnje ROS-ova, te kako suboptimalni okolišni uvjeti potiču stvaranje suviška ROS-ova narušavajući ravnotežu između apsorpcije svjetlosne energije i njenog učinkovitog iskorištenja u procesu fotosinteze (Mittler, 2006). U tim slučajevima veliku ulogu imaju antioksidacijski sustavi zaštite koji smanjuju mogućnost nastanka oksidacijskog oštećenja u biljnom organizmu čija manifestacija ovisi o biljnoj vrsti. Stanice za razgradnju ROS-ova koriste neenzimske antioksidanse (glutation, askorbinska kiselina – vitamin C, karotenoidi, tokoferoli – vitamin E, prolin) i enzime stresa čija je glavna uloga uklanjanje vodikovog peroksida (gvajakol i glutation peroksidaza, glutation reduktaza, superoksid dismutaza, askorbat peroksidaza, katalaza i drugi enzimi) (Asada, 2006, Radić, 2007, Gill i Tuteja, 2010). Također, pri uzgoju biljaka u nepovoljnim uvjetima dolazi do zatvaranja puči čime se sprječava gubitak vode iz biljke nakon čega slijedi niz procesa koji prilagođavaju fotokemiju fotosinteze, fiksaciju ugljika i transport ugljikohidrata inicirajući proces održavanja integriteta fotosintetskog aparata (Bohnert i Bressan, 2001). Jedna od najosjetljivijih regulatornih komponenti u tom procesu je fotosustav II koji je izgrađen od većeg broja (oko 25) polipeptida i funkcionira kao voda-plastokinon oksidoreduktaza.

Fotosinteza je biološki proces kojim se svjetlosna energija pretvara u kemijsku energiju koju potom biljke koriste za aktivnosti organizma (McGraw-Hill, 2007). Apsorpcija svjetlosti i pretvorba svjetlosne energije u kemijsku odvijaju se u fotosustavu II, citokrom *b₆f* kompleksu i fotosustavu I koji se nalaze u tilakoidnim membranama kloroplasta (Kouřil i sur., 2012). Budući da je fotosinteza već odavno prepoznata kao jedan od procesa na kojeg utječu okolišni uvjeti, razumijevanje fizioloških procesa kojima temperatura i svjetlost utječu na proces fotosinteze, važan je za poljoprivrednu proizvodnju. Iz tog razloga, ispitivanje fotosintetske učinkovitosti u uvjetima stresa bila je tema brojnih dosadašnjih istraživanja u kojima je metoda mjerenja fluorescencije klorofila *a* često korištena prilikom utvrđivanja pojave stresa na biljci preko njezine fotosintetske učinkovitosti. Fluorescencija klorofila *a* predstavlja emitiranje male količine energije u obliku svjetlosti kada se elektron brzo vraća iz pobuđenog stanja u osnovno te daje informaciju o funkcioniranju lanca transporta elektrona u fotosustavu II (Strasser i sur., 2004, Vukadinović i sur., 2014). Mnogi znanstvenici pomoću parametara OJIP testa, preko kojih se prikazuje fluorescencija klorofila *a*, utvrđuju razinu oštećenja fotosintetskog aparata prilikom uzgoja biljaka pri čemu su parametri maksimalni kvantni prinos fotosustava II (F_v/F_m) i indeks fotosintetske učinkovitosti (PI_{ABS}) najučestaliji u istraživanjima s ciljem otkrivanja utjecaja stresa na biljku prije pojave vidljivih morfoloških i fizioloških oštećenja (Dąbrowski i sur., 2016).

Povezivanje procesa fotosinteze, funkcije gena i svojstava važnih za poljoprivrednu proizvodnju kao što su urod, građa biljke i tolerantnost na nepovoljne abiotičke uvjete postalo je od iznimne važnosti za pitanje urbanog razvoja te konstantno rastućeg broja ljudske populacije čime se povećavaju potrebe za hranom na svjetskoj razini. Imajući to u

vidu, razvoj fiziologije bilja i genomike u posljednjih 20 godina doveo je do boljeg razumijevanja reakcije biljaka na stres te mehanizama odgovornih za različite razine tolerantnosti koje uočavamo u prirodi. Razumijevanje mehanizama uključenih u odgovor biljaka na nepovoljne ekološke uvjete je, bez sumnje, prvi korak u stvaranju usjeva s visokom tolerancijom na stres koji se pokazao kao kompleksan zadatak prilikom oplemenjivanja biljaka (Pérez-Torres i sur., 2009, Šimić i sur., 2014).

1.1. Suncokret

1.1.1. Značaj suncokreta

Suncokret se u svijetu uzgaja u širokom arealu rasprostranjenosti. Na sjevernoj hemisferi se uzgaja od 32° do 52° sjeverne geografske širine, a na južnoj od 10° do 40° južne geografske širine. Prema podacima s Faostat-a (2017) od 1961. do 2014. godine proizvodnja i urod suncokreta konstantno se povećavaju uz oscilacije po godinama. U prilog tome ide činjenica da je 1961. godine suncokret bio zasijan na oko 7 milijuna hektara, a 2014. godine na preko 23 milijuna hektara. U posljednjih 20 godina (1995. – 2014.) lider u proizvodnji suncokreta u svijetu je Ruska Federacija s 5 545 680 tona iza koje slijede Ukrajina (5 037 116 t), Argentina (4 098 241 t), Kina-kopno (1 808 483 t) i Francuska (1 666 030 t). S obzirom na udio proizvodnje suncokreta po kontinentima, u zemljama Europe je najzastupljeniji s 59,2 % (Faostat, 2017). Suncokret je prema podacima za 2016. godinu u svjetskoj proizvodnji uljarica sudjelovao sa 8 % (Hussain i sur., 2018).

Povijest proizvodnje suncokreta u Republici Hrvatskoj seže od ranih tridesetih godina 20. stoljeća, ali je njegova ozbiljnija proizvodnja započela tek od 1970. godine. Proizvodnja suncokreta u Republici Hrvatskoj ovisi o trenutnom stanju u ekonomiji i društvu (Zmaić i sur., 2014). U zadnjih 20 godina suncokret se kod nas uzgaja na prosječno 30 tisuća hektara, što je mali udio u svjetskoj proizvodnji pri čemu je ostvaren urod zrna od 2,39 t/ha. Najvećim dijelom se u Republici Hrvatskoj uzgaja u njenim istočnim područjima koje karakteriziraju povoljniji vremenski uvjeti za njegov uzgoj za razliku od drugih dijelova zemlje. Kako bi zadovoljili naše potrebe za uljaricama nužno je proširiti proizvodnju suncokreta i na druge površine čime bi povećali njegovu proizvodnju. Zbog toga je potrebno uzgojiti hibride koji će biti adaptabilni u različitim uzgojnim područjima.

Suncokret je kultura koja zbog visokog sadržaja ulja u sjemenu ima veliki privredni značaj. Industrijska je biljka koja se u Republici Hrvatskoj prvenstveno uzgaja zbog proizvodnje jestivog biljnog ulja, a u svijetu se uz soju, uljanu repicu i palmu ubraja među četiri prioritetne uljane kulture. Suncokretovo ulje odlikuje visoka biološka i energetska vrijednost, te se zbog svog sastava smatra vrlo zdravim uljem (Marinković i sur., 2003). Njegovo sjeme u prosjeku sadrži oko 43 % ulja, 18 % bjelančevina, 26 % celuloze, 10 % nedušičnih tvari i 3 % minerala (Vratarić i sur., 2004). Ulje suncokreta je ukusno, bogato vlaknima, polinezasićenim masnim kiselinama (oko 54 – 61 % linolne kiseline) te ima mali udio zasićenih masnih kiselina, poput palmitinske i stearinske kiseline, a sadrži i vitamine A, D, E i K. Izuzetno je korisna biljka koja je odličan predusjev, ostavlja tlo nezakorovljeno i u dobrom fizičkom stanju, te je ujedno i poželjna medonosna kultura (Vratarić i sur., 2004, Gadžo i sur., 2011).

Proizvodnja suncokreta u Republici Hrvatskoj ne zadovoljava potrebe domaće uljarske industrije te ga zbog toga još uvijek moramo uvoziti. Prema podacima Statističkog ljetopisa (2016), 2015. godine, životinjskog i biljnog ulja te masti količinski je izvezeno u iznosu 209 700 tisuća kuna, a uvezeno 717 866 tisuća kuna. Prema Berville (2010) suncokretovo ulje je u Europi bilo zastupljeno sa 48 % od ukupne količine konzumnog ulja u odnosu na druga biljna ulja. Oko 90 % ukupne proizvodnje suncokretovog ulja koristi se za hranu, a preostalih 10 % za industrijske svrhe i za proizvodnju biodizela (Cvejić i sur., 2014). Suncokret je zahvaljujući raznolikosti tržišta i bogatstvu njegovog ulja postalo vrlo konkurentan usjev (Škorić, 2012), a samo pitanje kvalitete ulja od nedavno je postao jedan od glavnih izazova koje je tržište stavilo pred znanstvenike (Cvejić i sur., 2014). Namjena korištenja suncokretovog ulja uvelike ovisi o njegovoj kvaliteti. Suncokretovo ulje se u prehrambenoj industriji koristi prilikom pripremanja salata, prženja hrane, u slastičarstvu, proizvodnji margarina, majoneza i brojnih drugih proizvoda, dok se u neprehrambenoj industriji koristi za proizvodnju biodizela, različitih maziva te proizvodnju kozmetike (Vratarić i sur., 2004, Cvejić i sur., 2014). Kako bi poboljšali kvalitetu suncokretovog ulja, oplemenjivanje ima raznolike smjerove s obzirom na činjenicu da poželjne karakteristike suncokretovog ulja za jednu namjenu vrlo često nisu poželjne za neku drugu (Cvejić i sur., 2014). Prema Krizmaniću (2012a) oplemenjivanje suncokreta na kakvoću ulja se odvija u dva smjera. Prvi je kreiranje genotipova s najmanje 68 – 72 % sadržaja linolne kiseline, a drugi s više od 80 % oleinske kiseline u ulju. Stoga, je potrebno nastaviti koristiti suncokret kao poljoprivrednu kulturu i stvarati različitih tipove ulja s obzirom na njihovu namjenu korištenja u svrhu povećanja njegove kvalitete (Cvejić i sur., 2014).

1.1.2. Taksonomija, genom i porijeklo suncokreta

Prema botaničkoj klasifikaciji suncokret pripada carstvu *Plantae*, koljenu *Magnoliophyta*, razredu *Magnoliopsida*, redu *Asterales*, porodici *Asteraceae* (*Compositae*), rodu *Helianthus* te vrsti *Helianthus annuus* L. (Panero i Funk, 2002). Jednogodišnja je biljka s procijenjenim haploidnim genomom veličine oko 3000 Mb i $n = 17$ kromosoma (Arumuganathan i Earle, 1991), ali se njegov poliploidni kompleks sastoji od diploidnih ($2n = 2x = 24$), tetraploidnih ($2n = 4x = 68$) i heksaploidnih ($2n = 6x = 102$) vrsta.

Sjeme suncokreta potječe iz Meksika i Perua, a kultivirali su ga Indijanci u Sjevernoj Americi prije nekoliko tisuća godina. U Europu su ga u 16. stoljeću donijeli Španjolci i Francuzi, a dalje se postepeno prenosio među botaničarima diljem europskog kontinenta. Sjeme suncokreta je primjenjivano za hranu i lijekove, dok su biljke suncokreta bile korištene kao ornamentalne. U 19. stoljeću su ga Rusi počeli uzgajati na proizvodnim površinama (Vratarić i sur., 2004).

1.2. Utjecaj abiotičkih čimbenika na uzgoj biljaka

Biljke su tijekom rasta i razvoja izložene različitim uvjetima vanjske sredine koju karakterizira velik broj abiotičkih čimbenika koji u biljci mogu izazvati stres (Akter i Islam, 2017). Abiotički čimbenici su svi neživi utjecaji iz okoliša koje dijelimo na klimatske, edafske i orografske (fiziografske) čimbenike. Klimatske promjene kao abiotički čimbenici posredno, preko utjecaja na rast i razvoj biljaka, imaju velik značaj na proizvodnju hrane (Iqbal i sur., 2017). Zbog toga su abiotički čimbenici bili predmet istraživanja brojnih znanstvenih radova (Robakowski i Antczak, 2008, Whitney i sur., 2010, Buchner i sur., 2013, Akter i Islam, 2017).

Reakcija biljaka na stresne uvjete uzgoja je dvojaka. Pojedine biljke se prilagode uvjetima stresa, odnosno aklimatiziraju se na novonastale uvjete nakon kraćeg izlaganja istima, dok druge biljke imaju sposobnost adaptacije na nepovoljne uvjete preko genetski određenog stupnja otpornosti na stres. O promjeni morfoloških svojstava i fiziološkim mehanizmima ovisi prilagodljivost biljaka na uvjete okoliša pri čemu ta prilagodba utječe na rast biljke i njezin opstanak (Vukadinović i sur., 2014). Mehanizmi tolerancije na stres su jedinstveni i izrazito sofisticirani (Madhava Rao, 2006), a variraju s obzirom na biljnu vrstu i genotip unutar vrste (Smith i sur., 2001, Akter i Islam, 2017). Tolerancija biljaka na pojedini stres rezultira smanjenjem oštećenja, a ponekad posljedice mogu i potpuno izostati. Problem nastaje kada stresni, odnosno nepovoljni čimbenici djeluju kumulativno (Duque i sur., 2013), što je danas česta pojava, jer izazivaju bržu senescenciju biljaka, a to direktno vodi k smanjenju uroda (Feng i sur., 2014).

Poznato je kako u biljnim stanicama, dok su biljke izložene nekom od brojnih negativnih utjecaja abiotičkih čimbenika, dolazi do nastanka oksidacijskog stresa kojeg uzrokuje povećana količina reaktivnih slobodnih kisikovih čestica (O^{\cdot}) čija razina određuje tip odgovora na stres (Vranová i sur., 2002, Hussain i sur., 2018). Kisik može imati različite efekte koji potiču prilagodbu biljnih organizama na novonastale uvjete. U uvjetima oksidacijskog stresa dolazi do povećanog stvaranja reaktivnih kisikovih jedinica (engl. *reactive oxygen species* – ROS) koje nastaju prenošenjem ekscitacijske energije fotoaktivnih pigmenata (npr. prijenos molekule klorofila na kisik). U toj kemijskoj reakciji mogu nastati superoksidni radikal ($O_2^{\cdot-}$), vodikov peroksid (H_2O_2), hidroksilni radikal (OH^{\cdot}) ili molekularni kisik koji postaje fizikalno aktivan prenošenjem ekscitacijske energije fotoaktivnih pigmenata na kisik pri čemu dolazi do promjene spina jednog elektrona koji utječe na stvaranje singletnog kisika (1O_2) koji posjeduje sposobnost difuzije, reagira s organskim molekulama i izaziva oštećenja fotosintetskih membrana (Mittler, 2002, Halliwell, 2006, Marutani i sur., 2012). Reaktivne kisikove jedinice imaju bitnu ulogu u funkcioniranju biljnog sustava. U nižim koncentracijama sudjeluju u staničnoj signalizaciji mehanizma aklimatizacije i tolerancije (Hussain i sur., 2018), odnosno, kako bi spriječile nastanak stresa, biljke koriste ROS-ove kao signal za nastali poremećaj u normalnom funkcioniranju svojih sustava. ROS-ovi su nusprodukti normalnih metaboličkih procesa, a stvaraju se i razgrađuju neovisno o utjecaju stresa (Arora i sur.,

2002, del Rió, 2015). Najveći izvori ROS-ova su kloroplasti, odnosno reakcijska središta fotosustava I i fotosustava II. Također, ROS-ove u velikim količinama proizvode mitohondriji, peroksisomi (Mittler, 2002, Miller i sur., 2008) te plazma membrana i apoplast (Uzilday, 2015). Sadržaj ROS-ova je u normalnim uvjetima nizak, dok je u stresnim situacijama (npr. suvišak svjetlosti, toplinski stres, niske temperature, salinitet tla, zatrovanje tla teškim metalima) visok i izaziva oštećenja staničnih struktura, između ostalog i fotosintetskog sustava. Nadalje, u stresnim uvjetima uzgoja biljaka povećanje produkcije slobodnih radikala kisika i molekula (H_2O_2 , $^1\text{O}_2$, O_3 , HClO) dovodi do pomaka u ravnoteži biljnog sustava jer je otežano njihovo uklanjanje zbog nedostatnog kapaciteta antioksidativnih sustava što za posljedicu ima peroksidaciju lipida, oksidaciju proteina i aminokiselina te oštećenje DNA (deoksiribonukleinska kiselina) i RNA (ribonukleinska kiselina) što može dovesti do stanične smrti biljaka (Mittler, 2002).

Lipidna peroksidacija je u normalnim fiziološkim uvjetima prirodni metabolički proces, čije je povećanje intenziteta ujedno i jedan od najčešćih pokazatelja oksidacijskog stresa zbog čega je i najistraženija posljedica djelovanja ROS-ova na funkciju i strukturu membrana (Blokhina, 2000). Višestruko nezasićene masne kiseline (PUFA – engl. *polyunsaturated fatty acids*) česta su meta slobodnih radikala koji izazivaju peroksidaciju lipida pri čemu nastaju produkti poput malondialdehida (MDA) (Demiral i Türkan, 2005), koji su ujedno i najobilniji prirodni produkt lipidne peroksidacije, a reagiraju s tiobarbiturnom kiselinom (TBA). Tako utvrđena koncentracija MDA predstavlja intenzitet lipidne peroksidacije u biljnom tkivu koja se također može izražavati i kao TBARS (engl. *thiobarbituric acid reactive substances* – supstance koje reagiraju s tiobarbiturnom kiselinom). Ovisno o razini lipidne peroksidacije navedene mjere koriste se prilikom utvrđivanja tolerancije biljke na stres (Wang i sur., 2004). Jedna od posljedica intenzivne lipidne peroksidacije je oštećenje stanične membrane pri čemu se mijenja njezina fluidnost, permeabilnost ili integritet. Proces lipidne peroksidacije se sastoji od inicijacije, propagacije i terminacije (Schneider, 2009, Farmer i Mueller, 2013). Abiotski čimbenici utječu na lipidnu peroksidaciju pri čemu u većini slučajeva izazivaju povećanu koncentraciju njezinih produkata. Prema dosadašnjim istraživanjima dokazano je da peroksidaciju lipida uzrokuje toplinski stres (Larkindale i Knight, 2002), sušni stres (Gunes i sur., 2008, Sánchez-Reinoso i sur., 2018), solni stres (Jovičić i sur., 2017), stres izazvan teškim metalima kao što su olovo (Dey i sur., 2007), silicij (Gunes i sur., 2008) i kadmij (Dey i sur., 2007) te drugi uzročnici stresa.

Biljni organizmi mogu stvoriti toleranciju na stresne uvjete preko fiziološko-biokemijskih mehanizama koje reguliraju brojni geni kroz antioksidacijske sustave zaštite. Prema Alexieva i sur. (2003) te Sharma i sur. (2012) biljni antioksidacijski sustavi se dijele na vodotopljive antioksidanse – glutation i askorbat, koji detoksificiraju $\text{O}_2\cdot^-$ i H_2O_2 , antioksidanse topljive u lipidima poput α -tokoferola i β -karotena te enzimske antioksidanse poput gvajakol i glutation peroksidaza, glutation reduktaze, superoksid dismutaze, askorbat peroksidaze, katalaze i drugih enzima. Pri pojavi stresa prvi se aktivira enzim superoksid dismutaza (engl. *superoxide dismutase* – SOD) za razliku od gvajakol peroksidaze (engl.

guaiacol peroxidase – GPOD) čija aktivnost ovisi kako o intenzitetu i vrsti stresa tako i o biljnoj vrsti. Peroksidaze se nalaze u svim dijelovima stanice, odnosno u vakuoli, mitohondrijima, staničnoj stijenci, Golgijevu aparatu, endoplazmatskom retikulumu i u izvanstaničnim prostorima, a imaju velik afinitet prema H_2O_2 kojeg reduciraju do vode uz pomoć različitih supstrata koji im služe kao donori elektrona (Pellinen, 2001, Gill i Tuteja, 2010). Biljne peroksidaze su glikoproteini koji sadrže hem u strukturi i obično su prema izoelektričnim točkama klasificirani kao kiseli, neutralni ili bazični (Yoshida i sur., 2002). Enzim GPOD pripada oksidoreduktazama, te osim što brani biljnu stanicu od oksidacijskog stresa razgradnjom H_2O_2 , ima ulogu i u sintezi lignina, razgradnji indol-3-octene kiseline (auksin), oksidacijskoj reakciji fenolnih esterskih spojeva vezanih na polisaharide stanične stijenke, formiranju mostova izoditirozina za koje se pretpostavlja da povezuju strukturne proteine, zatim sudjeluje u zacjeljivanju rana, obrani od patogena te suberinizaciji (Hiraga i sur., 2001, Tenhaken, 2015) pri čemu koristi H_2O_2 i fenole (gvajakol ili pirogalol) kao donore elektrona. Enzim GPOD pripada peroksidazama razreda III (Mathé i sur., 2010), a njihova karakteristika je da imaju velik broj izoformi pri čemu su broj i količina pojedine izoforme posljedica različite ekspresije. Pod utjecajem visokih temperatura (Ali i sur., 2005), soli (Jovičić i sur., 2017), teških metala (Farid i sur., 2017, Saidi i sur., 2017) i drugih stresova potvrđene su promjene u aktivnosti enzima GPOD jer se u stresnim uvjetima u odnosu na druge antioksidacijske enzime prvo mijenja aktivnost peroksidaza (Devi i sur., 2012).

Pored utjecaja na membranski sustav, stresni čimbenici također utječu i na disanje biljaka, usvajanje hranjivih tvari, sintezu proteina, proces fotosinteze, relativni sadržaj vode u listu i brojne druge procese. Pomoću relativnog sadržaja vode (engl. *relative water content* – RWC) u listu biljaka određuje se sadržaj vode u biljnim tkivima u odnosu na stanje potpune saturiranosti tkiva vodom. Nadalje, RWC se prema González i González-Vilar (2001) smatra indikatorom ravnoteže vode u biljci jer izražava apsolutnu količinu vode koju biljka treba kako bi postigla zasićenost tkiva. Istraživači pomoću RWC-a dobivaju uvid u sadržaj vode u biljci u postotcima koji pokazuju gubitak vode iz lista biljke u stresnim uvjetima izazvanim sušom i visokim temperaturama pa RWC ujedno služi i kao indikator stresa (Mullan i Pietragalla, 2012, Sade i sur., 2015). S druge strane, izravno je povezan s fotosintetskim kapacitetom biljke (Meher i sur., 2018). U sušnim uvjetima smanjenje RWC-a dokazano je kod suncokreta (Gunes i sur., 2008, Andrade i sur., 2017), ječma (Antunović Dunić i sur., 2015), soje (Chowdhury i sur., 2017), uljane repice (Akram i sur., 2018), kukuruza (Shan i Wang, 2017), pšenice (Weldearegay i sur., 2012), krumpira (Shu-han i sur., 2018), lucerne (Zhang i sur., 2018) i drugih kultura.

U zadnje vrijeme antropogene klimatske promjene su u stalnom porastu, a same promjene u konačnici su od presudnog značaja kako za proizvodnju hrane tako i za razvoj industrije (Dlugolecki, 2008). Prema Vukadinoviću i sur. (2014) abiotski stresovi imaju najznačajniji utjecaj na proizvodnju hrane jer biljke u koliko su bile duži period izložene nekom obliku stresa uobičajeno ostvaruju niži urod. Krajnji rezultati u proizvodnji suncokreta, a i drugih kultura usko su povezani s količinom, distribucijom i intenzitetom oborina, pojavom

sušnih perioda tijekom uzgoja, visokim dnevnim maksimalnim temperaturama te fluktuacijom okolišnih parametara u kratkim vremenskim razdobljima (dnevnim ili tjednim) (Mijić i sur., 2017).

Kako bi se smanjio negativni utjecaj abiotičkih čimbenika na proizvodnju hrane, posebice u siromašnim zemljama, nužno je provoditi odgovarajuće poljoprivredne mjere kojima bi se posljedice ublažile (Iqbal i sur., 2017). Primjerice, primjena pravovaljane i pravovremene agrotehnike osigurava očuvanje zimske vlage tla i prodiranje korijena u dublje slojeve radi bolje opskrbe vlagom čime se posredno smanjuju utjecaji toplinskog i svjetlosnog stresa te stresa izazvanog sušom. Negativne posljedice djelovanja visokih temperatura i svjetlosti na kulture mogu se umanjiti i primjenom adekvatne gnojidbe, posebice s dušikom, te pravodobnim navodnjavanjem. Također, Deryng i sur. (2014) naglašavaju važnost odabira odgovarajućeg genotipa, te kao dodatnu mjeru prilagodbe na stresne uvjete predlažu promjenu datuma sjetve i primjenu navodnjavanja za rashlađivanje uzgojnih površina. Dakle, globalno zagrijavanje praćeno promjenama lokalnih vremenskih prilika i povećanjem učestalosti ekstremnih događaja, predstavlja veliki izazov oplemenjivačima bilja za stvaranjem biljaka s većim potencijalom uroda (Semenov i sur., 2014). Za razumijevanje reakcija biljaka na abiotički stres potreban je multidisciplinarni pristup, a zatim i primjena znanja kako bi umanjili negativan utjecaj klimatskih promjena na biljke (Martre i sur., 2015).

1.2.1. Toplinski stres

Biljke kao sesilni organizmi primorani su biti izloženi čestim promjenama temperature. Visoke temperature mogu dovesti do nastanka toplinskog stresa biljaka, pri čemu je bitno znati da je toplina kvantitativna mjera, a temperatura kvalitativna mjera toplinske energije (Vukadinović i sur., 2014). Do toplinskog stresa dolazi i kada temperature u pojedinim fazama rasta i razvoja izađu iz optimalnih vrijednosti. Toplinski stres se prema Singh (2000) dijeli na stres uzrokovan visokim temperaturama, niskim temperaturama (temperature iznad točke smrzavanja, tzv. *chilling stress*; $> 0^{\circ}\text{C}$) i stres uzrokovan smrzavanjem (temperature ispod točke smrzavanja, tzv. *freezing stress*; $< 0^{\circ}\text{C}$).

Biljni svijet je odgovoran za provođenje procesa fotosinteze u kojem vrlo bitnu ulogu ima Sunčevo zračenje kojeg čini 53 % topline u obliku infracrvenog zračenja, 45 % fotosintetski aktivne radijacije i 2 % ultraljubičastog zračenja. Poznato je da toplinski stres uzrokovan visokim temperaturama smanjuje intenzitet fotosinteze, dok niske temperature više utječu na sami rast i razvoj biljke (Vukadinović i sur., 2014). Fotosintetiziranje biljaka može se odvijati pri temperaturama od 0°C do 50°C pri čemu se stopa fotosinteze povećava s povišenjem temperature okoline do optimalnih vrijednosti koje se za brojne vrste kreću u rasponu između 20°C i 30°C .

Temperatura biljke, odnosno temperatura lisne površine uvelike ovisi o temperaturi zraka i tla kao i o Sunčevom zračenju te strujanju zraka (Akter i Islam, 2017). Međutim, temperatura lista nikad nije potpuno jednaka temperaturi okoline (van Berkum, 2008). Tijekom sunčanog ljetnog dana u uvjetima deficita vode temperatura lista može biti 4–5°C viša od ambijentalne temperature (Pevalek-Kozlina, 2003). Lisna površina je dobro prilagođena za apsorpciju fotosintetske aktivne radijacije i sposobna je brzo te s lakoćom izgubiti suvišak toplinske energije prilikom temperaturnih promjena fotosintetskog aparata u koliko ima osiguranu dostupnu vodu (Vukadinović i sur., 2014). Toplinski stres kod biljaka uzrokuje nepovoljna razina transpiracije pri nedovoljnoj količini dostupne vode u tlu te neadekvatna regulacija u ekspanziji lista. Sami sadržaj biljkama dostupne vode, također ovisi o ambijentalnoj temperaturi koja, ako je visoka, izaziva dehidraciju biljnog tkiva. Atkinson i Urwin (2012) smatraju temperaturu od 31°C u fazi cvatnje graničnom temperaturom pri kojoj se sadržaj vode u biljkama može očuvati.

Sposobnost biljaka za aklimatizaciju na različite okoline izravno je ili neizravno povezana s njihovom sposobnošću prilagodbe procesa fotosinteze, što za uzvrat utječe na biokemijske i fiziološke procese, a time i na rast i urod cijele biljke (Chandra, 2003). Većina biljaka pokazuje značajnu sposobnost prilagodbe procesa fotosinteze na promjene temperature tijekom rasta biljaka. Najčešći slučaj je pomak optimalne temperature fotosinteze koji može povećati fotosintetsku brzinu s obzirom na rast temperature (Anjum i sur., 2011), odnosno fotosinteza ograničava rast biljaka pri visokim temperaturama, a razina fotosinteze se smanjuje na visokim temperaturama (Gent i Seginer, 2012).

Obrana biljaka od utjecaja visokih temperatura može biti dugoročna i sastoji se od fenoloških i morfoloških adaptacija na date uvjete i kratkoročna preko koje izbjegavaju ili aklimatiziraju mehanizme obrane u koje se ubrajaju promjene orijentacije lista, transpiracija ili mijenjanje kompozicije lipidne membrane (Wahid i sur., 2007). Stoga, jedna od vrlo bitnih uloga lista je da u povoljnim uvjetima vrši transpiraciju i tako provodi hlađenje lisne površine. Kako bi hlađenje bilo što učinkovitije potrebna je dovoljna količina raspoložive vode u tlu. Dakle, gubitak toplinske energije putem transpiracije je vrlo važna komponenta u energetske bilanci lišća, ali s druge strane do snižene transpiracije lista osim zbog visokih temperatura može doći uslijed nedostatka dostupne vode, odnosno suše.

Reakcije biljaka, odnosno odgovor njihovog metabolizma na toplinski stres uvelike ovisi o opsegu i trajanju nepovoljnih temperatura te samoj fazi razvoja biljke (Ruelland i Zachowski, 2010). Toplinski stres negativno utječe na klijavost i nicanje usjeva, brzinu rasta, visinu biljke, težinu svježeg lista i suhe tvari, indeks lisne površine, senescenciju listova, vijabilnost peluda, sadržaj ulja i bjelančevina (Ugarte i sur., 2007, Asseng i sur., 2011, Iqbal i sur., 2017). Dugotrajni toplinski stres dovodi do skraćivanja trajanja razvojnih faza biljke pri čemu se formiraju sitniji organi u odnosu na uzgoj biljaka u optimalnim temperaturama (Amutha i sur., 2007, Iqbal i sur., 2017, Akter i Islam, 2017). Efekt navedenih djelovanja varira ovisno o vrsti usjeva, genotipu i fenološkim fazama rasta i razvoja (Akter i Islam, 2017). Krajnja posljedica djelovanja toplinskog stresa, odnosno

njegovog nepovoljnog vremenskog rasporeda tijekom rasta i razvoja biljke je negativan utjecaj na urod zrna (Vukadinović i sur., 2014, Akter i Islam, 2017), a samim time i na ekonomsku učinkovitost proizvodnje.

Na temperaturama oko 50°C nastaje koagulacija bjelančevina što dovodi do smrti biljaka. Međutim, vrlo često i pri nižim temperaturama, 35°C do 40°C, može doći do smrti biljaka zbog poremećaja nastalih u fiziološkim i biokemijski procesima (Sorić, 1983). Uslijed djelovanja visokih temperatura protoplazma biljaka se mijenja, postaje zrnate strukture lipidnog karaktera, a nekad umjesto povećanja njezine viskoznosti prelazi u tekuću konzistenciju te joj raste propustljivost za elektrolite i neelektrolite (Sorić, 1983, Vukadinović i sur., 2014). Također, toplinski stres utječe na djelovanje enzima od kojih se ističu peroksidaze čije aktivnosti značajno rastu. Nadalje, toplinski stres izaziva i promjene u akumulaciji proteina (Qu i sur., 2013), te uzrokuje poremećaj u asimilacijskom transportu elektrona (Vukadinović i sur., 2014).

Uz navedeno, dugotrajni toplinski stres djeluje inhibitorno na akumulaciju klorofila i karotenoida te izaziva promjene u fluorescenciji klorofila *a* i fotosintezi (Dash i Mohanty, 2001, Kreslavski i sur., 2009). Do smanjenja fotosinteze ne dolazi samo zbog promjena u protoku energije kroz fotosustav II, koji je izuzetno osjetljiv na povišenu temperaturu, nego i zbog smanjenog sadržaja pigmenata u listu biljke (Viljevac i sur., 2013). Glavno mjesto oštećenja fotosustava II uslijed povišene temperature je kompleks koji katalizira oksidaciju vode (engl. *oxygen evolving center* – OEC) (Allakhverdiev i sur., 2008).

Suncokret, čija godišnja suma potrebnih temperatura za optimalan razvoj iznosi 2000 – 3000°C (Gadžo i sur., 2011), odlikuje sposobnost djelomične adaptabilnosti na visoke temperature i sušu, a to mu omogućava duboki i snažan korijen preko kojeg crpi vodu iz dubljih slojeva tla (Hussain i sur., 2013), a prema García-López i sur. (2014) smatra se poljoprivrednom kulturom umjereno tolerantnom na sušu i toplinski stres. Ipak, pojava suše i ekstremno visokih temperatura, pogotovo u ranim fazama razvoja dok se biljka u potpunosti nije vegetativno razvila, može uzrokovati stres i imati značajan utjecaj na proizvodnju (Hall, 2001, Hussain i sur., 2018) kod većine usjeva (Debaeke i sur., 2017) pa tako i kod poljoprivrednih kultura koje posjeduju umjerenu toleranciju na sušu, poput suncokreta (Pekcan i sur., 2015, Robert i sur., 2016).

Suncokret je na toplinski stres najosjetljiviji od faze ranog cvjetanja do faze nalijevanja zrna, a od fizioloških procesa, negativnom utjecaju toplinskog stresa su najpodložniji razvoj peluda (Anjum i sur., 2008) i fotosinteza (Greer, 2015). U selekciji genotipova suncokreta tolerantnih na visoke temperature vrlo je bitan odabir genotipova s dubokim i snažnim korijenom te odabir genotipova tolerantnih na intenzivnu transpiraciju. Nadalje, oplemenjivači u okolini za koju su karakteristične visoke temperature u fazi cvatnje, trebali bi poticati odabir genotipova sposobnih za stvaranje velike količine peluda s odgovarajućom vijabilnosti. Također, bitno je da reproduktivni organi budu otporni na visoke temperature zbog uspješnog oprašivanja i formiranja zrna, odnosno kako bi se

umanjio negativan utjecaj stresnih uvjeta uzgoja na brzinu sinteze ulja, a samim time i na urod ulja (Škorić, 2012).

Na globalnoj razini, suša i visoke temperature smatraju se jednim od ozbiljnijih abiotskih uzročnika stresa. U posljednjih nekoliko godina zabilježen je porast srednjih godišnjih temperatura zraka na razini cijelog svijeta, a pretpostavka je kako će ona do kraja 21. stoljeća narasti za 1 – 6°C (IPCC, 2001, De Costa, 2011). Uzrok toga je povećanje atmosferskog CO₂ koji nastaje zbog izgaranja fosilnih goriva, emisije stakleničkih plinova, industrijske proizvodnje te deforestacije koji su prijetnja Zemlji već nekoliko stoljeća (Wewerinke i Yu III, 2010). Od sredine 18. stoljeća koncentracija CO₂ se povećala za oko 30 % (IPCC, 2001). Povišenjem temperature za svakih 1°C procjenjuje se pad uroda za 1 % (Vukadinović i sur., 2014). Jaggard i sur. (2010) su iznijeli činjenicu da će se u budućnosti povisiti koncentracija CO₂ koja će izazvati povećanje uroda C3 usjeva za oko 13 % te da će ujedno doći i do povećanja koncentracije ozona (O₃) koji će smanjiti urod za 5 % ili više. Nadalje, zbog obogaćivanja zraka s CO₂ puči u listovima biljaka neće morati biti često otvorene što će se direktno odraziti na korištenje dostupne vode u biljci, odnosno doći će do smanjenja potrošnje vode, ali će istovremeno doći i do povećanje evaporacije zbog pojave visokih temperatura. Slijedom toga, oplemenjivanje biljaka pomoći će u stvaranju novih genotipova boljih agronomskih svojstava povećanjem njihovih potencijalnih vrijednosti ili stvaranjem tolerantnosti na visoke temperature, suvišak svjetlosti, manjak vode, uzročnike bolesti, napad insekata te druge negativne utjecaje na biljku.

1.2.2. Svjetlosni stres

Suncokret je biljka koja voli Sunce te zahtjeva veliku količinu topline. S pravilnim sklopom, odnosno odgovarajućom gustoćom sjetve i rasporedom biljaka može se biljkama osigurati dovoljna količina svjetlosti tijekom rasta i razvoja (Gagro, 1998, Gadžo i sur., 2011). Uz količinu potrebnog svjetla vrlo je bitna i njegova kvaliteta. S obzirom na to da je suncokret biljka kratkog dana, ako dođe do skraćivanja dnevnog svjetla biljke razvijaju manji broj listova, skraćuju stabljiku te ujedno ranije ulaze u fazu cvatnje. Ako se dan produži, biljke razvijaju veći broj listova i kasnije cvatu. Međutim, prilikom nedostatka odgovarajućeg intenziteta Sunčeve svjetlosti izdanci etioliraju, formiraju sitnije glave i plodove što u konačnici smanjuje urod zrna i stvara se niži sadržaj ulja u zrnu (Vratarić i sur., 2004, Gadžo i sur., 2011). Sve te navedene promjene u biljkama ukazuju na to kako su biljke u prirodi izložene i svjetlosnom stresu jer su intenzitet i spektar svjetlosti podložni promjenama. Najčešći uzroci koji izazivaju promjene u intenzitetu svjetlosti dostupnom biljkama su fluktuacije vremenskih prilika koje uključuju pokrete oblaka i utjecaj vjetra, uz koje razvoj, pozicioniranje grana i listova te odumiranje lisne mase imaju znatan utjecaj (Alter i sur., 2012). Ujedno povećanje intenziteta svjetlosti postepeno može izazvati povećanje stope fotosinteze. Zasićenost poljoprivrednih kultura sa svjetlošću je različita unutar i između vrsta. Suncokret se razlikuje od drugih kultura jer ima vrlo visok nivo

zasićenja sa svjetlosti koji iznosi više od 150000 luksa svjetlosti (Shell i Lang, 1976). Prema tome, suncokret je biljka koja prema klasifikaciji fotosinteze pripada C3 tipu ($20 \text{ mg CO}_2 \text{ dm}^{-2}\text{h}^{-1}$), ali ga se može svrstati i u C4 tip zbog neto fotosinteze koja je jednaka ili veća od $40 \text{ mg CO}_2 \text{ dm}^{-2}\text{h}^{-1}$ što je karakteristika C4 biljaka (Blanchet i sur., 1982). Općenito, C3 biljke posjeduju veću sposobnost prilagodbe fotosinteze na široki raspon temperatura, dok su C4 biljke prilagođenije toplijem okruženju (Yamori i sur., 2014).

Sposobnost biljaka da se prilagode uvjetima svjetlosti jedan je od najvažnijih čimbenika tijekom rasta i razvoja biljaka. Adaptacija na širok spektar osvjetljenja omogućava fotosintetsku učinkovitost koja se kod većine biljaka kreće od 0,1 % do 3 %. U mnogobrojnim slučajevima biljke su izložene vrlo intenzivnoj svjetlosti koju ne mogu iskoristiti. Fotosintetski aparat pri svjetlosnom stresu ima sposobnost regulacije procesa pri različitom intenzitetu osvjetljenja. Vrlo bitnu ulogu u regulaciji fotosustava I u uvjetima visokog osvjetljenja posjeduje askorbinska kiselina koja ima fotoprotektivnu ulogu što omogućava slanje elektrona prenositeljima u fotosustav I. Višak elektrona reagira s kisikom pri čemu se stvara $^1\text{O}_2$ koji biljkama predstavlja problem. Singletni kisik oštećuje D1 protein u fotosustavu II kada dođe u doticaj s proteinskim kompleksom. Slobodni radikali nastali zbog fotooksidacije djeluju na stvaranje H_2O_2 i $\text{OH}\cdot$ te inhibiraju elektrotransport u fotosustavu II (Vukadinović i sur., 2014). Klorofili i nezasićene masne kiseline lipida staničnih membrana su izloženi utjecaju $^1\text{O}_2$ i O^2 za razliku od H_2O_2 koji utječe na enzime Calvinovog ciklusa koji sadrže Fe^{2+} , enzime Mn-klastera fotosustava II i proteine D1 i D2 fotosustava II (Vukadinović i sur., 2014).

Iako je svjetlost vrlo bitna za odvijanje fotosinteze kod biljaka, ona također može negativno utjecati na mehanizam fotosinteze ako je količina svjetla previsoka (Melis, 1999, Kouřil i sur., 2012). Kada je intenzitet svjetlosti viši od mogućnosti biljaka za njenim iskorištavanjem u procesu fotosinteze, dolazi do stvaranja ROS-ova i fotooksidacijskog stresa koji mogu u biljkama izazvati fotoreakciju toplinske disipacije energije (Alter i sur., 2012, Pospíšil, 2016), odnosno uzrokuju redukciju u prijenosu elektrona. Visok intenzitet svjetlosti uzrok je brojnih poremećaja u funkciji biljnog organizma. Može izazvati fotooštećenja, fotoaktivaciju, fotoinhibiciju i degradaciju fotosintetskih proteina (Vukadinović i sur., 2014). Međutim, biljke posjeduju sposobnost oporavka nakon nastanka fotoinhibicije zbog toga što je fotoinhibicija reverzibilni proces. Izuzev zaštite biljnog organizma od fotooksidacijskog stresa pomoću antioksidacijskih enzima, tu je i zaštita putem fotoprotekcijskih pigmenata. Najznačajniji protektivni pigmenti u uvjetima utjecaja suviška svjetlosti su karotenoidi. Karotenoidi su smješteni u kloroplastima u blizini klorofila, a apsorbiraju plavi dio fotosintetske aktivne radijacije koje klorofil ne apsorbira i translociraju pobuđene elektrone do fotokemijskih reakcijskih središta. Karotenoidi imaju vrlo bitnu ulogu u uvjetima suviška svjetlosti jer sudjeluju u gašenju $^1\text{O}_2$ preko lanaca izoprena s konjugiranim dvostrukim vezama pomoću kojih vrši prijam energije iz pobuđenih molekula i disipaciju viška energije kao topline. Nadalje, H_2O_2 stvara intracelularni signal iz kloroplasta u citosol koji ima funkciju obrane, ali sudjeluje i u prilagodbi biljaka na suvišak svjetlosti (Vukadinović i sur., 2014).

1.2.3. Utjecaj temperature i svjetla na morfologiju suncokreta

Biljnu proizvodnju uvelike određuje klima i vremenske prilike, a uz njih vrlo bitan ograničavajući čimbenik u proizvodnji suncokreta je ne poštivanje pravilnih agrotehničkih mjera proizvodnje (Milošević i Kobiljski, 2011, Miklič i sur., 2012). Biljke različito reagiraju na promjene temperatura, količinu i distribuciju oborina, duljinu dnevnog svjetla, kakvoću i intenzitet svjetlosti te količinu vode u zraku i tlu (Gagro, 1998, Vukadinović i sur., 2014). Suncokret je mezofilna biljka koja svojom specifičnom strukturom organa za razliku od drugih kultura bolje podnosi brojne abiotičke stresove i može se uspješno uzgajati u stresnim, odnosno polusušnim uvjetima (Poormohammad Kiani i sur., 2007a, Škorić, 2009, Claverie i sur., 2012), iako je u tim uvjetima smanjena njegova produktivnost (Sarazin i sur., 2017), ali u manjoj mjeri nego kod drugih osjetljivijih kultura.

Morfologija biljaka te dužina trajanja pojedinih razvojnih faza dobar su pokazatelj utjecaja promjene klimatskih i vremenskih prilika. Morfološke promjene nastale kao rezultat kumulativnog utjecaja stresa posljedica su molekularnih i fizioloških promjena, odnosno promjena metaboličkih procesa koje se temelje na promijeni ekspresije gena (Rasheed, 2009). Nadalje, morfološka svojstva kultiviranog suncokreta uvelike ovise o genotipu, agrotehnici i okolišu u kojem se uzgajaju. Korijenski sustav suncokreta je vretenast, razgranat i prodire duboko u tlo. Većim dijelom se razvija u oraničnom sloju do dubine 40 cm i može rasti do dubine tri metra, a svoju maksimalnu dubinu doseže u fazi nalijevanja zrna (Vratarić i sur., 2004, Gadžo i sur., 2011). Jedan je od ključnih morfoloških karakteristika na koje oplemenjivači obraćaju pažnju prilikom selekcije genotipova jer o njemu direktno ovisi stabilnost biljke, odnosno mogućnost polijeganja ovisno o lokalitetu uzgoja. Nadalje, stabljika suncokreta je okrugla i ispunjena parenhimskim stanicama, tanka je i nježna, a starenjem postaje drvenasta. Grananje i visina stabljike ovise o genotipu suncokreta koji može narasti do četiri metra (Vratarić i sur., 2004, Gadžo i sur., 2011). Na stabljici suncokreta prvi listovi su nasuprotni, dok se ostali razvijaju spiralno. Ukupna lisna površina je genetički uvjetovana i određena veličinom te brojem listova, a o njezinoj dostupnosti ovisi proces fotosinteze. Lisna površina ovisi o obliku i veličini listova, njihovoj pozicioniranosti na stabljici biljke, genotipu i fazi razvoja biljke te svoj vrhunac doseže u cvatnji. Donji i vršni listovi na stabljici suncokreta su užji, sitniji i zašiljeniji što je suprotno od listova na središnjem dijelu stabljike koji su manje zašiljeni, krupniji i ovalniji. Broj listova po biljci zavisi o genotipu, tipu suncokreta, tehnologiji proizvodnje itd. (Gadžo i sur., 2011). Poslije cvatnje smanjuje se broj listova što je posljedica sazrijevanja biljke pa se listovi suše i otpadaju. Neke od funkcija listova su formiranje krupnoće i ispunjenosti zrna, uroda zrna i sadržaja ulja u sjemenu, ali na njih svi listovi nemaju jednak utjecaj (Vrebalov, 1972). Međutim, glavna funkcija listova je provedba fotosinteze čija provedba kod suncokreta ovisi o položaju listova i o njihovoj starosti. Razlika u brzini fotosinteze se stvara s obzirom na kut pozicioniranosti lista na stabljici u odnosu na horizontalnu ravninu (Škorić, 2012). Nadalje, fotosintetski proces u listovima suncokreta direktno je povezan ne samo s veličinom lisne površine, nego i s njezinom aktivnošću, trajanjem i produktivnošću lisne mase, a o njoj ovisi i brzina prijenosa nastalih hranjivih tvari u sjeme (Škorić, 2012).

Optimalne temperature tijekom rasta i razvoja suncokreta su između 20 – 25°C i vrlo su važne u periodu butonizacije, intenzivnog porasta, cvatnje, oplodnje i nalijevanju zrna. Smanjenje sinteze ulja u sjemenu izazivaju temperature niže od 15°C i više od 25°C (Gagro, 1998). Idealno bi bilo da temperature ne prelaze 30°C u navedenim fazama, a posebice u cvatnji jer utječu na vrijeme i uspješnost cvatnje što dovodi do skraćivanja trajanja cvatnje te smanjenje vijabilnosti peluda (Gadžo i sur., 2011, Vukadinović i sur., 2014) čime se smanjuje uspješnost oplodnje i nalijevanja zrna što se direktno odražava na sadržaj ulja, visinu uroda zrna i ulja izazivajući njihovo smanjenje (Gadžo i sur., 2011, Balalić i sur., 2012). Cvatnja u povoljnim agroekološkim uvjetima traje 10 dana pri čemu su optimalne temperature 20 – 25°C, a mnogobrojni autori ju, uz fazu nalijevanja zrna, smatraju kritičnom fazom razvoja suncokreta (Hewezi i sur., 2006, García-López i sur., 2014). Nadalje, ova faza izrazito je kritična ne samo zbog velikog utjecaja temperatura, nego je tada biljkama nužno osigurati i dovoljnu količinu hranjivih tvari i vode (Gadžo i sur., 2011). Manjak vlage u tlu i zraku tijekom cvatnje također remeti sposobnost peluda za oplodnju. U kombinaciji, visoke temperature i nedostatak vlage izazivaju dehidriranje biljaka, a samim tim i dehidraciju generativnih organa što uzrokuje smanjenu oplodnju ili njezino izostajanje. Svjetlost je također značajna u ovoj fazi. Ako su u fazi cvatnje peludna zrna duže od 10 sati izložena direktnim Sunčevim zrakama vijabilnost im opada te otežano vrše oplodnju biljaka (Vratarić, 2004). U takvim uvjetima središnji dio glave suncokreta u mnogobrojnim slučajevima ostaje ne oplodjen. U prvom dijelu faze formiranja sjemena, nepovoljni vremenski uvjeti smanjuju nalijevanje zrna i uzrokuju nizak postotak ulja u sjemenu dok u drugom dijelu faze formiranja sjemena uzrokuju smanjenje mase 1000 zrna (Pospišil, 2013).

1.3. Fotosinteza i fluorescencija klorofila *a*

1.3.1. Fotosinteza

Fotosinteza je biološki proces koji se uobičajeno objašnjava kao svjetlosno ovisna reakcija u kojoj se iz ugljičnog dioksida i vode sintetizira pentozna uz otpuštanje kisika (Galvagno i sur., 2013). Proces fotosinteze čine dvije grupe reakcija koje se odvijaju paralelno, a dijele se na svijetlu i tamnu fazu. Prvoj grupi pripada svjetlosna reakcija koja uključuje oksidaciju vode i otpuštanje kisika iz čega nastaju ATP (adenozin trifosfat) i NADPH (nikotinamid adenin dinukleotid fosfat). Ova reakcija se zbiva se u tilakoidima, fotosintetskim membranama kloroplasta uz pigmente, te se naziva i primarnim procesom fotosinteze u koji pripadaju neciklički i ciklički prijenos elektrona. Drugoj grupi pripada reakcija tame, odnosno Calvin-Bensonov ciklus, koji se smatra sekundarnim procesom fotosinteze, a odvija se u stromi kloroplasta neovisno o svjetlosti pri čemu ATP i NADPH služe kao izvori energije za redukciju CO₂ i sintezu šećera (Pevalek-Kozlina, 2003, Ipek i Uner, 2012). Brojne fizikalno-kemijske reakcije koje se odvijaju u procesu fotosinteze podržane su strukturom unutar kloroplasta. Kloroplasti su stanični organeli, debljine 4 – 6 μm ovalnog ili elipsoidnog oblika. Broj kloroplasta u stanici listnog parenhima je različit jer ovisi o vrsti biljke i tkiva ili njihovoj starosti (Vukadinović i sur., 2014).

Kloroplasti su obavijeni s dvije biomembrane gdje je svaka biomembrana dvosloj fosfolipidna. Unutar biomembrane nalaze se stroma i tilakoidi (lamele u obliku spljoštenih vezikula) koji su združeni u granume. Unutar membrana tilakoida nalaze se kloroplastni pigmenti, klorofili i karotenoidi, koji su ključni za apsorpciju svjetlosti o kojoj ovisi fotosinteza, prenose energiju do reakcijskih središta, utječu na stabilnost fotosintetskog aparata i rasipaju suvišnu energiju u obliku topline. Struktura klorofila je porfirinski prsten koji je građen od četiri pirolna prstena u čijem se središtu nalazi atom magnezija. Postoji više vrsta klorofila, klorofil *a*, *b*, *c*, *d* i *e*, ali samo klorofil *a* i *b* sudjeluju u procesu fotosinteze. Razlika između klorofila *a* i *b* je u tome što klorofil *a* na drugom pirolskom prstenu ima metilnu skupinu (–CH₃), a klorofil *b* na tom istom mjestu ima aldehidnu skupinu (–CHO) (Pevalek-Kozlina, 2003). Sposobnost klorofila je apsorpcija plave i crvene svjetlosti bitne za fotosintezu pri čemu klorofil *a* apsorbira svjetlost valnih duljina oko 430 i 662 nm, a klorofil *b* maksimalno apsorbira svjetlost valnih duljina oko 453 i 642 nm. U fotosintetskom prijenosu elektrona glavnu ulogu ima klorofil *a* za razliku od klorofila *b* koji vlastitu pobuđenu energiju prenosi na klorofil *a* (Vukadinović i sur., 2014).

Fotosintetskim pigmentima pripadaju i karotenoidi koji se također nalaze u sastavu fotosustava. Po kemijskom sastavu su terpeni ili derivati terpena, a po strukturi su izoprenoidi. Sintetiziraju se u biljkama, žute su ili narančaste boje, a apsorbiraju svjetlost valnih duljina između 380 i 550 nm. Glavni karotenoidi kod viših biljaka su karoteni α, β (provitamin A) i γ (likopen) te ksantofili zeaksantin, violaksantin i neoksantin, dok je β-karoten najrasprostranjeniji karotenoid u biljnom svijetu. Glavna funkcija karotenoida je

apsorpcija svjetlosne energije i njezino brzo prenošenje na klorofil (Demmig-Adams i sur., 1996), bez obzira na to što je učinkovitost prijenosa niža u odnosu na prijenos energije s klorofila na klorofil. Također, karotenoidi su uključeni u uklanjanje $^1\text{O}_2$ i drugih slobodnih radikala te gašenje tripletnog stanja klorofila tako što prilikom djelovanja intenzivne svjetlosti vežu višak kisika, odnosno singletnog kisika koji nastaje zbog velike količine energije te tako štite klorofile od nastanka fotooksidacije (Vukadinović i sur., 2014).

U tilakoidnim membranama kloroplasta prisutna su dva tipa fotosustava, odnosno kompleksa pigment-protein. Ta dva sustava djeluju zasebno, svaki od njih posjeduje svoje reakcijsko središte i pigmente, a povezani su lancem transporta elektrona (Vukadinović i sur., 2014). U reakcijskom središtu fotosustava I smještena je molekula klorofila *a* čiji je apsolutni maksimum apsorbirane svjetlosti na 700 nm, dok je u fotosustavu II na 680 nm. Fotosintetski lanac transporta elektrona sastoji se od proteinskog kompleksa fotosustava II, citokroma *b₆f*, fotosustava I i ATP sintaze. Reakcijska središta fotosustava I i ATP sintaze nalaze se u stroma tilakoidima i na rubovima grana tilakoida za razliku od reakcijskih središta fotosustava II koja se nalaze samo u grana tilakoidima. Kompleks citokrom *b₆f* nalazi se i u stroma i grana tilakoidima (Pevalek-Kozlina, 2003, Stryer i sur., 2006).

Prvi korak fotosintetskog transportnog sustava je apsorpcija fotona svjetlosti i njegov prijenos do reakcijskog središta fotosustava II gdje su smještene molekule pigmenta, odnosno klorofila u pigment-protein kompleksima kojeg tvore antena kompleksi za prikupljanje svjetlosti (engl. *light harvesting complex* – LHC) i reakcijska središta (Voet i Voet, 2004). Antena kompleksi za prikupljanje svjetlosti fotosustava I (LHCI) povezani su s fotosustavom I, a kompleksi za prikupljanje svjetlosti fotosustava II (LHCII) povezani su s fotosustavom II, te se unutar tilakoidne membrane mogu kretati iz fotosustava II u fotosustav I (Sharkey i sur., 2014). Fotosustav II u elektronskom transportu ima vrlo bitnu funkciju u redukciji plastokinona (PQ), oksidaciji vode i stvaranju transmembranskog gradijenta protona (Umena i sur., 2011). Prijenos elektrona u fotosustav II započinje ekscitacijom klorofila u reakcijsko središte P680 iz kojeg se elektroni prenose na feofitine. Feofitini primljene elektrone dalje prenose na čvrsto vezani plastokinon (Q_A), a reducirani Q_A^- prenosi elektrone na slabo vezani plastokinon (Q_B). Dalje Q_B prima dva elektrona pri čemu nastaje reducirani Q_B^{2-} koji se uz dva protona pretvara u plastohidroksinon (PQH_2). PQH_2 prenosi elektrone i otpušta protone u lumen tilakoida te čini poveznicu između fotosustava II i citokrom *b₆f* kompleksa. Plastocijanin koji se nalazi u lumenu tilakoida prima elektrone i prenosi ih na fotosustav I. Dalje elektrone prenosi reducirani feredoksin pri čemu feredoksin $NADP^+$ -reduktaza reducira $NADP^+$ u NADPH. Prijenos elektrona do NADPH povezan je s prijenosom protona iz strome u lumen tilakoida i doprinosi stvaranju gradijenta protona, a četiri se elektrona oslobođena redukcijama dviju molekula vode prenose na pobuđeni P680 koji se primitkom elektrona vraća u osnovno stanje. Protoni iz lumena tilakoida prelaze kroz gradijent protona (čijem nastanku također doprinosi citokrom *b₆f* kompleks) u stromu preko ATP-sinaze što dovodi do sinteze ATP-a nakon koje se NADPH i ATP oslobađaju u stromu.

Ciklički tok elektrona u fotosustavu I biti će omogućen u slučaju većih količina NADPH. Ovim načinom elektroni se ne prenose na feredoksin NADP⁺-reduktazu već se pomoću feredoksina prenose na citokrom *b6f* kompleks gdje nastali gradijent protona omogućava sintezu ATP-a (Pavalek-Kozlina, 2003, Lehninger, 2008).

1.3.2. Fluorescencija klorofila *a*

Krajem dvadesetog stoljeća postignut je veliki napredak u istraživanju fotosintetskih organizama pomoću modernih optičkih metoda i tehnika koje su omogućile proučavanje fotosintetskih procesa (Roháček i sur., 2008) među kojima je određivanje fluorescencije klorofila *a* jedna od najčešće korištenih metoda. Fluorescencija klorofila *a* daje uvid u status i funkciju fotosintetskog aparata, učinkovitost fotosustava II i funkciju lanca transporta elektrona (Strasser i sur., 1995) kojoj pripada 1–2 % ukupne apsorbirane energije, a vidljiva je u obliku crvene svjetlosti valne duljine ~ 650 nm (Porcar-Castell, 2008). Apsorbiranu Sunčevu svjetlost biljka kroz tri međusobno povezana načina dalje koristi za odvijanje fotosintetskih procesa, termalnu disipaciju, odnosno pretvaranje i rasipanje viška energije u obliku topline te disipaciju ekscitacijske energije u obliku fotona (svjetlosti), tj. kao fluorescenciju klorofila. Svi navedeni oblici korištenja Sunčeve energije su povezani, što znači da se promjene nastale u jednom procesu odražavaju i na ostala dva procesa (Maxwell i Johnson, 2000, Cowley i Lockett, 2011).

Prilikom mjerenja fluorescencije klorofila *a* biljno tkivo treba podvrgnuti uvjetima tame u minimalnom trajanju od 30 minuta, pri tome prestaje prijenos elektrona u fotosintetskom lancu transporta elektrona i nema oksidacije vode u fotosustavu II zbog toga što dolazi do potpune oksidacije akceptora elektrona fotosustava II. U takvim uvjetima otvaraju se sva reakcijska središta, nakon čega se tkivo izlaže visokoj količini svjetlosti od 3000 $\mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Osvjetljenje fotosintetskog uzorka s jakim intenzitetom svjetlosti omogućava uzbuđenje svih molekula pigmenta u pigment-protein kompleksu tilakoidne membrane nakon čega neposredno dolazi do brzog prijenosa elektrona. Pri osvjetljenju tkiva u jednoj sekundi dobivaju se brojne informacije o intenzitetu fluorescencije klorofila *a* koje se prikazuju na krivulji. Promjene u intenzitetu fluorescencije klorofila *a* u uvjetima tame prema literaturi nazivaju se Kautskyjevim efektom (Strauss i sur., 2006). Nadalje, poslije izlaganja tkiva svjetlosti otvaraju se sva reakcijska središta pri čemu se prvo dobiva uvid u inicijalni korak, odnosno minimalnu vrijednost fluorescencije (F_0 ili korak O) nakon 50 μs koja predstavlja emisiju pobuđenog klorofila u antena kompleksu fotosustava II prilikom potpune oksidiranosti Q_A (vezani plastokinon), odnosno trenutačni porast fluorescencije uslijed djelovanja osvjetljenja (Kalaji i Guo, 2008). Nakon F_0 , intenzitet fluorescencije uslijed kontinuiranog intenziteta svjetlosti poslije 1 sekunde naglo raste i doseže maksimalnu vrijednost fluorescencije (F_m , F_P ili korak P). Na krivulji polifaznog rasta fluorescencije klorofila *a* između F_0 i F_m nalaze se i međukoraci, korak J koji

predstavlja intenzitet fluorescencije nakon 2 ms (V_J) i korak I koji predstavlja intenzitet fluorescencije nakon 30 ms (V_I).

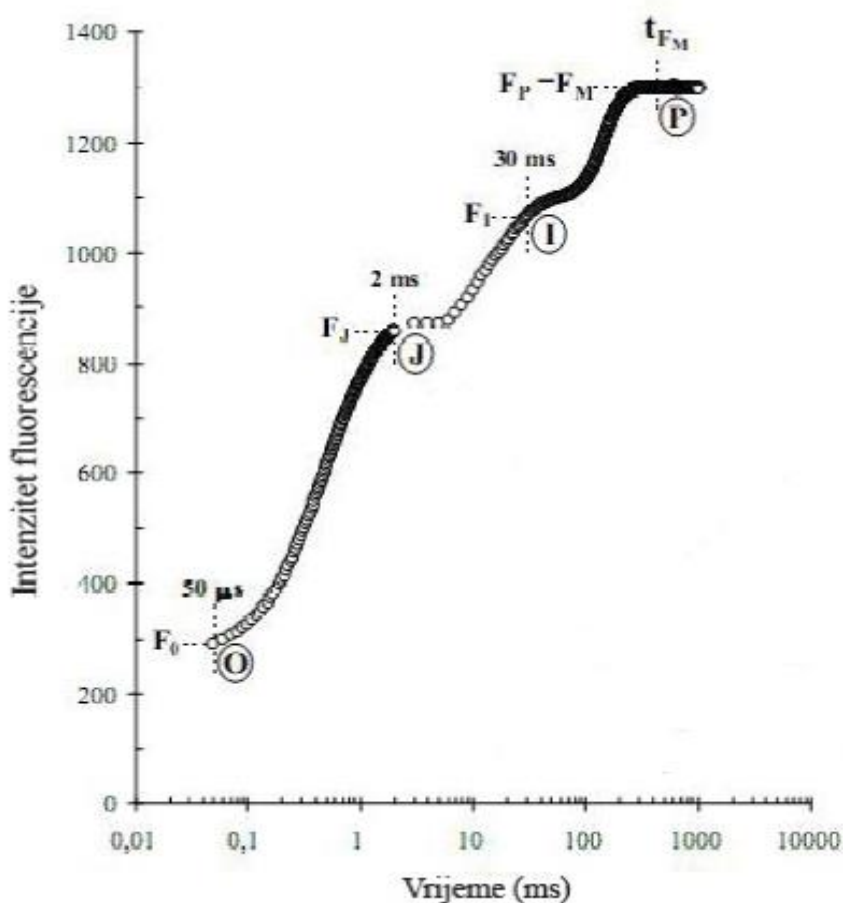
Opisani proces obilježava se kao O-J porast koji se odvija unutar 2 ms i prikazuje fotokemijsku fazu koja je rezultat redukcije primarnog akceptora Q_A . Trenutni maksimum reduciranog Q_A zabilježen je na J koraku, dok je na I koraku zabilježena daljnja redukcija Q_A i Q_B . Iza O-J porasta nastaju termalne polagane faze J-I i I-P koje predstavljaju nefotokemijsku fazu (Strauss i sur., 2006). Porast J-I karakterizira nastanak Q_B^- i Q_B^{2-} , a porast I-P zbog oksidacije ukupnog plastokinona izaziva postupno gašenje fluorescencije klorofila *a* (Strasser i sur., 2004). Slijedi zatvaranje svih reakcijskih središta fotosustava II i maksimalna akumulacija Q_A^- , Q_B^{2-} i PQH₂ (plastohidrokinon), što se postiže unutar intervala od 200 ms do 1 s i naziva se F_m ili P korak (Govindjee, 2004, Schansker i sur., 2005).

Iz gore priloženih oznaka i Slike 1 s razlogom se može zaključiti zašto se krivulja polifaznog rasta fluorescencije klorofila *a* još naziva i OJIP krivuljom. Prema Strasser i sur. (2004), uslijed djelovanja različitih uvjeta moguća je pojava i dodatnih koraka na krivulji polifaznog rasta fluorescencije klorofila *a*. Tako se prilikom djelovanja visokih temperatura na 300 μ s pojavljuje korak K (Kalaji i Loboda, 2007.). Uz gore navedene parametre, iz krivulje polifaznog rasta fluorescencije klorofila *a* dobiva se i uvid u vrijeme koje je potrebno za postizanje maksimalne fluorescencije (t_{max}) i površine iznad OJIP krivulje između F_0 i F_m (AREA) iz kojih se izračunavaju ostali parametri OJIP testa.

Najčešće korišteni parametri dobiveni izračunom iz izmjerene fluorescencije klorofila *a* su maksimalni kvantni prinos fotosustava II (F_v/F_m) i indeks fotosintetske učinkovitosti (PI_{ABS}). Parametar F_v/F_m predstavlja omjer varijabilne fluorescencije (koja se dobije kao razlika između maksimalnog (F_m) i minimalnog intenziteta (F_0) fluorescencije) i maksimalnog intenziteta fluorescencije (F_m) te smatra se osjetljivim indikatorom fotosintetske učinkovitosti biljaka, a njegova maksimalna vrijednost iznosi oko 0,85 (relativna jedinica) kod zdravih testiranih uzoraka (Kalaji i Guo, 2008.). Prilikom djelovanja nekog stresora na biljke vrijednost F_v/F_m se smanjuje. Za razliku od parametra F_v/F_m parametar PI_{ABS} smatra se indeksom vitalnosti biljke pomoću kojeg se može utvrditi utjecaj stresa na biljku i prije pojave vidljivih simptoma na biljci (Christen i sur., 2007). Indeks fotosintetske učinkovitosti pokazatelj je sveukupne učinkovitosti fotosinteze koja se mijenja pod utjecajem stresnih čimbenika (Strasser i sur., 2004).

Mjerenje fluorescencije klorofila *a* smatra se vrlo moćnim alatom za neinvazivno i nedestruktivno proučavanje fotokemijskih i nefotokemijskih procesa unutar tilakoidnih membrana kloroplasta, biljnog tkiva i cijele biljke (Roháček i sur., 2008) koji nam daje korisne informacije o fotosintetskoj učinkovitosti u uvjetima biotskog i abiotskog stresa (Brestic i Zivcak, 2013). Zbog brzine provođenja ove metode te mogućnosti skeniranja velikog broja uzoraka/biljaka u kratkom vremenu (Kalaji i Guo, 2008), mjerenje polifaznog rasta fluorescencije klorofila *a* često se koristi za određivanje utjecaja različitih stresova na terenu koji mogu utjecati na vitalnost biljke (Schreiber i sur., 1994, Roháček i

sur., 2008). Dakle, fluorescencija klorofila *a* pruža uvid u fiziološko stanje fotosintetskog aparata bilo kojeg fotosintetskog materijala, a brojni znanstvenici su ju koristili u istraživanjima utjecaja različitih stresora poput intenziteta svjetla (Mlinarić i sur., 2016), temperature (Brestic i sur., 2013), količine dostupne vode (Kovačević i sur., 2017), teških metala (Josipović i sur., 2014) i brojnih drugih čimbenika stresa na različitim biljnim vrstama od kojih neke pripadaju ratarskim kulturama poput suncokreta (Markulj i sur., 2016), soje (Josipović i sur., 2014), kukuruza (Franić i sur., 2015), pšenice (Brestic i sur., 2012), ječma (Kovačević i sur., 2015), uljane repice (Cowley i Luckett, 2011), dok su neke voćarske kulture: višnja (Viljevac i sur., 2013), jabuka (Greer, 2015), smokva (Mlinarić i sur., 2016). Uz navedene kulture, pomoću metode fluorescencije klorofila *a* istražene su i brojne druge ratarske, voćarske i povrtne kulture.



Slika 1. Tipični OJIP porast fluorescencije prema Strasseru i sur. (2004) prikazan na logaritamskoj vremenskoj skali.

1.4. Agronomska svojstva suncokreta

Prema Škoriću (2012) komponente koje izravno djeluju na urod zrna su: broj biljka po jedinici površine (optimalan broj 55 – 75000/ha), broj sjemenki po biljci (1500 – 2000), masa 1000 zrna (za uljni tip do 80 g, a konzumni 120 – 150 g), hektolitarska masa (za uljni tip 50 – 55 kg/hl, a konzumni 90 kg/hl), mali postotak ljuske (za uljni tip < 25 %, a za konzumni < 35 %) te sadržaj ulja u sjemenu (za uljni tip 50 – 55 %, a za konzumni < 35 %). Također, visina biljke i promjer glave pripadaju komponentama uroda te su vrlo važni kriteriji prilikom selekcije genotipova. Visina kultiviranog suncokreta obično se kreće između 150 – 200 cm (Hladni i sur., 2014), dok se optimalnom visinom biljke smatra ona između 150 – 170 cm (Marinković i sur., 2011). Kod komercijalnih genotipova variranja u visini biljke su od 50 do 500 cm (Vratarić, 2004). Osim na optimalnu visinu biljke, velika pažnja pridodaje se i promjeru glava biljaka suncokreta. Prema Balalić i sur. (2016) promjer glave bi trebao biti 20 – 25 cm sa čvrstom epidermom s donje strane glave.

Glavna intencija za oplemenjivače suncokreta diljem svijeta je postići urod ulja za uljane genotipove iznad 3 t/ha, a za konzumne urod zrna iznad 4 t/ha za što je potrebno minimalno oko tri do četiri ciklusa oplemenjivanja (Škorić, 2012). Također, oplemenjivači suncokreta prilikom kreiranja novih genotipova bi se trebali, uz postizanje visokih uroda zrna i ulja (Kaya i Kolsarici, 2011), usmjeriti na stvaranje genotipova s povoljnim karakteristikama glave (Mijić i sur., 2005), te genotipova s boljom adaptabilnosti i stabilnosti u različitim područjima uzgoja (Kaya i sur., 2012).

1.4.1. Urod zrna

Urod zrna po jedinici površine kao kompleksno svojstvo s poligenetičkom osnovom rezultat je utjecaja velikog broja svojstava koji mogu djelovati pojedinačno i zajednički (Dušanić i sur., 2004). Urod suncokreta možemo promatrati i kao produkt utjecaja genotipa, okoline i njihove interakcije (Balalić i sur., 2012, Škorić, 2012, Hussain i sur., 2018). Zbog njegove kompleksnosti, važno je utvrditi one komponente koje su povezane s urodom, a morfološki se u pojedinim fazama ontogeneze lako mogu procijeniti. Upravo odabir ciljanih komponenti na neizravan način mogao bi utjecati na odabir genotipova s poželjnim urodom ulja po jedinici površine (Škorić, 2012).

Visoke temperature, odnosno toplinski stres izaziva odstupanja u trajanju pojedinih faza rasta i razvoja biljaka što u velikoj mjeri utječe na veličinu i broj formiranog zrna (Akter i Islam, 2017). Također, stres izazvan sušom utječe na produktivnost suncokreta, značajno smanjuje urod zrna, urod ulja i kvalitetu ulja suncokreta (Soleimanzadeh i sur., 2010), a njegov utjecaj ovisi o fazi razvoja biljke (Hussain i sur., 2018). Abiotski stresovi kod većine usjeva uzrokuju smanjenje uroda za oko 50 % (Swindell i sur., 2007). Prema Krizmaniću i sur. (2012b) na urod zrna značajan utjecaj ima sadržaj ulja u zrnu što se odražava i na urod ulja. Sadržaj ulja kvantitativno je svojstvo, čija je varijabilnost također

pod utjecajem genetskih, ali i okolišnih čimbenika (Mijić i sur., 2008, Balalić i sur., 2012) kao i urod ulja (Leon i sur., 2003, Škorić, 2012) koji je produkt sadržaja ulja i uroda zrna. Šimić i sur. (2008a) su s višegodišnjim istraživanjima utvrdili velika variranja u urodu zrna te sadržaju i urodu ulja s obzirom na vremenske prilike, a to su potvrdili i Milošević i sur. (2015). Prema istraživanju uroda zrna suncokreta u mikropokusima s obzirom na različite vremenske prilike tijekom tri godine provođenja pokusa, Liović i sur. (2017), iznijeli su kako je hibrid Matej u trogodišnjem prosjeku (2013. – 2015. godine) imao urod zrna 6,95 t/ha dok su ostali testirani hibridi imali urod zrna između 5,27 – 6,70 t/ha. Značajni utjecaj stresa suše na urod zrna i komponente uroda genotipova suncokreta potvrdili su i Tabatabaei i sur. (2012) te Ibrahim i sur. (2016).

Zbog sve prisutnije pojave stresa tijekom uzgojnog razdoblja biljaka, razvoj novih sorti i hibrida s boljim urodom u nepovoljnim uvjetima je neophodan kako bi se zadovoljila sve veća potreba za hranom. Međutim, povećavanje tolerancije na abiotički stres se pokazao kao kompleksan zadatak (Pérez-Torres i sur., 2009).

2. CILJEVI I HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA

2.1. Ciljevi istraživanja

Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi razlike u vrijednostima fotosintetske učinkovitosti i biokemijskim parametrima stresa između istraživanih hibrida suncokreta u fazi cvatnje, što bi trebalo poslužiti kao indikator prilikom utvrđivanja tolerantnosti i rodnosti hibrida u stresnim uvjetima uzgoja uzrokovanim visokim temperaturama i suviškom svjetlosti.

Također cilj je bio istražiti razlike u mehanizmima regulacije učinkovitosti fotosustava II između dva odabrana hibrida različitih fizioloških i biokemijskih karakteristika u uvjetima okolišnog stresa uzrokovano povišenom temperaturom i suviškom svjetlosti.

2.2. Hipoteze

Na temelju različitog genetskog porijekla, istraživani hibridi (osam hibrida) trebali bi pokazati značajne razlike u fiziološkim i biokemijskim parametrima stresa kao i u urodu zrna. Dva odabrana hibrida s obzirom na različito grupiranje u skladu s njihovim fiziološkim i biokemijskim karakteristikama pokazat će različitu reakciju na uvjete okolišnog stresa uzrokovano povišenom temperaturom i suviškom svjetlosti, što bi trebalo imati uporište u različitoj regulaciji fotokemijskih procesa u fotosintezi, posebno u učinkovitosti fotosustava II. Također, pretpostavlja se kako je veća fotokemijska učinkovitost fotosustava II u hibridu tolerantnijem na stres uzrokovana različitom akumulacijom glavnih fotokemijskih proteina koji reguliraju protok elektrona u lancu transporta elektrona.

3. MATERIJALI I METODE RADA

3.1. Biljni materijali

Za sjetvu pokusa odabrano je osam hibrida suncokreta (Tablica 1). Šest hibrida potječe s Poljoprivrednog instituta Osijek (PIO), a preostala dva su u vlasništvu drugih oplemenjivačkih kuća (Syngenta i KWS). Svi hibridi Poljoprivrednog instituta Osijek su eksperimentalni hibridi. Hibridi drugih oplemenjivačkih kuća, NK Kondi i Barolo RM korišteni su kao standardi za usporedbu s hibridima PIO-a na istraživanja svojstava. Navedena dva priznata hibrida suncokreta (NK Kondi i Barolo RM) odabrana su za ovo istraživanje zbog činjenice da su prisutni i zastupljeni u proizvodnji na inozemnom i našem tržištu unazad nekoliko godina te su prihvaćeni od strane proizvođača koji su zadovoljni njihovom kvalitetom i urodom zrna.

Tablica 1. Popis hibrida suncokreta korištenih za provedbu pokusa.

Oznaka hibrida	Naziv hibrida	Oplemenjivačka kuća	Godina priznavanja	Zemlja porijekla
Hibrid 1	OS-H-1	Poljoprivredni institut Osijek	Eksperimentalni hibrid	Republika Hrvatska
Hibrid 2	NK Kondi	Syngenta	2010.	Španjolska
Hibrid 3	OS-H-3	Poljoprivredni institut Osijek	Eksperimentalni hibrid	Republika Hrvatska
Hibrid 4	Barolo RM	KWS	2006.	-
Hibrid 5	OS-H-5	Poljoprivredni institut Osijek	Eksperimentalni hibrid	Republika Hrvatska
Hibrid 6	OS-H-6	Poljoprivredni institut Osijek	Eksperimentalni hibrid	Republika Hrvatska
Hibrid 7	OS-H-7	Poljoprivredni institut Osijek	Eksperimentalni hibrid	Republika Hrvatska
Hibrid 8	OS-H-8	Poljoprivredni institut Osijek	Eksperimentalni hibrid	Republika Hrvatska

3.2. Opis eksperimenta

3.2.1. Poljski pokus

Istraživanje je provedeno na polju Poljoprivrednog instituta Osijek (45°32' N, 18°44' E) tijekom 2013. godine na tipu tla humifluvisol plitko oglejni, nekarbonatan, praškasto glinasto ilovaste teksture, određenom prema Hidropedološkoj studiji s idejnim rješenjem navodnjavanja proizvodnih površina Poljoprivrednog instituta Osijek (Romić i sur., 2006). Prostire se na topografski najnižim formama reljefa koje karakterizira specifična dinamika podzemne i sporo procjedne površinske vode. Najveća dostupnost vode je oko 1,0 do 1,5 m od površine tla što predstavlja podzemne vode čija se razina u nepovoljnim uvjetima (višak oborina) povisi do podoraničnog sloja što dovodi do izraženog oglejavanja u podoranici. Površinski sloj je praškasto glinasto ilovaste teksture sa sadržajem gline 31 – 32 % i praha 67 %. Podpovršinski horizont (podoranica) je iste teksture za razliku od dubljih slojeva (lesa) koji su praškasto ilovastog sastava. Po kemijskim značajkama tlo je u površinskom sloju kiselo (pH u 1 MKCl-u je 5,2), dok je u dubljem sloju alkalično. Slabo je humusno, ali po vrijednostima nalazi se blizu grupi humusnih tala (2,40 – 2,88 %). Prosječna vrijednost sadržaja fosfora u tlu iznosi 11,4 mg P₂O₅/100 g što je u granicama slabe i umjerene opskrbljenosti. Sadržaj kalija prosječno iznosi 27,1 mg K₂O/100 g, te se tlo smatra bogatim do vrlo bogatim kalijem za razliku od sadržaja dušika koji je u granicama za dobru opskrbljenost tla (0,13 %) (Romić i sur., 2006).

Pokus je postavljen po shemi latinskog pravokutnika u četiri ponavljanja. Razmak između 1. i 2. te 3. i 4. ponavljanja je bio 1,5 m, dok je razmak između 2. i 3. ponavljanja bio 2 m.

3.2.2. Agrotehnika pokusa

Agrotehničke mjere su tijekom provedbe pokusa provedene standardno prema potrebama uzgoja suncokreta. Prije provedbe istraživanja izvršene su osnovna i dopunska obrada tla. Pokus je 2013. godine posijan na površini na kojoj je prethodne godine bio ugar. Oranje i osnovna gnojidba obavljene su u jesen s 300 kg/ha NPK (7:20:30) i 100 kg/ha UREA-e (46 % N). Predsjetvenom pripremom u tlo uneseno je 200 kg/ha NPK (7:20:30) i zatvorene su brazde. Neposredno pred sjetvu izvršena je sjetvosprema. Svaki hibrid je posijan s pomoću ručnih sijačica „plentera“ (dvije sjemenke po kućici) u četiri reda dužine 5 m s razmakom između redova od 70 cm i razmakom unutar reda od 23 cm. Okolo pokusa posijan je dodatni red suncokreta koji je predstavljao zaštitu pokusa. Sjetva pokusa sa sjemenom tretiranim aktivnim tvarima tiram i karboksini izvršena je 20. svibnja 2013. godine na dubinu od četiri centimetra. Tretiranje pokusne površine herbicidima napravljeno je dan poslije sjetve s aktivnim tvarima flukloridon, glifosat, alfa-metolaklor i oksifluorfen. Pokus je prorijeđen ručno u V4 fazi razvoja suncokreta (Schneider i Miller, 1981). Tijekom

vegetacije suncokreta obavljena je prihrana pokusa sa 100 kg/ha KAN-a (27 % N) s međurednom kultivacijom u fazi četiri para pravih listova – V4 (Schneider i Miller, 1981). Zaštita suncokreta od bolesti provedena je u fazi butonizacije – R2/R3 (Schneider i Miller, 1981) s fungicidom koji sadrži aktivne tvari boskalida i dimoksistrobin. Kako bi zaštitili pokus od ptica, biljke su nakon cvatnje prekrivene polietilenskim mrežama. Pokus je požet ručno 22. listopada 2013. godine, a vršen je pomoću kombajna Wintersteiger Nurserymaster Expert.

3.3. Klima i vremenski uvjeti tijekom istraživanja

3.3.1. Klima istočne Slavonije

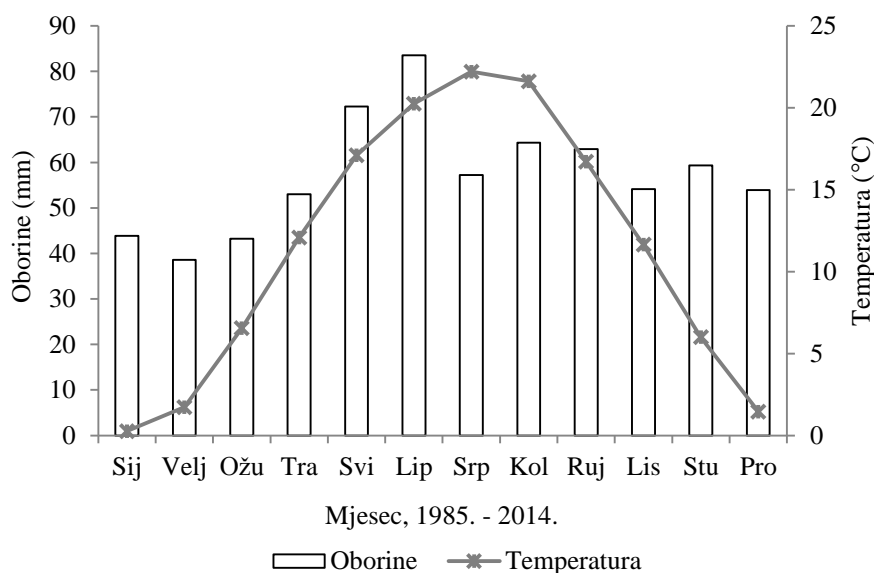
U Republici Hrvatskoj prevladavaju tri glavna klimatska područja koja karakteriziraju kontinentalna, planinska i primorska klima (Državni hidrometeorološki zavod – DHMZ, 2016). Umjereno kontinentalna klima odlikuje istočnu Hrvatsku koja pripada velikoj zemljopisnoj cjelini jugoistočne i srednje Europe. Dio je međugorske podoline i nalazi se između Karpata, Dinara i Alpa, odnosno dio je Panonske nizine koja je većim dijelom omeđena dolinama Save, Drave i Dunava (Blagojević, 2008). Umjereno kontinentalnu klimu karakterizira vrlo promjenjivo stanje atmosfere zbog cirkulacijskog pojasa umjerenih širina u kojem se nalazi. Praćena je raznolikim vremenskim situacijama uz česte i iznenadne promjene tijekom godine uzrokovane promjenama tlaka zraka. Prema Köppenovoj klasifikaciji klime istočna Hrvatska pripada umjereno toploj kišnoj klimi („Cfwbx”). Tijekom najhladnijeg mjeseca srednja mjesečna temperatura zraka kreće se između $-3\text{ }^{\circ}\text{C}$ i $18\text{ }^{\circ}\text{C}$. Najtopliji mjesec u godini ima srednju temperaturu nižu od $22\text{ }^{\circ}\text{C}$, dok više od četiri mjeseca u godini imaju srednju mjesečnu temperaturu višu od $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Zaninović i sur., 2008, Statistički ljetopis 2016). Nadalje, prema Thornthwaiteovoj klasifikaciji klime, baziranoj na odnosu potrebne količine vode za potencijalnu evapotranspiraciju i oborinske vode, u istočnoj Slavoniji prevladava subhumidna klima (Zaninović i sur., 2008).

3.3.2. Vremenske prilike za lokaciju Osijek

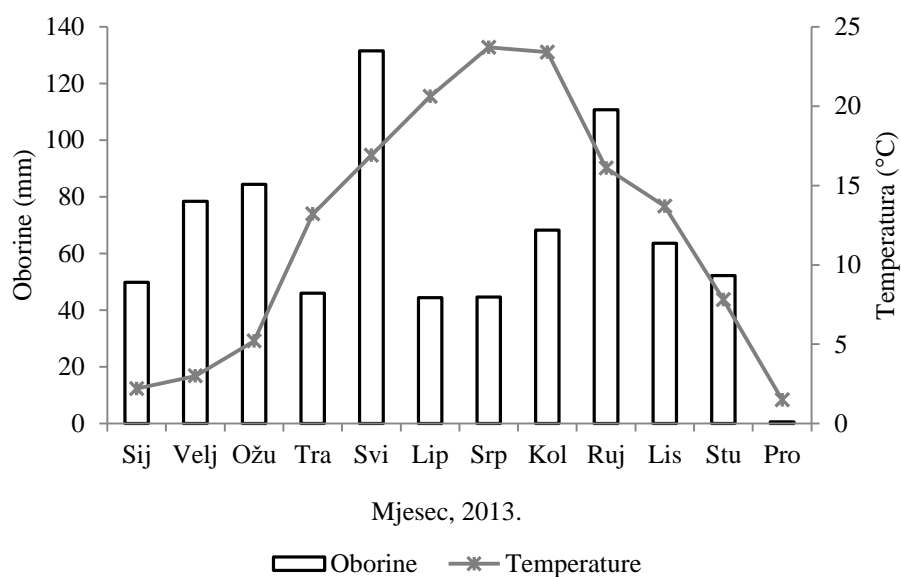
Prema višegodišnjem prosjeku (1985. – 2014.) prosječna temperatura na lokalitetu Osijeka iznosila je $11,5^{\circ}\text{C}$. Najhladniji mjesec bio je siječanj ($0,3^{\circ}\text{C}$) dok je najtopliji srpanj ($22,2^{\circ}\text{C}$). Srednja vrijednost suma oborina tijekom tridesetogodišnjeg prosjeka iznosila je $684,2\text{ mm}$. Najmanje oborina zabilježeno je u veljači ($38,6\text{ mm}$), a najviše u lipnju ($83,5\text{ mm}$) (Slika 2).

Tijekom provedbe poljskog pokusa 2013. godine (Slika 3) palo je $774,5\text{ mm}$ oborina, odnosno tijekom vegetacijskog razdoblja suncokreta $463,1\text{ mm}$. Prosječna srednja temperatura zraka iznosila je $12,3^{\circ}\text{C}$ (u vegetaciji suncokreta $19,1^{\circ}\text{C}$) što je u usporedbi s višegodišnjim prosjekom više za $0,8^{\circ}\text{C}$. Zabilježena je veća količina oborina u svibnju ($131,5\text{ mm}$) koje su prethodile početnom klijanju sjemena i samoj početnoj fazi razvoja biljaka te u rujnu ($110,7\text{ mm}$) tijekom faze nalijevanja zrna suncokreta. S obzirom na to da je vegetacijsko razdoblje suncokreta bilo neravnomjerno opskrbljeno oborinama, najveći nedostatak oborina primijetio se tijekom faze brzog porasta kada suncokret ima najveće potrebe za vodom te mu je u toj fazi potrebno oko 43 % od ukupnih potrebnih količina vode za vegetaciju (Vratarić, 2004). Naime, u toj fazi je u lipnju palo $44,4\text{ mm}$, a u srpnju

44,7 mm oborina uz srednju prosječnu temperaturu zraka 20,6°C (lipanj) i 23,7°C (srpanj). U fazi cvatnje i fazi zriobe suncokret također treba dovoljnu količinu dostupne vode i hranjiva zbog intenzivnog nakupljanja suhe tvari (nakupi oko 50 %) i optimalne temperature zraka od oko 20°C do 22°C (Vratarić i sur., 2004, Pospišil, 2013) koje su bile zadovoljene prema podacima srednje prosječne temperature zraka (Slika 3).



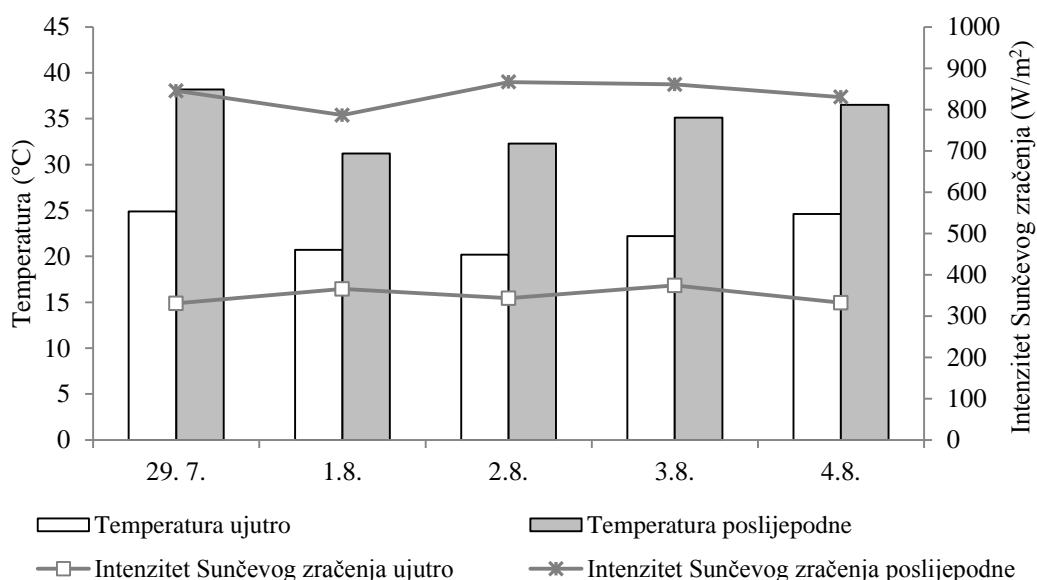
Slika 2. Walterov klimadijagram za višegodišnji prosjek (1985. – 2014.) na lokaciji Osijek (Izvor: Državni hidrometeorološki zavod).



Slika 3. Podaci o oborinama (mm) i temperaturama (°C) za 2013. godinu s mjerne postaje Osijek (Izvor: Državni hidrometeorološki zavod).

Na Slici 4 prikazane su srednje vrijednosti temperature zraka prema mjerenjima DHMZ-a (mjerenja u 7 i 14 sati) i intenzitet Sunčevog zračenja prema Pinova Meteo agrometeorološkoj stanici smještenoj u blizini pokusne površine na Poljoprivrednom institutu Osijek (mjerenja svakih 10 min prikazana kao prosjek) tijekom provedbe mjerenja fluorescencije klorofila *a* i uzorkovanja.

Iz prikazane Slike 4 primjećuje se povišenje poslijepodnevni temperatura zraka i intenziteta Sunčevog zračenja tijekom istraživanja što se i očekivalo. Dana 29. srpnja obrađen je hibrid 8; 1. kolovoza hibridi 3 i 5; 2. kolovoza hibridi 1 i 4; 3. kolovoza hibridi 2 i 6; 4. kolovoza hibrid 7. Prosječna temperatura zraka i intenziteta Sunčevog zračenja tijekom provedbe pokusa u prijedpodnevnim satima iznosila je 22,52°C, odnosno 349,06 W/m², a u poslijepodnevnim satima bila je 34,64°C, odnosno 837,84 W/m².



Slika 4. Srednje vrijednosti temperature zraka (°C) i intenziteta Sunčevog zračenja (W/m²) tijekom mjerjenja i uzorkovanja (Izvor: DHMZ i Pinova Meteo agrometeorološka stanica PIO-a).

3.4. Laboratorijske analize i određivanje fotosintetske učinkovitosti biljaka

Za laboratorijske analize i određivanje fotosintetske učinkovitosti biljaka upotrijebljeni su gornji (vršni) razvijeni listovi suncokreta. Prema Schneiteru i Milleru (1981) list se smatra razvijen ako je veći od 4 cm. Sve analize provedene su tijekom faze cvatnje (od podfaze R5.3 do podfaze R5.8 određene prema Schneiteru i Milleru, 1981) pojedinog hibrida suncokreta (kraj srpnja i početak kolovoza) na uzorcima iz srednja dva reda po hibridu. Fotosintetska učinkovitost određena je u polju na tri nasumično odabrane jedinke po hibridu u svakom ponavljanju (12 mjerenja po hibridu). Mjerenje fluorescencije klorofila *a* i uzorkovanje potrebnog materijala napravljeno je tijekom prijepodnevnih (7:30 – 9:00 h) i ranih poslijepodnevnih sati (12:30 – 14:00 h). Uzorci za laboratorijske analize sakupljeni su tako da su iz svakog ponavljanja odabrana dva gornja (najmlađa) razvijena lista suncokreta po hibridu (2 lista × 4 ponavljanja) na kojima je određena fotosintetska učinkovitost. Tijekom transporta od polja do laboratorija, listovi suncokreta su čuvani u prijenosnom hladnjaku s ledenim blokovima. Za provedbu daljnjih analiza korišten je skupni uzorak koji je napravljen iz osam listova po hibridu, osim za određivanje relativnog sadržaja vode za koji su korišteni pet nasumce odabranih listova po hibridu i ponavljanju. Biljni materijali su, za pojedine analize, pomoću tekućeg dušika smrvljeni u prah i korišteni za biokemijske analize.

3.4.1. Određivanje relativnog sadržaja vode

Neposredno nakon mjerenja fotosintetske učinkovitosti i transporta uzoraka u laboratorij izvršeno je uzorkovanje listova suncokreta za određivanje relativnog sadržaja vode u listu (engl. *relative water content* – RWC). Listovi suncokreta narezani su na male komadiće (1cm²) i neposredno nakon toga određena im je masa svježe tvari (engl. *fresh weight* – FW). Tkivo je zatim premješteno u plastične kivete s destiliranom vodom i pohranjeno u hladnjak na temperaturu od 8°C u trajanju od četiri sata. Nakon saturacije, tkivo je s pomoću pincete izvađeno iz kivete i posušeno staničevinom te izvagano pri čemu mu je određena turgidna masa (engl. *turgid weight* – TW), a potom je smješteno u sušionik (ST-01/02, Instrumentaria, Zagreb) na temperaturu od 80°C u trajanju od 24 sata da bi se odredila masa suhe tvari (engl. *dry weight* – DW). Relativni sadržaj vode određen je iz pet listova suncokreta po hibridu. Svaki uzorak izmjeren je u pet ponavljanja. RWC je izračunat prema sljedećoj formuli Poormohammad Kiani i sur. (2007b):

$$\text{RWC (\%)} = (\text{FW} - \text{DW}) / (\text{TW} - \text{DW}) \times 100$$

Opis skraćenica:

FW – masa svježe tvari u gramima

DW – masa suhe tvari u gramima

TW – turgidna masa u gramima

3.4.2. Određivanje razine lipidne peroksidacije

Oko 0,2 g smrvljenog biljnog tkiva suncokreta ekstrahirano je s 1 ml 0,1 %-tne trikloroctene kiseline (TCA) i centrifugirano (Hettich universal 320R, Njemačka) 10 min na 9000 rpm pri temperaturi 4°C. Nakon centrifugiranja u 0,5 ml supernatanta dodano je 1 ml 0,5 %-tne tiobarbiturne kiseline (TBA) u 20 %-tnoj TCA. Smjesa je zatim 30 minuta zagrijavana na 95°C (Thermomixer 5436, Eppendorf, Njemačka), nakon čega je hladena na ledu te centrifugirana na 14000 rpm u trajanju od 15 minuta pri temperaturi 4°C. Razina lipidne peroksidacije određena je spektrofotometrijskim mjerenjem (Spectrophotometer Specord 200, Analytik Jena, Njemačka) koncentracije reaktivnih supstanci tiobarbiturne kiseline (engl. *thiobarbituric acid reactive substances* – TBARS) metodom po Verma i Dubeyu (2003). Dobiveni supernatant korišten je za spektrofotometrijsko mjerenje apsorbancije na 532 i 600 nm. Za slijepu probu korištena je otopina 0,5 %-tna TBA u 20 %-tnoj TCA. Razina lipidne peroksidacije određena je na pet uzoraka po hibridu, a svaki uzorak je podijeljen u pet ponavljanja iz kojih je izračunata prosječna vrijednost za svaki uzorak posebno. Koncentracija TBARS izračunata je upotrebom ekstinkcijskog koeficijenta $155 \text{ m}^{-1} \text{ M}^{-1} \text{ cm}$ i izražena je u nmol g^{-1} svježe tvari. Formula za izračunavanje koncentracije TBARS:

$$\text{TBARS (nmol g}^{-1} \text{ sv. t.)} = [(A_{532} - A_{600} / 155) / m] \times 10^3$$

Opis skraćenica:

m – masa uzorka u gramima

A532 – apsorbancija pri valnoj duljini 532 nm

A600 – apsorbancija pri valnoj duljini 600 nm

3.4.3. Određivanje aktivnosti enzima gvajakol peroksidaze (GPOD)

3.4.3.1. Ekstrakcija topljivih proteina

U tarioniku uz pomoć tekućeg dušika i dodatka polivinil pirolidona (PVP), koji veže na sebe polifenole kako ne bi ometali mjerenje aktivnosti enzima, usitnjeni su listovi suncokreta. Oko 0,2 g usitnjenoga tkiva odvagano je u plastičnu kivetu i dodan mu je 1 ml ekstrakcijskog pufera (100 mM kalij fosfatni (K-P) pufer + 1 mM EDTA, pH 7,5). Tkivo je ekstrahirano na ledu tijekom 15 minuta uz povremeno protresanje nakon čega je homogenat centrifugiran 10 minuta na 14000 rpm pri temperaturi od 4°C. Pomoću mikropipete odvojen je supernatant u čistu kivetu, a u preostali talog dodano je još 1 ml gore navedenog pufera te je ponovljen postupak ekstrakcije. Za određivanje aktivnosti

enzima gvajakol peroksidaze korišten je sirovi ekstrakt spojenih supernatanata. Proteinski ekstrakt pripremljen je u pet uzoraka po hibridu, a svaki uzorak izmjeren je u pet ponavljanja iz kojih je izračunata prosječna vrijednost za svaki uzorak posebno.

3.4.3.2. Određivanje aktivnosti gvajakol peroksidaze

Ukupna aktivnost enzima gvajakol peroksidaze (GPOD; EC 1.11.1.7) određena je prema Siegelu i Galstonu (1967). Reakcijska smjesa (pH 5,8) sastojala se od 5 mM gvajakola, 0,2 M KH_2PO_4 , 0,2 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{H}_2\text{O}$ i 5 mM H_2O_2 koji je dodan neposredno prije mjerenja. U reakcijsku smjesu 960 μl dodano je 40 μl proteinskog ekstrakta. Porast apsorbancije je praćen pri valnoj duljini od 470 nm svake sekunde tijekom jedne minute. Ukupna aktivnost enzima izražena je kao promjena apsorbancije pri 470 nm u minuti po gramu svježe tvari. Koncentracija proteina u proteinskom ekstraktu određena je metodom prema Bradfordu (1976) i izražena je u mg g^{-1} . Specifična aktivnost gvajakol peroksidaze (GPOD) određena je kao kvocijent ukupne aktivnosti GPOD-a i koncentracije proteina, a izražena je kao promjena apsorbancije pri 470 nm $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteina. Ukupna i specifična aktivnost enzima gvajakol peroksidaze te koncentracija proteina određene su iz pet uzoraka po hibridu pri čemu je svaki uzorak podijeljen u tri ponavljanja iz kojih je izračunata prosječna vrijednost za svaki uzorak posebno. Formula za izračunavanje ukupne aktivnosti enzima GPOD:

$$\text{GPOD } (\Delta A_{470} \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ sv. t.}) = X \times Y \times V_u \times V_f / m \times V_a$$

Opis skraćenica:

X – srednja vrijednost razlika u promjeni apsorbancije u određenom vremenskom intervalu

Y – čimbenik potreban za izražavanje promjene apsorbancije po minuti (60 s)

V_u – ukupni volumen proteinskog ekstrakta (2 ml)

V_f – konačni volumen reakcijske smjese i alikvota uzorka (1 ml)

m – masa svježe tvari u gramima

V_a – volumen mjerenog alikvota proteinskog ekstrakta (40 μl)

3.4.4. Određivanje udjela suhe tvari

Vaganjem mase svježe tvari, sušenjem tijekom 24 sata u sušioniku na 105°C i ponovnim vaganjem nakon sušenja određena je suha tvar u biljnom materijalu. Tkivo za određivanje suhe tvari uzeto je iz homogenata iz kojeg su ekstrahirani pigmenti. Svaki uzorak izmjeren je u tri ponavljanja i izražen je u postocima (%).

3.4.5. Određivanje koncentracije fotosintetskih pigmenata

Oko 0,05 – 0,1 g smrvljenog biljnog tkiva ekstrahirano je uz dodatak magnezijevog hidroksid karbonata s dodatkom 1 ml hladnog acetona. Zatim su uzorci hlađeni na ledu 15 minuta uz povremeno protresanje. Nakon miješanja i centrifugiranja (10 minuta na 14000 rpm pri temperaturi od 4°C), supernatant je dekantiran u plastičnu graduiranu epruvetu sa čepom, a talog je ponovno ekstrahiran s 1 ml acetona. Postupak ekstrakcije ponovljen je šest puta, do potpunog obezbojenja tkiva u talogu. Nakon toga, izmjeren je volumen spojenih supernatanata, a ekstrakt je korišten za spektrofotometrijsko mjerenje apsorbancije pri valnim duljinama od 470, 645 i 662 nm. Za slijepu probu korišten je aceton. Koncentracija fotosintetskih pigmenata izračunata je korištenjem odgovarajućih ekstinkcijskih koeficijenata prema Lichtenthaleru (1987). Koncentracija fotosintetskih pigmenata izražena je u mg g^{-1} svježe tvari na pet uzoraka po hibridu, a svaki uzorak izmjeren je u pet ponavljanja iz kojih je izračunata prosječna vrijednost za svaki uzorak posebno.

$$\text{Chl } a \text{ (mg g}^{-1} \text{ sv. t.)} = (11,24 \times A_{662} - 2,04 \times A_{645}) \times V / m \times 10^3$$

$$\text{Chl } b \text{ (mg g}^{-1} \text{ sv. t.)} = (20,13 \times A_{645} - 4,19 \times A_{662}) \times V / m \times 10^3$$

$$\text{Chl } a+b \text{ (mg g}^{-1} \text{ sv. t.)} = (7,05 \times A_{662} + 18,09 \times A_{645}) \times V / m \times 10^3$$

$$\text{Chl } a/b = \text{Chl } a / \text{Chl } b$$

$$\text{Car (mg g}^{-1} \text{ sv. t.)} = [10^3 \times A_{470} - 1,9 (11,24 \times A_{662} - 2,04 \times A_{645}) - 63,14 (20,13 \times A_{645} - 4,19 \times A_{662})] V / 214 \times m \times 10^3$$

$$\text{Chl } a+b/\text{Car} = \text{Chl } a + b / \text{Car}$$

Opis skraćenica:

Chl *a* – koncentracija klorofila *a*

Chl *b* – koncentracija klorofila *b*

Chl *a+b* – koncentracija ukupnih klorofila *a* i *b*

Chl *a/b* – omjer klorofila *a* i *b*

Car – koncentracija ukupnih karotenoida

Chl *a+b/Car* – omjer ukupnih klorofila *a* i *b* i ukupnih karotenoida

A470 – apsorbancija pri valnoj duljini 470 nm

A645 – apsorbancija pri valnoj duljini 645 nm

A662 – apsorbancija pri valnoj duljini 662 nm

V – ukupni volumen ekstrakta fotosintetskih pigmenata (ml)

m – masa uzorka u gramima

3.4.6. Mjerenje polifaznog rasta fluorescencije klorofila *a*

Fotosintetska učinkovitost određena je mjerenjem polifaznog rasta fluorescencije klorofila *a in vivo*, pomoću uređaja Handy PEA – *Plant Efficiency Analyser* (Hansatech, Ujedinjeno Kraljevstvo) u prijepodnevnim i ranim poslijepodnevnim satima. Mjerenje je vršeno u fazi cvatnje pojedinog hibrida suncokreta (29. srpnja je mjeran hibrid 8; 1. kolovoza hibridi 3 i 5; 2. kolovoza hibridi 1 i 4; 3. kolovoza hibridi 2 i 6; 4. kolovoza hibrid 7).

Tablica 2. Parametri dobiveni mjerenjem polifaznog rasta fluorescencije klorofila *a* i parametri OJIP testa (Strasser i sur., 2004).

Oznaka parametra	Opis parametra	Jednadžba parametra
F_0	Intenzitet fluorescencije nakon 50 μ s (korak O)	
F_m	Maksimalni intenzitet fluorescencije (korak P)	
V_J	Varijabilna fluorescencija na J koraku	$V_J = (F_J - F_0) / (F_m - F_0)$
V_I	Varijabilna fluorescencija na I koraku	$V_I = (F_I - F_0) / (F_m - F_0)$
$F_v/F_m = TR_0/ABS$	Maksimalni kvantni prinos fotosustava II	$[1 - (F_0/F_m)]$
RC/CS_0	Gustoća aktivnih reakcijskih središta	$F_v/F_m \times (V_J/M_0) \times ABS/CS_0$
ABS/RC	Apsorpcija po aktivnom reakcijskom središtu	$M_0 \times (1/V_J) \times [1 / (F_v/F_m)]$
TR_0/RC	Protok uhvaćenih fotona po aktivnom reakcijskom središtu	$M_0 \times (1/V_J)$
ET_0/RC	Elektronski transport po aktivnom reakcijskom središtu	$M_0 \times (1/V_J) \times (1 - V_J)$
DI_0/RC	Rasipanje po aktivnom reakcijskom središtu	$(ABS/RC) - (TR_0/RC)$
RC/ABS	Omjer koncentracije klorofila reakcijskih središta i koncentracije antena klorofila	$(RC/TR_0) \times (TR_0/ABS) = [(F_J - F_0) / 4 (F_{300\mu s} - F_0)] \times (F_v/F_m)$
TR_0/DI_0	Omjer protoka uhvaćenih fotona i rasipanja energije	$TR_0/DI_0 = F_v/F_0$
$ET_0/(TR_0 - ET_0)$	Transport elektrona dalje od primarnog akceptora Q_A	$(F_m - F_J) / (F_J - F_0)$
PI_{ABS}	Indeks fotosintetske učinkovitosti	$(RC/ABS) \times (TR_0/DI_0) \times [ET_0/(TR_0 - ET_0)]$

Dijelovi listova biljaka suncokreta su prije mjerenjem polifaznog rasta fluorescencije klorofila *a* minimalno 30 minuta bili u uvjetima tame koja je postignuta pomoću posebnih plastičnih kvačica prilagođenih uređaju za mjerenje. Pomoću pulsa crvene saturacijske svjetlosti (max. 650 nm, 3000 $\mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$) induciran je polifazni rast fluorescencije klorofila *a*. Prilikom mjerenja fluorescencije klorofila *a* pratile su se promjene u intenzitetu fluorescencije tijekom 1 s, počevši od 50 μs nakon osvjetljenja što se smatra početnim korakom na OJIP krivulji te se označava kao F_0 ili O korak, iza kojeg uobičajeno slijede međukoraci J i I izmjereni na oko 2 ms, odnosno 30 ms (Strauss i sur., 2006). Promjene se tijekom prve 2 ms bilježe svakih 10 μs nakon čega se bilježe svake ms.

Iz dobivenih podataka, pomoću OJIP testa izračunati su parametri učinkovitosti fotosintetskog aparata (Tablica 2). Fotosintetska učinkovitost je određena na tri nasumično odabrane biljke po hibridu u svakom ponavljanju što je rezultiralo s ukupno 12 mjerenja po hibridu koje su korištene za izračun srednjih vrijednosti pojedinog parametra fotosintetske učinkovitosti.

3.4.7. SDS elektroforeza topljivih i membranskih proteina i imunodetekcija

Relativna akumulacija proteina koji sudjeluju u izgradnji i funkciji fotosintetskog aparata, utvrđena je metodom elektroforeze na poliakrilamidnom gelu uz dodatak natrijevog dodecil sulfata (engl. *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis* – SDS-PAGE) te *Western blot* analizom i imunodetekcijom. Za imunodetekciju korištena su specifična primarna antitijela proteina kompleksa za sakupljanje svjetlosti fotosustava II – Lhcb2 (anti-Lhcb2, Agrisera), proteina D1 fotosustava II (anti-PsbA, Agrisera), proteina citokroma *f* (anti-Cyt *f*, Agrisera) i proteina velike podjedinice Rubisco-a – LSU (anti-RbcL, Agrisera), te odgovarajuća sekundarna antitijela (Donkey anti-rabbit IgG-HRP, Santa Cruz Biotechnology). Za vizualizaciju proteinskih pruga korišten je komercijalni supstrat za detekciju kemiluminiscencijom (Lumi-Light Western Blotting Substrate, Roche) u skladu s uputama proizvođača.

3.4.7.1. Ekstrakcija topljivih i membranskih proteina

Oko 0,5 g fino usitnjenog biljnog tkiva pomoću tekućeg dušika odvagano je u prethodno izvaganu kivetu. Dodan je 1 ml ekstrahiranog pufera zagrijanog na 80°C (Thermomixer 5436, Eppendorf, Njemačka). Puffer se sastojao od 0,1M Tris/HCl (pH = 8), 18,9 ml 0,1 M Tris/HCl (pH = 8), 34,5 mL 20 % SDS, 27,48 ml 87 %-tnog glicerola i 0,231 g DTT-a (ditiotreitola). Ekstrakcija se odvijala tijekom 10 minuta na 80°C u termomikseru. Uzorci su ohlađeni na ledu nakon čega je slijedilo centrifugiranje (Eppendorf Centrifuge 5804 R, Njemačka) uzoraka na 18000 g, 10 minuta na 4°C. Supernatant je pomoću mikropipete premješten u čistu kivetu, a postupak još jednom ponavljen nakon čega su supernatanti spojeni.

Koncentracija proteina određena je prema Bradfordu (1976). Metoda se bazira na vezivanju boje Coomassie briljant plavo G-250 (engl. *Coomassie Brilliant Blue G-250* – CBB G-250) koja se u kiseloj sredini elektrostatskim silama veže za amino skupine proteina. Apsorbancija smjese uzorka i boje (Bradford) je izmjerena pri valnoj duljini od 465 nm na 595 nm. Konačna koncentracija proteina izračunata je iz standardne krivulje (baždarne krivulje) koja se dobije mjerenjem apsorbancije nekoliko razrjeđenja govedeg albuminskog seruma (engl. *bovine serum albumin* – BSA) i izražena je u jedinici $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ekstrakta. Bradford matična otopina je pripravljena sa 87,5 mg CBB G-250, 25 ml 95 %-tnog etilnog alkohola i 50 ml 88 %-tne ortofosforne kiseline. Bradford radna otopina se sastojala od 3 ml 95 %-tnog etilnog alkohola, 6 ml 88 %-tne ortofosfatne kiseline, 6 ml Bradford matične otopine i destilirane vode do 100 ml. Koncentracija proteina određena je na pet uzoraka po hibridu, a svaki uzorak izmjereno je u pet ponavljanja iz kojih je izračunata prosječna vrijednost za svaki uzorak posebno.

3.4.7.2. SDS elektroforeza u poliakrilamidnom gelu (SDS – PAGE)

Ekstrakcija proteina za potrebu provedbe SDS elektroforeza u poliakrilamidnom gelu (SDS – PAGE) je napravljena prema iznad navedenom opisu (podnaslov 3.4.7.1.). Prilikom razdvajanja proteina korišten je 12 %-tni poliakrilamidni gel (Laemmli, 1970) s dodatkom anionskog detergenta, natrij dodecil sulfata (engl. *sodium dodecyl sulphate* – SDS). Proteinski ekstrakt sadržavao je 10 – 30 μg proteina (ukupno topljivih i membranskih) ovisno o proteinu koji je detektiran. Za detekciju Rubisco LSU (engl. *large subunit* – velika podjedinica Rubisca) na gel je nanesen uzorak koji je sadržavao 10 μg proteina i 1 μg pufera za nanošenje uzoraka, a za ostale proteine (Lhcb2, D1 i citokrom *f*) 30 μg proteina i 2 μg pufera. Pufer se sastojao od 2,5 ml 1,5 M Tris/HCl, pH 6,8, 1,2 g SDS-a, 3 ml glicerola, 20 mg bromfenol plavila, 1,2 ml 2-merkaptoetanolu te je dopunjen s destiliranom vodom do ukupnog volumena od 10 ml. Uzorci su denaturirani u termomikseru na 95°C tijekom 5 minuta te su ohlađeni na ledu. Zatim su uzorci nanješeni na gel uz dodatak biljega molekularnih masa (Bio-Rad). Elektroforeza je tekla pri jakosti struje od 15 mA, dok proteini nisu prošli kroz gel za sabijanje (gornji gel), nakon čega je tekla na 20 mA dok boja bromfenol plavo nije dosegula dno gela. Sveukupno trajanje elektroforeze je bilo cca 150 minuta.

3.4.7.3. Western blot analiza i imunodetekcija

Nakon razdvajanja proteina pomoću natrijevog dodecilsulfata (SDS) u poliakrilamidnom gelu, proteini su iz gela preneseni elektroforezom na nitroceluloznu membranu (Bio-Rad) po metodi koja se naziva *Western blot* analiza (Towbin i sur., 1979). Pri tome je za prijenos proteina korišten polusuhi (engl. *semi dry*) sustav Fastblot B 43 (Biometra). U katodni pufer sastava: 20 mM Tris, 150 mM glicin, 0,1 % SDS stavljen je poliakrilamidni

gel i filter papiri kako bi se uklonili soli i detergentsi. U anodni pufer sastava: 20 mM Tris, 150 mM glicina, 30 %-tni metanol uronjena je nitrocelulozna membrana i filter papiri potrebni za prijenos. Složen je „sendvič“ za prijenos po principu anoda (+), filter papir namočen u anodni pufer, membrana, gel, filter papir namočen u katodni pufer i katoda (-). Prijenos se odvijao na jakosti struje $0,65 \text{ mA/cm}^2$ membrane tijekom 120 minuta u hladnjaku na 4°C . Nakon završetka prijenosa membrana je obojena otopinom sadržaja 0,2 % Ponceau u 3 % TCA kroz 10 minuta uz zibanje, čime je potvrđena ispravnost prijenosa. Membrana je potom isprana u destiliranoj vodi nakon čega su proteinske pruge postale vidljive. Zatim je napravljena inkubacija membrane na 4°C u otopini za blokiranje sljedećeg sastava: 5 %-tno nemasno mlijeko u prahu otopljeno u puferu TBST koji je sadržavao 6,06 g Tris-a i 8,8 g NaCl-a otopljenog u 1 litri destilirane vode, pH je podešen na 7,5 s 5 M HCl i dodan je 1 ml detergenta Tween 20. Slijedila je inkubacija membrane s primarnim protutijelima na sobnoj temperaturi tijekom 120 minuta. Korištena su komercijalna protutijela (Agrisera) za detekciju proteina Lhcb2 (anti-Lhcb2, Agrisera), D1 fotosustava II (anti-PsbA), citokroma *f* (anti-Cyt *f*) i velike podjedinice Rubisco-a (anti-RbcL) razrijeđena u puferu 1:5000. Membrana je zatim isprana tri puta u trajanju po 5 minuta uz zibanje u TBST puferu (pH 7,5) te je inkubirana tijekom 120 minuta na sobnoj temperaturi sa sekundarnim protutijelima (Donkey anti-rabbit IgG-HRP, Santa Cruz Biotechnology) razrijeđenim 1:10000 u otopini za blokiranje. Na kraju su sljedila još tri ispiranja po 5 minuta uz zibanje u TBST puferu.

Detekcija proteinskih pruga napravljena je kemiluminiscencijom. U ovu svrhu korišten je 1 ml komercijalnog supstrata (Lumi-Light Western Blotting Substrate, Roche) koji se sastojao od jednake količine luminola i vodikovog peroksida. Membrana je zaštićena s prozirnom folijom i uronjena u supstrat 10-ak minuta nakon čega je istisnut višak supstrata. Membrana je premještena u kazetu za eksponiranje i na nju je položen film za autoradiofotografiju (Medicol X-Ray Film Blue, Agfa). Nakon jedne minute film je, pomoću standardne metode, razvijen i fiksiran (Dentus D i F, Agfa) te skeniran.

3.5. Urod zrna

Agronomsko svojstvo urod zrna određeno je nakon žetve pokusa iz skupnog uzorka koji je sadržavao sjeme svake pojedinačne biljke iz dva srednja reda po hibridu.

3.5.1. Određivanje uroda zrna

Nakon žetve pokusa, vlaga u zrnu određena je za svaki uzorak zasebno pomoću uređaja Dickey John GAC 2000 – *Grain analysis computer* (SAD). Težina svakog uzorka utvrđena je na vagi Defender™ 3000 (Ohanus Corporation, New Jersey, SAD).

Urod zrna je izračunat na nivou 9 % vlage i 2 % nečistoća. Veličina obračunske parcele iznosila je 7 m². Urod zrna u t/ha preračunat je prema formuli:

$$UZ (t/ha) = m \times 10 / 7 \times (100 - \text{vlaga uzorka}) / 91$$

Opis skraćénica:

m – masa uzorka (kg/parceli)

10 – pretvaranje iz kg/m² u t/ha

7 – obračunska parcela izražena u m² (2 reda x 5 m dužina reda x 0,70 m razmak između redova)

100 – ukupna vlaga

vlaga uzorka – izmjerena vlaga uzorka

91 – određivanje vlage na nivou 9 %

3.6. Statistička obrada podataka

Za analizu kvantitativnih fizioloških i biokemijskih podataka korištena je dvofaktorijalna analiza varijance (engl. *analysis of variance* – ANOVA) na razini značajnosti od 0,05 pri čemu su izvori varijabilnosti bili hibrid (ukupno osam hibrida), vrijeme mjerenja (prijepodnevi i poslijepodnevi sati) i interakcija hibrida \times vremena mjerenja. Prijepodnevna mjerenja su se smatrala uvjetima bez stresa dok su poslijepodnevna mjerenja označavala rezultate pod utjecajem stresa (povišena temperatura i suvišak svjetlosti). Također, dvofaktorijalna ANOVA korištena je prilikom analiziranja parametara fluorescencije klorofila *a*, a izvore varijabilnosti su predstavljali hibrid, vrijeme mjerenja (prijepodne i poslijepodne) i interakcija hibrida \times vrijeme mjerenja.

Za utvrđivanje razlika između hibrida suncokreta korištena je jednosmjerna ANOVA i *post hoc* Fisher-ov LSD (engl. *least significant difference*) test koji određuje najmanju značajnu razliku između testiranih hibrida na razini značajnosti od 0,05 pri čemu su vrijednosti mjerenja prijedodne i poslijepodne testirana skupno. Značajna razlika između srednjih vrijednosti u svim prikazanim slikama obilježena je u skladu s Fisher-ovim slovnim označavanjem, gdje ista slova prikazuju srednje vrijednosti između kojih nema statistički opravdane razlike.

Nadalje, podaci za svih osam hibrida i oba vremena mjerenja dobiveni temeljem fizioloških i biokemijskih analiza te urod zrna korišteni su za izradu dendrograma na osnovi Euklidske udaljenosti i metode jednostrukog povezivanja (engl. *single linkage*).

Izračunate srednje vrijednosti i standardne devijacije su za svaki parametar prikazane u rezultatima u obliku slika gdje je za svako mjerenje naveden broj ponavljanja i u priložima u obliku tablica.

Prilikom obrade podataka korišten je statistički program StatSoft Inc. STATISTICA, verzija 8.0 (2007) i Microsoft Office Excel 2010.

4. REZULTATI

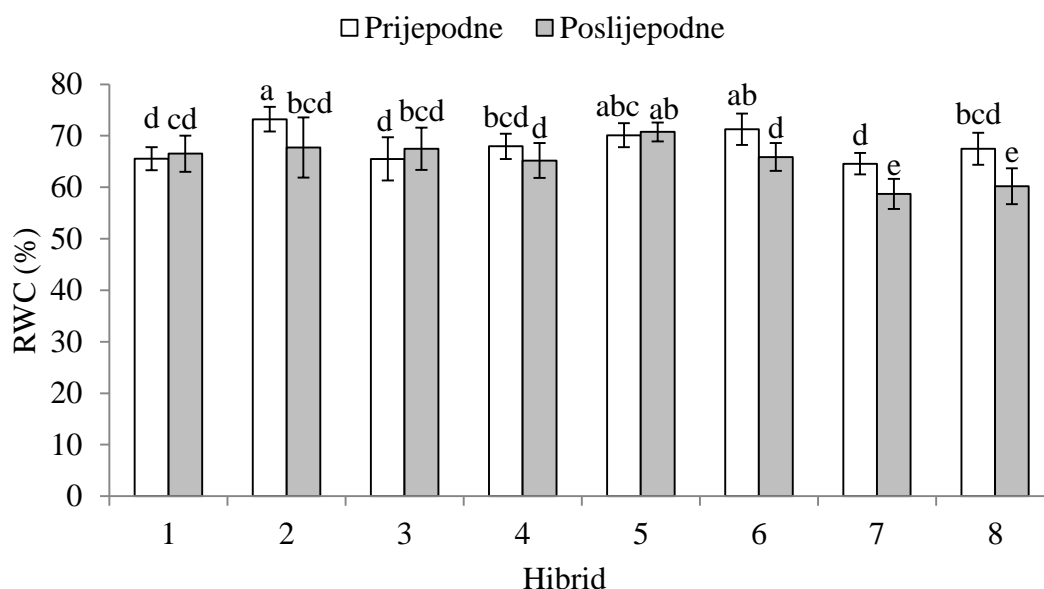
4.1. Relativni sadržaj vode

Srednje vrijednosti i standardne devijacije parametra relativni sadržaj vode (RWC) u listu suncokreta izračunate iz dobivenih vrijednosti mjerenja u prijepodnevnom i poslijepodnevnom satima prikazane su na Slici 5.

Hibrid 8 pokazao je najveću razliku između srednje vrijednosti mjerenja prijepodne (67,49 %) i poslijepodne (60,19 %). Srednje vrijednosti parametra RWC kretale su se u rasponu od 58,73 % (hibrid 7 poslijepodne) do 73,23 % (hibrid 2 prijepodne) (Tablica 3 u Prilogu).

Rezultati analize varijance i LSD testa pokazali su statistički značajnu razliku ($p < 0,05$) između srednjih vrijednosti hibrida s obzirom na to da su mjerenja prijepodne i poslijepodne testirana skupno (Slika 5). Statistički značajne razlike između srednjih vrijednosti određene su prema najmanjoj značajnoj razlici (LSD) za parametar RWC koja je iznosila 4,11. Značajnu razliku između srednjih vrijednosti mjerenja prijepodne i poslijepodne imali su hibridi 2, 6, 7 i 8.

Dvofaktorijalnom analizom varijance za parametar RWC u listovima suncokreta utvrđene su statistički opravdane razlike ($p < 0,05$) između testiranih hibrida, vremena mjerenja (prijepodne i poslijepodne) i interakcije hibrid \times vrijeme mjerenja (Tablica 5 u Prilogu).



Slika 5. Srednje vrijednosti i standardne devijacije ($n = 5$) parametra relativni sadržaj vode (RWC) u listu suncokreta za sve testirane hibride određene temeljem mjerenja u prijepodnevnom i poslijepodnevnom satima (LSD = 4,11) izražene u %. Vrijednosti označene istim slovima nisu statistički značajno različite prema LSD testu ($p < 0,05$).

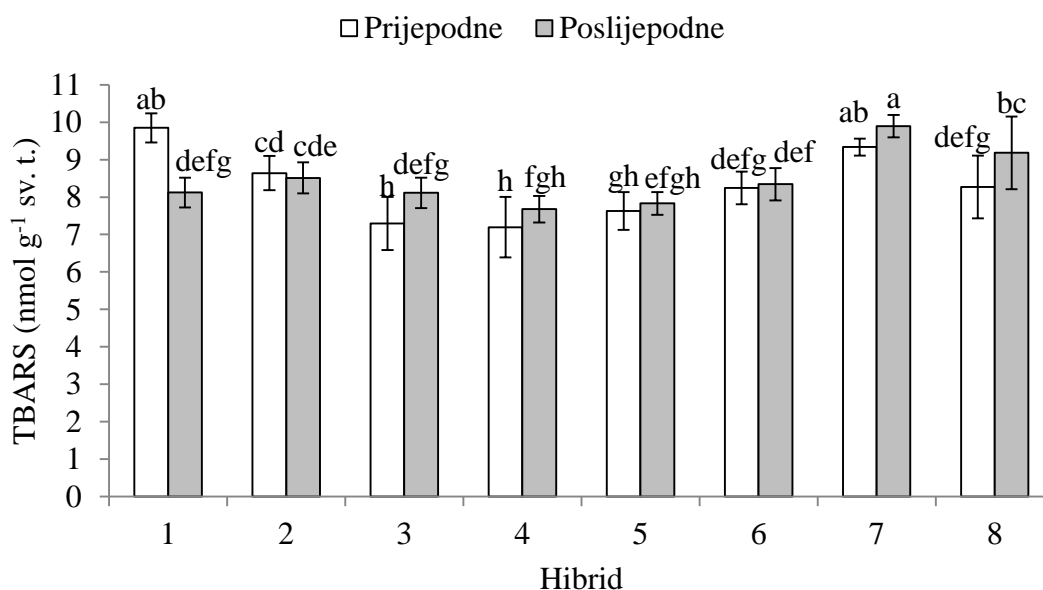
4.2. Razina lipidne peroksidacije

Srednje vrijednosti i standardne devijacije za produkte lipidne peroksidacije u obliku koncentracije reaktivnih supstanci tiobarbiturine kiseline (TBARS) izračunate iz dobivenih vrijednosti mjerenja u prijedodnevnom i poslijepodnevnom satima prikazane su na Slici 6.

Hibrid 1 pokazao je najveću razliku između mjerenja prijedodne (9,85 nmol g⁻¹) i poslijepodne (8,12 nmol g⁻¹). Srednje vrijednosti parametra TBARS kretale su se u rasponu od 7,20 nmol g⁻¹ (hibrid 4 prijedodne) do 9,89 nmol g⁻¹ (hibrid 7 poslijepodne) (Tablica 3 u Prilogu).

Rezultati analize varijance i LSD testa pokazali su statistički značajnu razliku ($p < 0,05$) između srednjih vrijednosti hibrida s obzirom na to da su mjerenja prijedodne i poslijepodne testirana skupno (Slika 6). LSD vrijednost za parametar TBARS iznosila je 0,68. Značajnu razliku između mjerenja prijedodne i poslijepodne imali su hibridi 1, 3 i 8.

Dvofaktorijalnom analizom varijance za parametar TBARS utvrđene su statistički opravdane razlike ($p < 0,05$) između testiranih hibrida i interakcije hibrid × vrijeme mjerenja (prijedodne i poslijepodne) (Tablica 5 u Prilogu).



Slika 6. Srednje vrijednosti i standardne devijacije ($n = 5$) parametra koncentracija produkata lipidne peroksidacije (TBARS) za sve testirane hibride određene temeljem mjerenja u prijedodnevnom i popodnevnim satima (LSD = 0,68) izražene u nmol g⁻¹ svježe tvari. Vrijednosti označene istim slovima nisu statistički značajno različite prema LSD testu ($p < 0,05$).

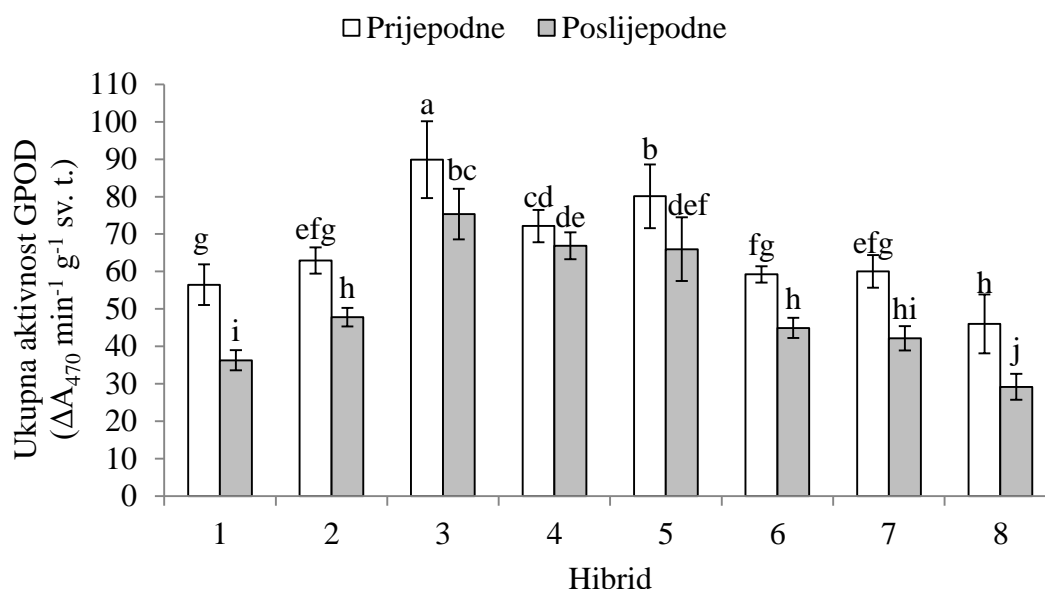
4.3. Ukupna aktivnost enzima gvajakol peroksidaze

Srednje vrijednosti i standardne devijacije parametra ukupna aktivnost enzima gvajakol peroksidaze (GPOD) izračunate iz dobivenih vrijednosti mjerenja u prijedodnevnom i poslijepodnevnom satima prikazane su na Slici 7.

Hibrid 1 pokazao je najveću razliku između mjerenja prijepodne ($56,49 \Delta A_{470} \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1}$) i poslijepodne ($36,27 \Delta A_{470} \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1}$). Srednje vrijednosti parametra ukupna aktivnost enzima GPOD kretale su se u rasponu od $29,20 \Delta A_{470} \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1}$ (hibrid 8 poslijepodne) do $89,88 \Delta A_{470} \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1}$ (hibrid 3 prijepodne) (Tablica 3 u Prilogu).

Rezultati analize varijance i LSD testa pokazali su statistički značajnu razliku ($p < 0,05$) između srednjih vrijednosti hibrida s obzirom na to da su mjerenja prijepodne i poslijepodne testirana skupno (Slika 7). LSD vrijednost za parametar ukupna aktivnost enzima GPOD iznosila je 7,05. Značajnu razliku između mjerenja prijepodne i poslijepodne nije pokazao jedino hibrid 4.

Dvofaktorijalnom analizom varijance za parametar ukupna aktivnost enzima GPOD utvrđene su statistički opravdane razlike ($p < 0,05$) između testiranih hibrida i vremena mjerenja (prijepodne i poslijepodne) (Tablica 5 u Prilogu).



Slika 7. Srednje vrijednosti i standardne devijacije ($n = 5$) parametra ukupna aktivnost enzima gvajakol peroksidaze (GPOD) za sve testirane hibride određen temeljem mjerenja u prijepodnevnom i popodnevnom satima (LSD = 7,05) izražene u $\Delta A_{470} \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1}$ svježe tvari. Vrijednosti označene istim slovima nisu statistički značajno različite prema LSD testu ($p < 0,05$).

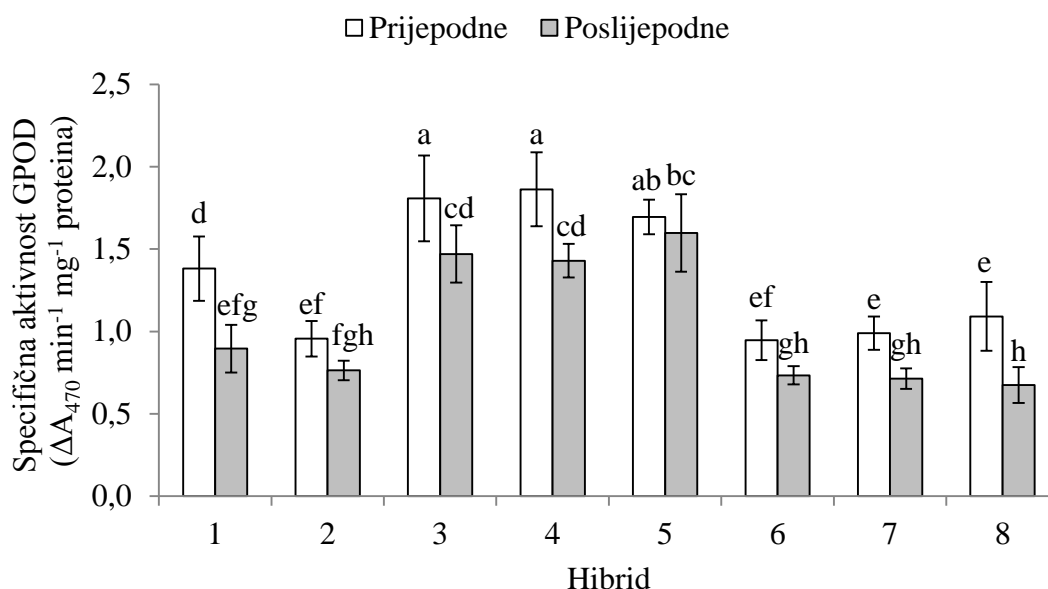
4.4. Specifična aktivnost enzima gvajakol peroksidaze

Srednje vrijednosti i standardne devijacije parametra specifična aktivnost enzima gvajakol peroksidaze (GPOD) izračunate iz dobivenih vrijednosti mjerenja u prijedodnevnom i poslijepodnevnom satima prikazane su na Slici 8.

Hibrid 1 pokazao je najveću razliku između mjerenja prijedodne ($1,38 \Delta A_{470} \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$) i poslijepodne ($0,90 \Delta A_{470} \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$). Srednje vrijednosti parametra specifična aktivnost enzima GPOD kretale su se u rasponu od $0,67 \Delta A_{470} \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ (hibrid 8 poslijepodne) do $1,86 \Delta A_{470} \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ (hibrid 4 prijedodne) (Tablica 3 u Prilogu).

Rezultati analize varijance i LSD testa pokazali su statistički značajnu razliku ($p < 0,05$) između srednjih vrijednosti hibrida s obzirom na to da su mjerenja prijedodne i poslijepodne testirana skupno (Slika 8). LSD vrijednost za parametar specifična aktivnost enzima GPOD iznosila je 0,20. Značajnu razliku između mjerenja prijedodne i poslijepodne nisu pokazali hibridi 2 i 5.

Dvofaktorijalnom analizom varijance za parametar specifična aktivnost enzima GPOD utvrđene su statistički opravdane razlike ($p < 0,05$) između testiranih hibrida i vremena mjerenja (prijedodne i poslijepodne) (Tablica 5 u Prilogu).



Slika 8. Srednje vrijednosti i standardne devijacije ($n = 5$) parametra specifična aktivnost gvajakol peroksidaze (GPOD) za sve testirane hibride određene temeljem mjerenja u prijedodnevnom i popodnevnom satima (LSD = 0,20) izražene u $\Delta A_{470} \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ proteina}$. Vrijednosti označene istim slovima nisu statistički značajno različite prema LSD testu ($p < 0,05$).

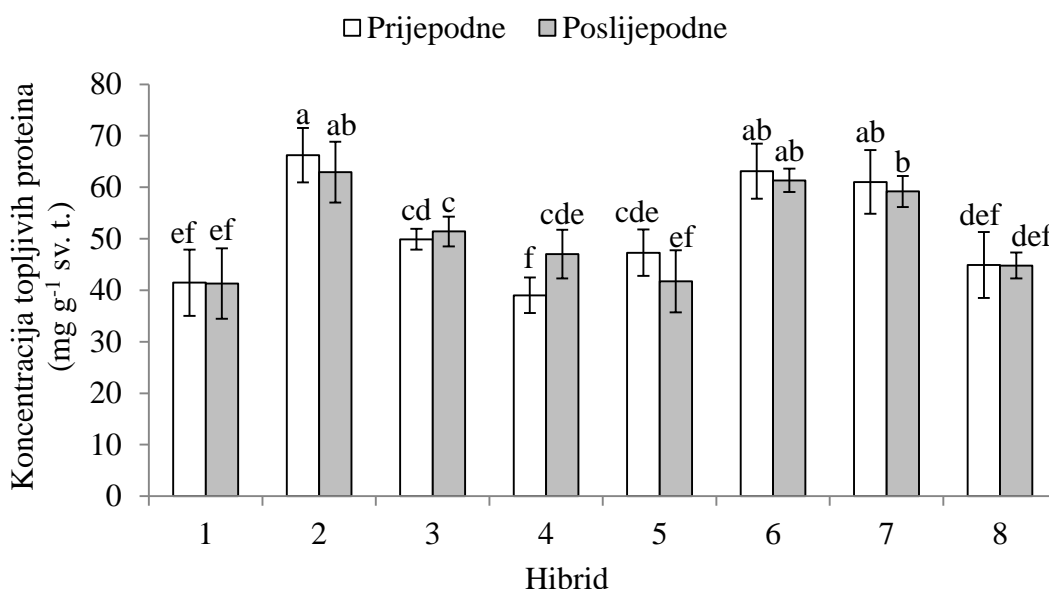
4.5. Koncentracija topljivih proteina

Srednje vrijednosti i standardne devijacije parametra koncentracija topljivih proteina u listovima suncokreta izračunate iz dobivenih vrijednosti mjerenja u prijepodnevnom i poslijepodnevnom satima prikazane su na Slici 9.

Hibrid 4 pokazao je najveću razliku između mjerenja prijepodne (39,02 mg g⁻¹) i poslijepodne (47,01 mg g⁻¹). Srednje vrijednosti parametra koncentracija topljivih proteina kretale su se u rasponu od 39,02 mg g⁻¹ (hibrid 4 prijepodne) do 66,24 mg g⁻¹ (hibrid 2 prijepodne) (Tablica 3 u Prilogu).

Rezultati analize varijance i LSD testa pokazali su statistički značajnu razliku ($p < 0,05$) između srednjih vrijednosti hibrida s obzirom na to da su mjerenja prijepodne i poslijepodne testirana skupno (Slika 9). LSD vrijednost za parametar koncentracija topljivih proteina iznosila je 6,17. Značajnu razliku između mjerenja prijepodne i poslijepodne jedini je pokazao hibrid 4.

Dvofaktorijalnom analizom varijance za parametar koncentracija topljivih proteina u listovima suncokreta utvrđena je statistički opravdana razlika ($p < 0,05$) samo između testiranih hibrida (Tablica 5 u Prilogu).



Slika 9. Srednje vrijednosti i standardne devijacije ($n = 5$) parametra koncentracija topljivih proteina u listovima suncokreta za sve testirane hibride određene temeljem mjerenja u prijepodnevnom i popodnevnom satima (LSD = 6,17) izražene u mg g⁻¹ svježe tvari. Vrijednosti označene istim slovima nisu statistički značajno različite prema LSD testu ($p < 0,05$).

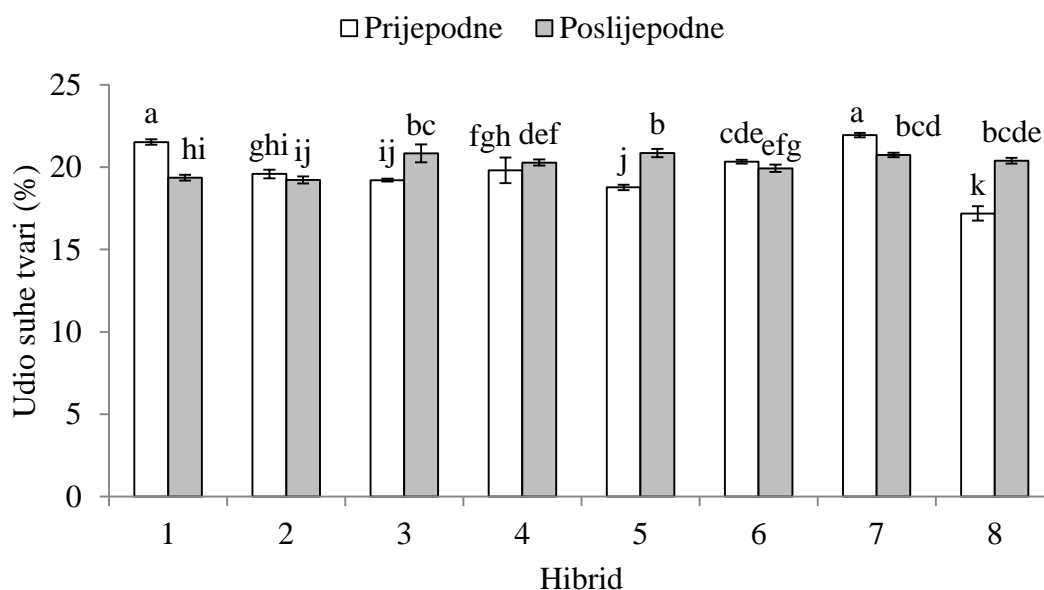
4.6. Udio suhe tvari

Srednje vrijednosti i standardne devijacije parametra udio suhe tvari izračunate iz dobivenih vrijednosti mjerenja u prijepodnevnim i poslijepodnevnim satima prikazane su na Slici 10.

Hibrid 8 pokazao je najveću razliku između mjerenja prijepodne (17,18 %) i poslijepodne (20,39 %). Srednje vrijednosti parametra udio suhe tvari kretale su se u rasponu od 17,18 % (hibrid 8 prijepodne) do 21,95 % (hibrid 7 prijepodne) (Tablica 3 u Prilogu).

Rezultati analize varijance i LSD testa pokazali su statistički značajnu razliku ($p < 0,05$) između srednjih vrijednosti hibrida s obzirom na to da su mjerenja prijepodne i poslijepodne testirana skupno (Slika 10). LSD vrijednost za parametar udio suhe tvari iznosila je 0,51. Značajnu razliku između mjerenja prijepodne i poslijepodne nisu pokazali hibridi 2, 4 i 6.

Dvofaktorijalnom analizom varijance za parametar udio suhe tvari utvrđene su statistički opravdane razlike ($p < 0,05$) između testiranih hibrida, vremena mjerenja (prijepodne i poslijepodne) i interakcije hibrid \times vrijeme mjerenja (Tablica 5 u Prilogu).



Slika 10. Srednje vrijednosti i standardne devijacije ($n = 3$) parametra udio suhe tvari za sve testirane hibride određene temeljem mjerenja u prijepodnevnim i popodnevnim satima (LSD = 0,51) izražene u %. Vrijednosti označene istim slovima nisu statistički značajno različite prema LSD testu ($p < 0,05$).

4.7. Koncentracija fotosintetskih pigmenata

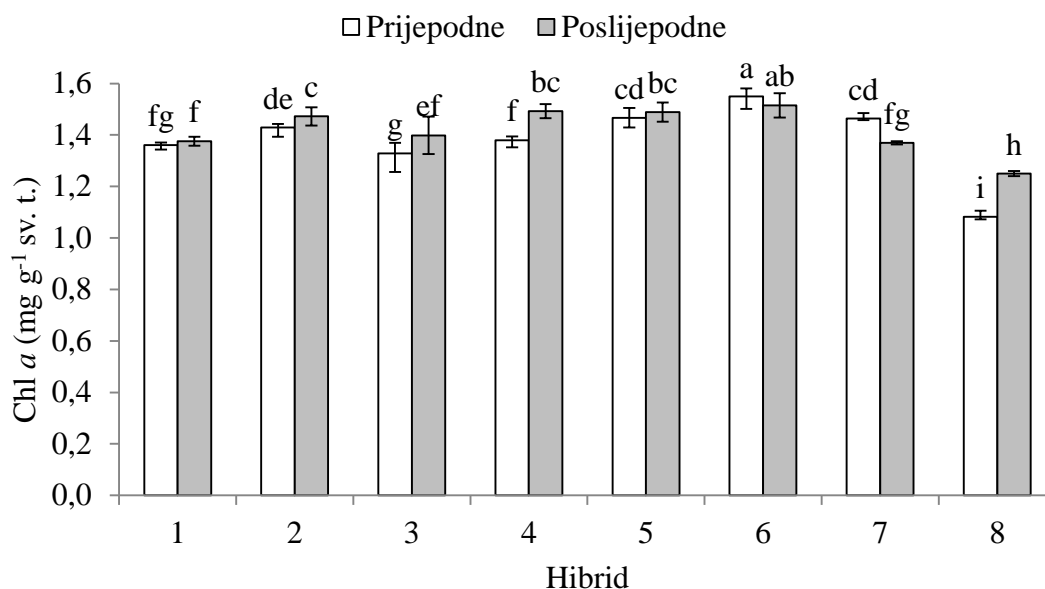
4.7.1. Klorofil *a*

Srednje vrijednosti i standardne devijacije parametra koncentracija klorofila *a* (Chl *a*) izračunate iz dobivenih vrijednosti mjerenja u prijepodnevnim i poslijepodnevnim satima prikazane su na Slici 11.

Hibrid 8 pokazao je najveću razliku između mjerenja prijepodne (1,08 mg g⁻¹) i poslijepodne (1,25 mg g⁻¹). Srednje vrijednosti parametra Chl *a* kretale su se u rasponu od 1,08 mg g⁻¹ (hibrid 8 prijepodne) do 1,55 mg g⁻¹ (hibrid 6 prijepodne) (Tablica 4 u Prilogu).

Rezultati analize varijance i LSD testa pokazali su statistički značajnu razliku ($p < 0,05$) između srednjih vrijednosti hibrida s obzirom na to da su mjerenja prijepodne i poslijepodne testirana skupno (Slika 11). LSD vrijednost za parametar Chl *a* iznosila je 0,04. Značajnu razliku između mjerenja prijepodne i poslijepodne nisu pokazali hibridi 1, 5 i 6.

Dvofaktorijalnom analizom varijance za parametar Chl *a* utvrđene su statistički opravdane razlike ($p < 0,05$) između testiranih hibrida, vremena mjerenja (prijepodne i poslijepodne) i interakcije hibrid × vrijeme mjerenja (Tablica 5 u Prilogu).



Slika 11. Srednje vrijednosti i standardne devijacije ($n = 5$) parametra koncentracija klorofila *a* (Chl *a*) za sve testirane hibride određene temeljem mjerenja u prijepodnevnim i popodnevnim satima (LSD = 0,04) izražene u mg g⁻¹ svježe tvari. Vrijednosti označene istim slovima nisu statistički značajno različite prema LSD testu ($p < 0,05$).

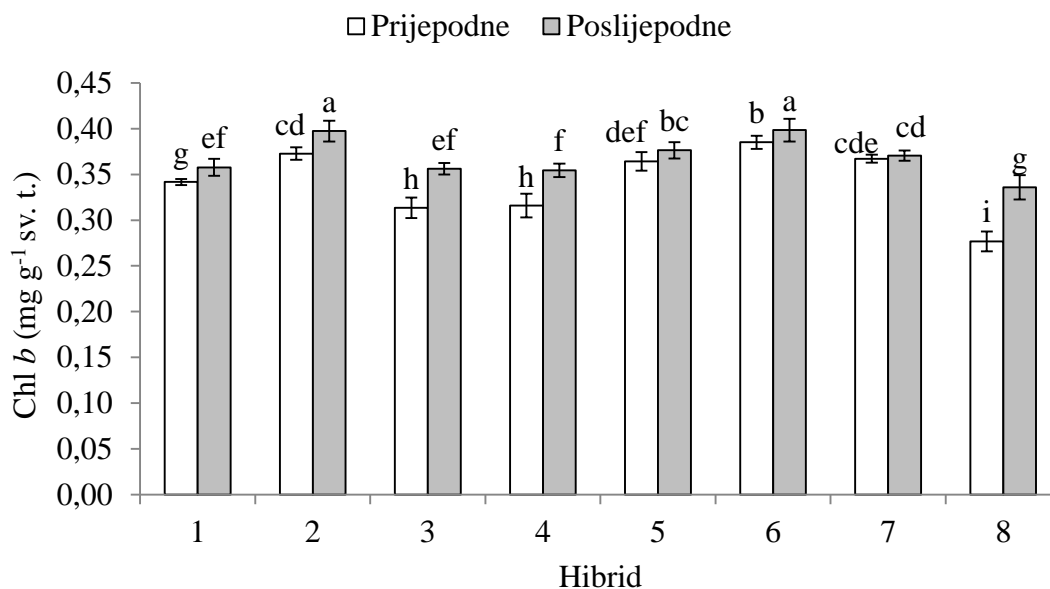
4.7.2. Klorofil *b*

Srednje vrijednosti i standardne devijacije parametra koncentracija klorofila *b* (Chl *b*) izračunate iz dobivenih vrijednosti mjerenja u prijepodnevnim i poslijepodnevnim satima prikazane su na Slici 12.

Hibrid 8 pokazao je najveću razliku između mjerenja prijepodne (0,28 mg g⁻¹) i poslijepodne (0,34 mg g⁻¹). Srednje vrijednosti parametra Chl *b* kretale su se u rasponu od 0,28 mg g⁻¹ (hibrid 8 prijepodne) do 0,40 mg g⁻¹ (hibrid 6 poslijepodne) (Tablica 4 u Prilogu).

Rezultati analize varijance i LSD testa pokazali su statistički značajnu razliku ($p < 0,05$) između srednjih vrijednosti hibrida s obzirom na to da su mjerenja prijepodne i poslijepodne testirana skupno (Slika 12). LSD vrijednost za parametar Chl *b* iznosila je 0,01. Značajnu razliku između mjerenja prijepodne i poslijepodne jedini nije pokazao hibrid 7.

Dvofaktorijalnom analizom za parametar Chl *b* utvrđene su statistički opravdane razlike ($p < 0,05$) između testiranih hibrida, vremena mjerenja (prijepodne i poslijepodne) i interakcije hibrid × vrijeme mjerenja (Tablica 5 u Prilogu).



Slika 12. Srednje vrijednosti i standardne devijacije ($n = 5$) parametra koncentracija klorofila *b* (Chl *b*) za sve testirane hibride određene temeljem mjerenja u prijepodnevnim i popodnevnim satima (LSD = 0,01) izražene u mg g⁻¹ svježe tvari. Vrijednosti označene istim slovima nisu statistički značajno različite prema LSD testu ($p < 0,05$).

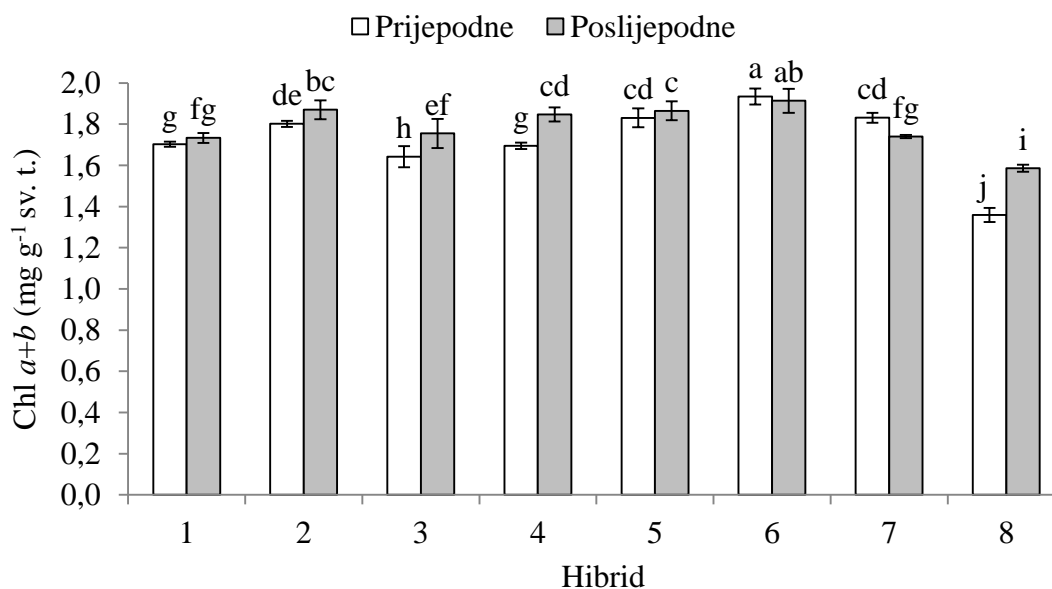
4.7.3. Ukupni klorofil *a* i *b*

Srednje vrijednosti i standardne devijacije koncentracije ukupnih klorofila *a* i *b* (Chl *a+b*) izračunate iz dobivenih vrijednosti mjerenja u prijepodnevnim i poslijepodnevnim satima prikazane su na Slici 13.

Hibrid 8 pokazao je najveću razliku između mjerenja prijepodne (1,36 mg g⁻¹) i poslijepodne (1,59 mg g⁻¹). Srednje vrijednosti parametra Chl *a+b* kretale su se u rasponu od 1,36 mg g⁻¹ (hibrid 8 prijepodne) do 1,93 mg g⁻¹ (hibrid 6 prijepodne) (Tablica 4 u Prilogu).

Rezultati analize varijance i LSD testa pokazali su statistički značajnu razliku ($p < 0,05$) između srednjih vrijednosti hibrida s obzirom na to da su mjerenja prijepodne i poslijepodne testirana skupno (Slika 13). LSD vrijednost za parametar Chl *a+b* iznosila je 0,05. Značajnu razliku između mjerenja prijepodne i poslijepodne nisu pokazali hibridi 1, 5 i 6.

Dvofaktorijalnom analizom varijance za parametar Chl *a+b* utvrđene su statistički opravdane razlike ($p < 0,05$) između testiranih hibrida, vremena mjerenja (prijepodne i poslijepodne) i interakcije hibrid \times vrijeme mjerenja (Tablica 5 u Prilogu).



Slika 13. Srednje vrijednosti i standardne devijacije ($n = 5$) parametra koncentracija ukupnih klorofila *a* i *b* (Chl *a+b*) za sve testirane hibride određene temeljem mjerenja u prijepodnevnim i popodnevnim satima (LSD = 0,05) izražene u mg g⁻¹ svježe tvari. Vrijednosti označene istim slovima nisu statistički značajno različite prema LSD testu ($p < 0,05$).

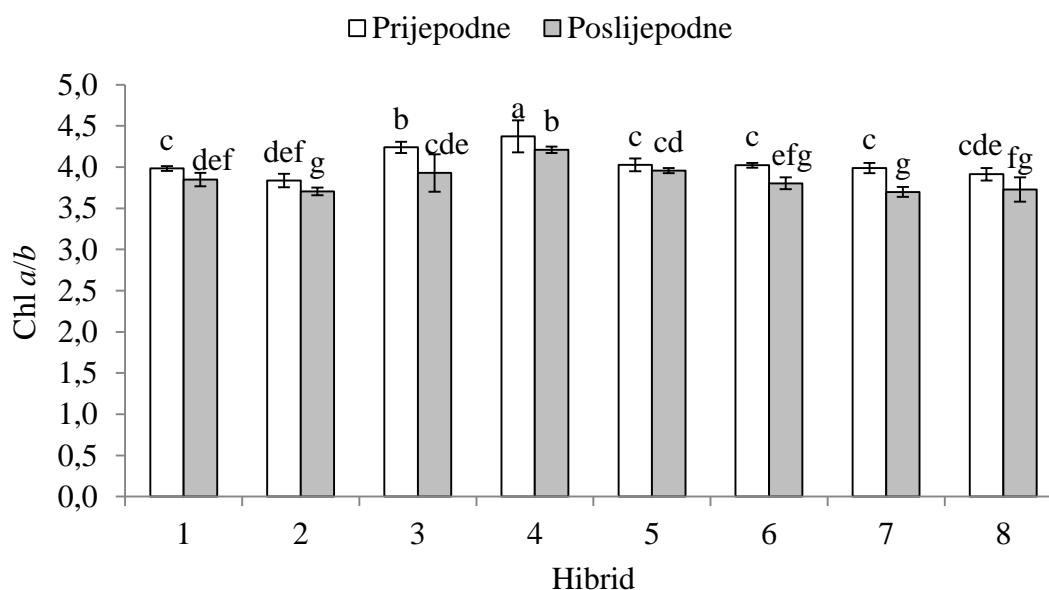
4.7.4. Omjer klorofila *a* i *b*

Srednje vrijednosti i standardne devijacije parametra omjer koncentracije klorofila *a* i *b* (Chl *a/b*) izračunate iz dobivenih vrijednosti mjerenja u prijepodnevnim i poslijepodnevnim satima prikazane su na Slici 15.

Hibrid 3 pokazao je najveću razliku između mjerenja prijepodne (4,24) i poslijepodne (3,93). Srednje vrijednosti parametra Chl *a/b* kretale su se u rasponu od 3,70 (hibrid 7 poslijepodne) do 4,37 (hibrid 4 prijepodne) (Tablica 4 u Prilogu).

Rezultati analize varijance i LSD testa pokazali su statistički značajnu razliku ($p < 0,05$) između srednjih vrijednosti hibrida s obzirom na to da su mjerenja prijepodne i poslijepodne testirana skupno (Slika 15). LSD vrijednost za parametar Chl *a/b* iznosila je 0,13. Značajnu razliku između mjerenja prijepodne i poslijepodne jedini nije pokazao hibrid 5.

Dvofaktorijalnom analizom varijance za parametar Chl *a/b* utvrđene su statistički opravdane razlike ($p < 0,05$) između testiranih hibrida i vremena mjerenja (prijepodne i poslijepodne) (Tablica 5 u Prilogu).



Slika 15. Srednje vrijednosti i standardne devijacije ($n = 5$) parametra omjer koncentracija klorofila *a* i *b* (Chl *a/b*) za sve testirane hibride određene temeljem mjerenja u prijepodnevnim i popodnevnim satima (LSD = 0,13). Vrijednosti označene istim slovima nisu statistički značajno različite prema LSD testu ($p < 0,05$).

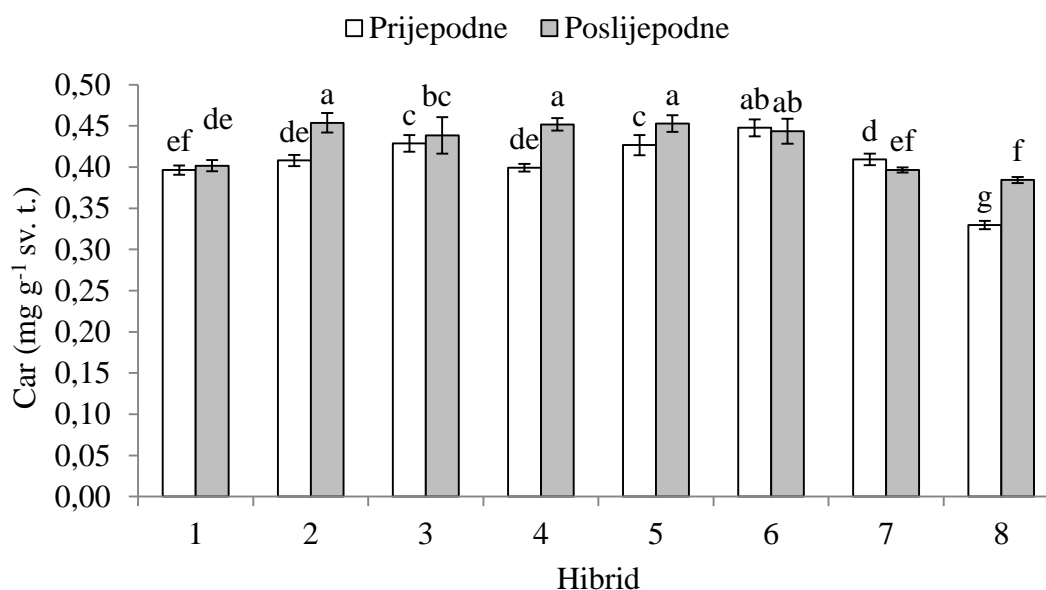
4.7.5. Ukupni karotenoidi

Srednje vrijednosti i standardne devijacije parametra koncentracija ukupnih karotenoida (Car) izračunate iz dobivenih vrijednosti mjerenja u prijepodnevnim i poslijepodnevnim satima prikazane su na Slici 14.

Hibrid 8 pokazao je najveću razliku između mjerenja prijepodne (0,33 mg g⁻¹) i poslijepodne (0,38 mg g⁻¹). Srednje vrijednosti parametra Car kretale su se u rasponu od 0,33 mg g⁻¹ (hibrid 8 prijepodne) do 0,45 mg g⁻¹ (hibrid 6 prijepodne, hibridi 2, 4 i 5 poslijepodne) (Tablica 4 u Prilogu).

Rezultati analize varijance i LSD testa pokazali su statistički značajnu razliku ($p < 0,05$) između srednjih vrijednosti hibrida s obzirom na to da su mjerenja prijepodne i poslijepodne testirana skupno (Slika 14). LSD vrijednost za parametar Car iznosila je 0,01. Značajnu razliku između mjerenja prijepodne i poslijepodne nisu pokazali hibridi 1, 3 i 6.

Dvofaktorijalnom analizom varijance za parametar Car utvrđene su statistički opravdane razlike ($p < 0,05$) između testiranih hibrida, vremena mjerenja (prijepodne i poslijepodne) i interakcije hibrid \times vrijeme mjerenja (Tablica 5 u Prilogu).



Slika 14. Srednje vrijednosti i standardne devijacije ($n = 5$) parametra koncentracija ukupnih karotenoida (Car) za sve testirane hibride određene temeljem mjerenja u prijepodnevnim i popodnevnim satima (LSD = 0,01) izražene u mg g⁻¹ svježe tvari. Vrijednosti označene istim slovima nisu statistički značajno različite prema LSD testu ($p < 0,05$).

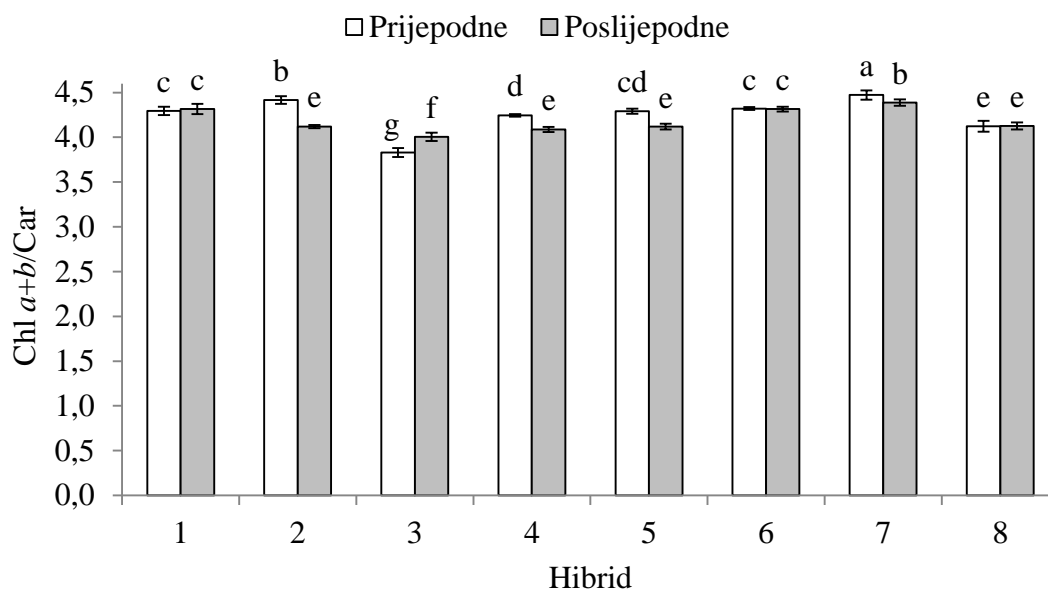
4.7.6. Omjer ukupnih klorofila *a* i *b* i ukupnih karotenoida

Srednje vrijednosti i standardne devijacije parametra omjer ukupnih klorofila *a* i *b* i karotenoida (Chl *a+b*/Car) izračunate iz dobivenih vrijednosti mjerenja u prijepodnevnim i poslijepodnevnim satima prikazane su na Slici 16.

Hibridi 2 pokazao je najveću razliku između mjerenja prijepodne (4,42) i poslijepodne (4,12). Srednje vrijednosti parametra Chl *a+b*/Car kretale su se u rasponu od 3,83 (hibrid 3 prijepodne) do 4,47 (hibrid 7 prijepodne) (Tablica 4 u Prilogu).

Rezultati analize varijance i LSD testa pokazali su statistički značajnu razliku ($p < 0,05$) između srednjih vrijednosti hibrida s obzirom na to da su mjerenja prijepodne i poslijepodne testirana skupno (Slika 16). LSD vrijednost za parametar Chl *a+b*/Car iznosila je 0,05. Značajnu razliku između mjerenja prijepodne i poslijepodne nisu pokazali hibridi 1, 6 i 8.

Dvofaktorijalnom analizom varijance za parametar Chl *a+b*/Car utvrđene su statistički opravdane razlike ($p < 0,05$) između testiranih hibrida, vremena mjerenja (prijepodne i poslijepodne) i interakcije hibrid \times vrijeme mjerenja (Tablica 5 u Prilogu).



Slika 16. Srednje vrijednosti i standardne devijacije ($n = 5$) parametra omjer ukupnih klorofila *a* i *b* i karotenoida (Chl *a+b*/Car) za sve testirane hibride određene temeljem mjerenja u prijepodnevnim i popodnevnim satima (LSD = 0,05). Vrijednosti označene istim slovima nisu statistički značajno različite prema LSD testu ($p < 0,05$).

4.8. Fotosintetska učinkovitost

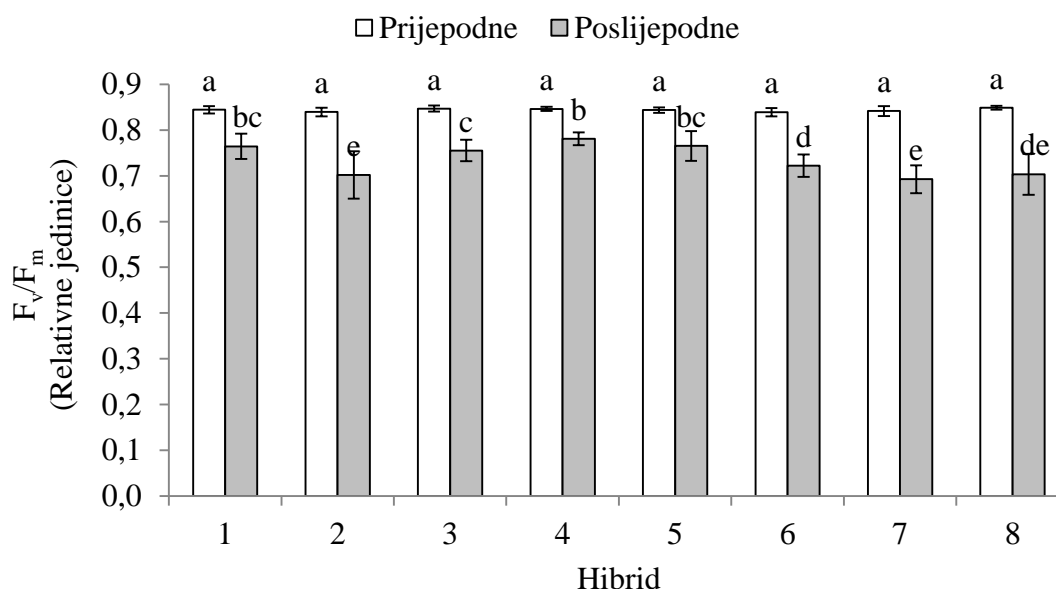
4.8.1. Maksimalni kvantni prinos fotosustava II

Srednje vrijednosti i standardne devijacije parametara maksimalni kvantni prinos fotosustava II (F_v/F_m) izračunate iz dobivenih vrijednosti mjerenja u prijepodnevnim i poslijepodnevnim satima izražene u relativnim jedinicama prikazane su na Slici 17.

Hibrid 7 pokazao je najveću razliku između mjerenja prijepodne (0,84) i poslijepodne (0,69). Srednje vrijednosti parametra F_v/F_m kretale su se u rasponu od 0,69 (hibrid 7 poslijepodne) do 0,85 (hibridi 3, 4 i 8 prijepodne) (Tablica 4 u Prilogu).

Rezultati analize varijance i LSD testa pokazali su statistički značajnu razliku ($p < 0,05$) između srednjih vrijednosti hibrida s obzirom na to da su mjerenja prijepodne i poslijepodne testirana skupno (Slika 17). LSD vrijednost za parametar F_v/F_m iznosila je 0,02. Značajnu razliku između mjerenja prijepodne i poslijepodne pokazali su svi hibridi.

Dvofaktorijalnom analizom varijance parametar F_v/F_m utvrđene su statistički opravdane razlike ($p < 0,05$) između testiranih hibrida, vremena mjerenja (prijepodne i poslijepodne) i interakcije hibrid \times vrijeme mjerenja (Tablica 5 u Prilogu).



Slika 17. Srednje vrijednosti i standardne devijacije ($n = 12$) parametra maksimalni kvantni prinos fotosustava II (F_v/F_m) za sve testirane hibride određene temeljem mjerenja u prijepodnevnim i popodnevnim satima (LSD = 0,02) izražene u relativnim jedinicama. Vrijednosti označene istim slovima nisu statistički značajno različite prema LSD testu ($p < 0,05$).

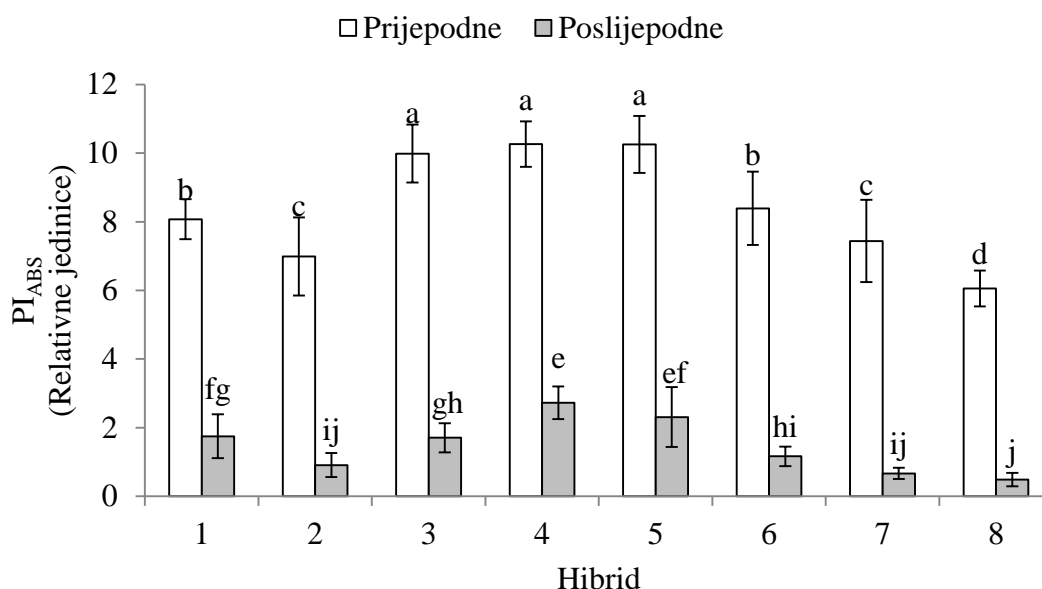
4.8.2. Indeks fotosintetske učinkovitosti

Srednje vrijednosti i standardne devijacije parametra indeks fotosintetske učinkovitosti (PI_{ABS}) izračunate iz dobivenih vrijednosti mjerenja u prijepodnevnim i poslijepodnevnim satima izražene u relativnim jedinicama prikazane su na Slici 18.

Hibrid 3 pokazao je najveću razliku između mjerenja prijepodne (9,99) i poslijepodne (1,71). Srednje vrijednosti parametra PI_{ABS} kretale su se u rasponu od 0,49 (hibrid 8 poslijepodne) do 10,26 (hibrid 4 prijepodne) (Tablica 4 u Prilogu).

Rezultati analize varijance i LSD testa pokazali su statistički značajnu razliku ($p < 0,05$) između srednjih vrijednosti hibrida s obzirom na to da su mjerenja prijepodne i poslijepodne testirana skupno (Slika 18). LSD vrijednost za parametar PI_{ABS} iznosila je 0,57. Značajnu razliku između mjerenja prijepodne i poslijepodne pokazali su svi hibridi.

Dvofaktorijalnom analizom varijance za parametar PI_{ABS} utvrđene su statistički opravdane razlike ($p < 0,05$) između testiranih hibrida, vremena mjerenja (prijepodne i poslijepodne) i interakcije hibrid \times vrijeme mjerenja (Tablica 5 u Prilogu).



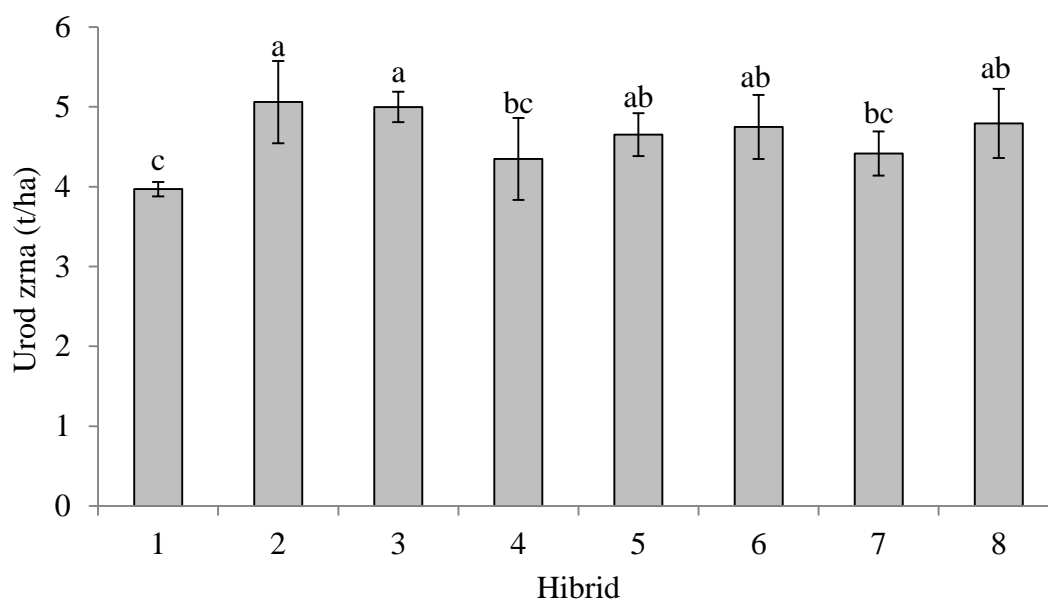
Slika 18. Srednje vrijednosti i standardne devijacije ($n = 12$) parametra indeks fotosintetske učinkovitosti (PI_{ABS}) za sve testirane hibride određene temeljem mjerenja u prijepodnevnim i popodnevnim satima (LSD = 0,57) izražene u relativnim jedinicama. Vrijednosti označene istim slovima nisu statistički značajno različite prema LSD testu ($p < 0,05$).

4.9. Urod zrna suncokreta

Srednje vrijednosti i standardne devijacije parametra urod zrna suncokreta prikazane su na Slici 19.

Srednje vrijednosti uroda zrna suncokreta kretale su se u rasponu od 3,97 (hibrid 1) do 5,06 (hibrid 2). LSD vrijednost uroda zrna iznosila je 0,53 (Tablica 3 u Prilogu).

Rezultati analize varijance i LSD testa za parametar urod zrna suncokreta pokazali su statistički opravdane razlike ($p < 0,05$) između srednjih vrijednosti testiranih hibrida (Slika 19).



Slika 19. Srednje vrijednosti i standardne devijacije ($n = 4$) parametra urod zrna u t/ha za sve testirane hibride (LSD = 0,53). Vrijednosti označene istim slovima nisu statistički značajno različite prema LSD testu ($p < 0,05$).

4.10. Klaster analiza istraživanih hibrida suncokreta

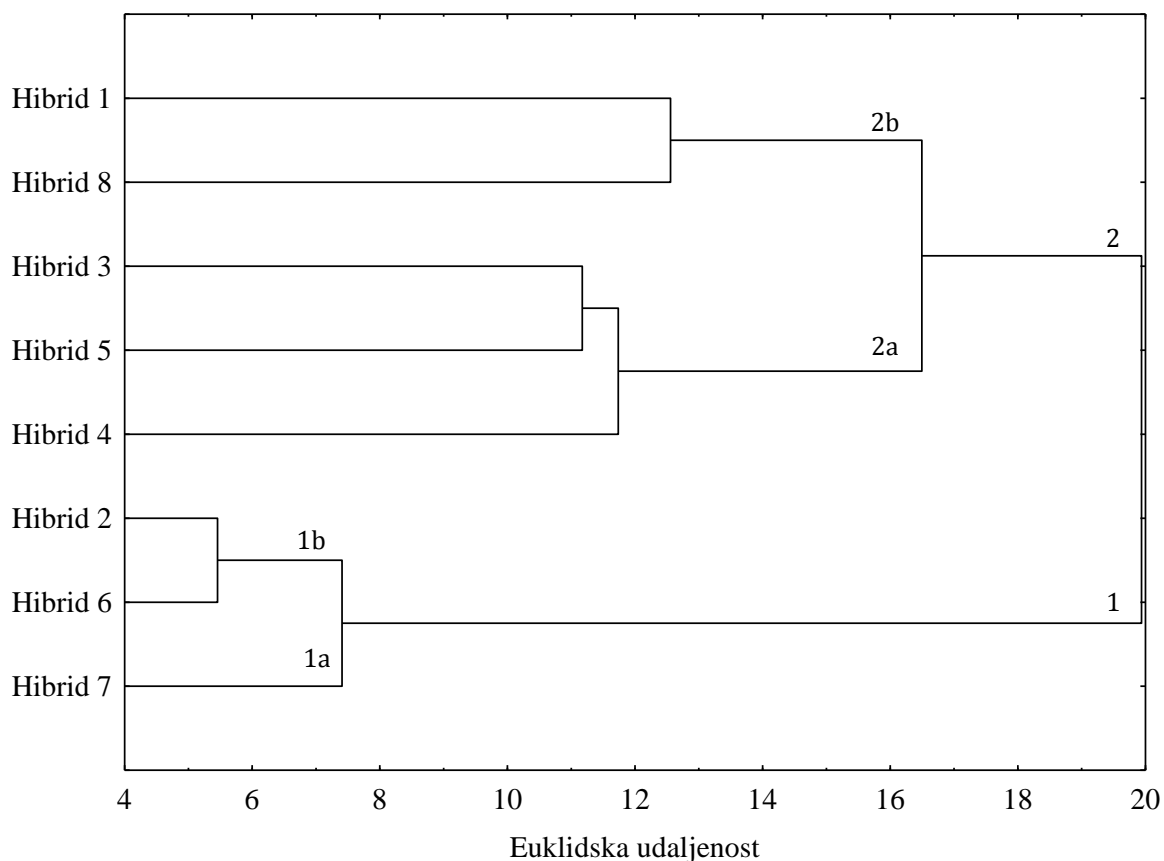
Na temelju dobivenih srednjih vrijednosti analiza provedenih na listovima osam hibrida suncokreta uzorkovanih i određenih u prijepodnevnim satima na svježoj tvari (RWC, TBARS, ukupna aktivnost enzima GPOD, specifična aktivnost enzima GPOD, koncentracija topljivih proteina, udio suhe tvari, koncentracije Chl *a*, Chl *b*, Chl *a+b*, Car, Chl *a/b*, Chl *a+b/Car*, F_v/F_m , PI_{ABS}), te srednjih vrijednosti za urod zrna napravljen je dendrogram na osnovi Euklidske udaljenosti i metode jednostrukog povezivanja (Slika 20).

Prema dendrogramu hibridi su se grupirali u dvije grupe. Grupu 1 čine hibridi 2, 6 i 7, a grupi 2 pripadaju hibridi 1, 8, 3, 5 i 4 pri čemu su obje grupe dalje podijeljene na dvije podgrupe, 1a i 1b te 2a i 2b. Podgrupa 1a sadrži hibrid 7, a podgrupa 1b hibride 2 i 6. U podgrupu 2a svrstana su tri hibrida (3, 4 i 5), dok se u podgrupi 2b nalaze hibridi 1 i 8.

Udaljenosti između svih osam hibrida kretale su se od 5,46 (između hibrida 2 i 6) do 19,94 (između grupe 1 i 2). Udaljenost između podgrupe 1a (hibrid 7) i 1b (hibridi 2 i 6) iznosila je 7,41. Udaljenost između podgrupa 2a (hibridi 3, 4 i 5) i 2 b (hibridi 1 i 8) iznosila je 16,50, dok je najveća udaljenost unutar podgrupe 2a bila 11,74, a najmanja (između hibrida 3 i 5) 11,17. Unutar podgrupe 2b udaljenost između hibrida 1 i 8 iznosila je 12,56.

Za daljnju provedbu istraživanja u uvjetima okolišnog stresa uzrokovanog povišenom temperaturom i suviškom svjetlosti odabrani su hibridi 4 i 7 na temelju prethodno prikazanih fizioloških i biokemijskih parametara (prikazani i objašnjeni u podnaslovima od 4.1. do 4.9.) iz kojih je napravljena klaster analiza.

Odabrani hibridi 4 i 7 pripadaju različitim grupama klastera, odnosno njihova međusobna udaljenost je 19,94. S obzirom na to da je dendrogram napravljen prema Euklidskoj udaljenosti i metodi jednostrukog povezivanja, odnosno metodi najbližeg susjeda koja povezuje objekte prema međusobnoj udaljenosti i sličnosti, hibridi 4 i 7 su jedni od najudaljenijih hibrida, odnosno između njih postoji vrlo mala sličnost. Nadalje, hibrid 7 je eksperimentalni hibrid Poljoprivrednog instituta Osijek, a hibrid 4 je korišteni standard u vlasništvu druge oplemenjivačke kuće.



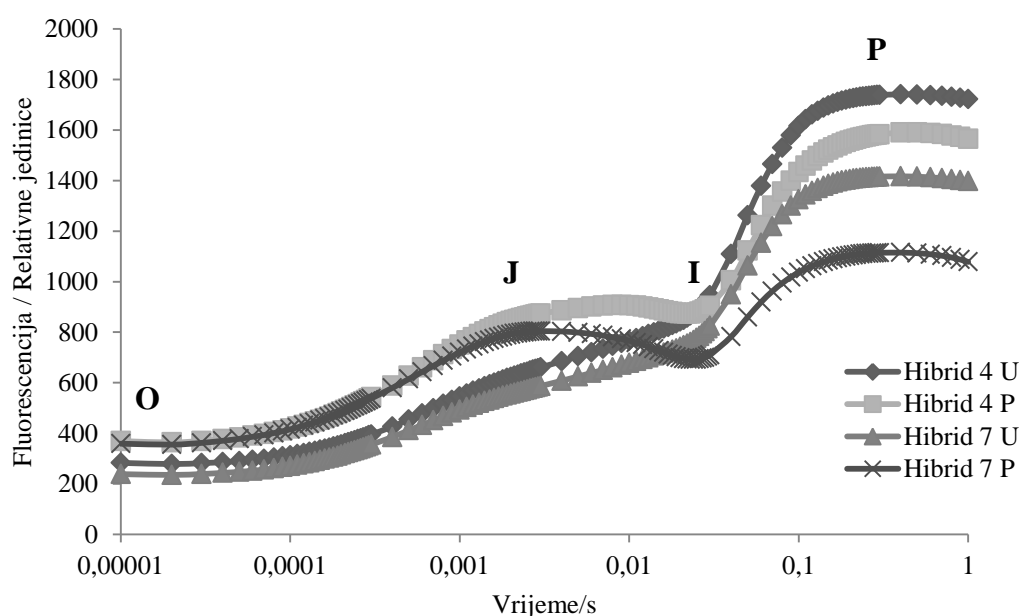
Slika 20. Dendrogram na osnovi Euklidske udaljenosti izrađen na temelju uroda zrna te fizioloških i biokemijskih parametara (relativni sadržaj vode, razina lipidne peroksidacije, ukupna i specifična aktivnost enzima gvajakol peroksidaze, koncentracija topljivih proteina, udjel suhe tvari, koncentracija klorofila *a*, klorofila *b*, ukupnih klorofila *a+b*, ukupnih karotenoida, omjer klorofila *a* i klorofila *b*, omjer ukupnih klorofila i ukupnih karotenoida, maksimalni kvantni prinos fotosustava II, indeks fotosintetske učinkovitosti mjerenih na osam hibrida suncokreta tijekom prijepodnevnih sati).

4.11. OJIP porast fluorescencije klorofila *a*

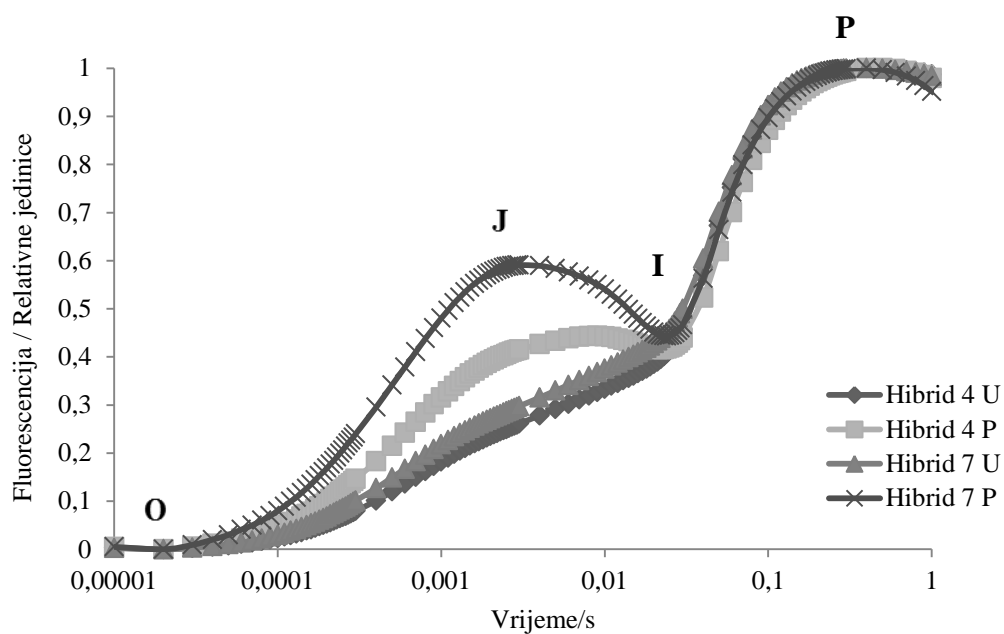
OJIP krivulje intenziteta fluorescencije na logaritamskoj vremenskoj skali izrađene su prema podacima mjerenja fluorescencije klorofila *a* u prijedopodnevnom i poslijepodnevnom satima, na kojima se mogu pratiti svi koraci nastali tijekom promjena u intenzitetu fluorescencije na dva odabrana hibrida (hibrid 4 i hibrid 7).

Na slici 21 prikazane su native krivulje OJIP porasta fluorescencije klorofila *a*, na kojima se mogu uočiti razlike u vrijednostima fluorescencije između istraživanih hibrida.

Krivulje koje pokazuju vrijednosti mjerenja hibrida 4 i 7 prijedopodne imale su tipičan oblik normalizirane OJIP krivulje, ali je hibrid 7 za razliku od hibrida 4 imao blagi porast intenziteta fluorescencije u koracima J i I (Slika 22). Krivulje za poslijepodnevna mjerenja nisu imale tipičan oblik. U koraku J došlo je do porasta intenziteta fluorescencije kod oba hibrida, ali je porast bio izraženiji kod hibrida 7. Nadalje, iz prikazane Slike 22 primjećuje se kako su krivulje u koraku I podjednake za oba hibrida i oba mjerenja, ali krivulje hibrida 7 pokazuju malo jači intenzitet fluorescencije.



Slika 21. Nativni OJIP porast fluorescencije klorofila *a* hibrida 4 i 7 u prijedopodnevnom (U) i poslijepodnevnom (P) satima. Promjena intenziteta fluorescencije prikazana je na logaritamskoj vremenskoj skali.



Slika 22. Normalizirani OJIP porast fluorescencije klorofila *a* hibrida 4 i 7 u prijedpodnevnim (U) i poslijepodnevnim satima (P). Promjena intenziteta fluorescencije prikazana je na logaritamskoj vremenskoj skali.

4.12. Fluorescencija klorofila *a*

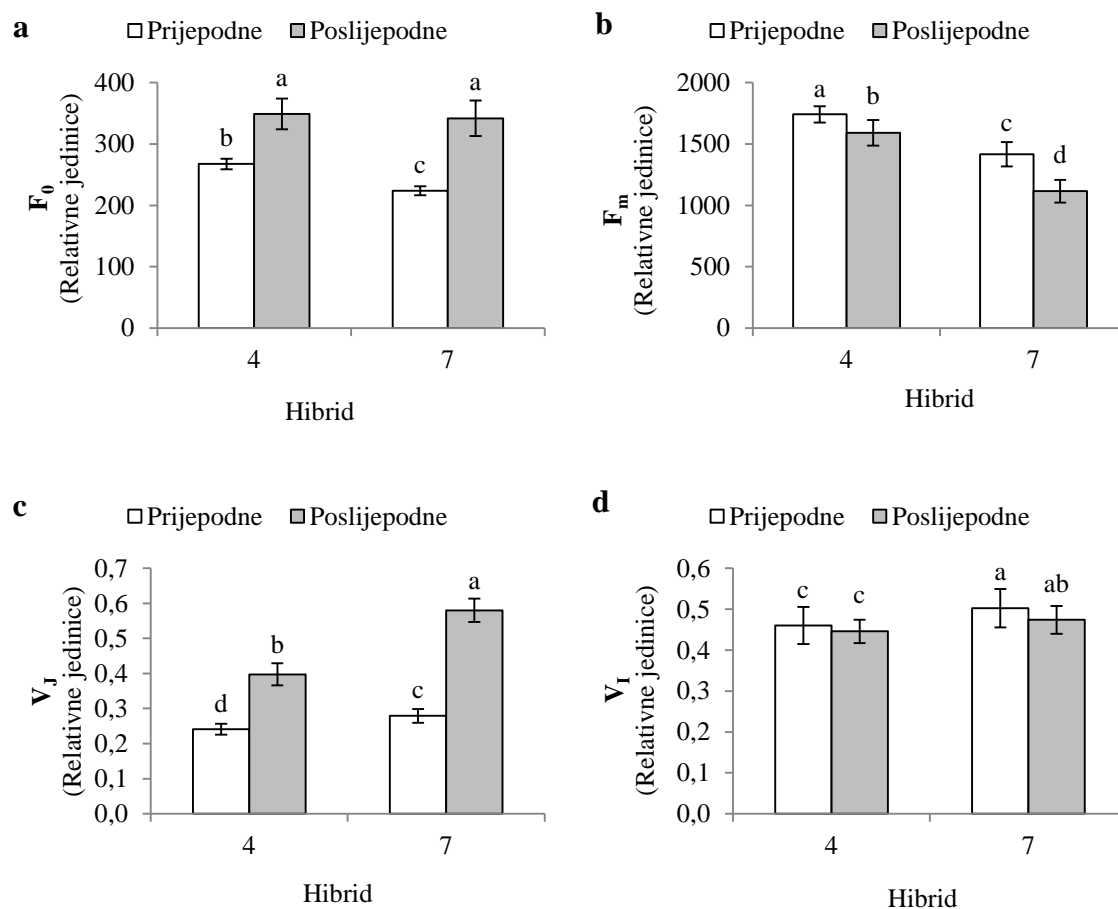
4.12.1. Parametri OJIP porasta fluorescencije klorofila *a*

Srednje vrijednosti i standardne devijacije parametara: minimalni intenzitet fluorescencije – O korak (F_0), maksimalni intenzitet fluorescencije – P korak (F_m), varijabilna fluorescencija na J koraku (V_J) i varijabilna fluorescencija na I koraku (V_I) izračunate iz dobivenih vrijednosti mjerenja u prijepodnevnim i poslijepodnevnim satima izražene u relativnim jedinicama prikazane su na Slici 23 a, b, c i d.

Srednje vrijednosti parametra F_0 kretale su se u rasponu od 223,75 (hibrid 7 prijepodne) do 348,75 (hibrid 4 poslijepodne), parametra F_m u rasponu od 1115,58 (hibrid 7 poslijepodne) do 1740,92 (hibrid 4 prijepodne), parametra V_J u rasponu od 0,24 (hibrid 4 prijepodne) do 0,58 (hibrid 7 poslijepodne) i parametra V_I u rasponu od 0,45 (hibrid 4 poslijepodne) do 0,50 (hibrid 7 prijepodne) (Tablica 6 u Prilogu).

Rezultati analize varijance i LSD testa pokazali su statistički značajnu razliku ($p < 0,05$) između srednjih vrijednosti hibrida s obzirom na to da su mjerenja prijepodne i poslijepodne testirana skupno (Slika 23 a, b, c i d). LSD vrijednost parametra F_0 iznosila je 16,39, parametra F_m 75,63, parametra V_J 0,02 i parametra V_I 0,03. Značajnu razliku između srednjih vrijednosti mjerenja prijepodne i poslijepodne pokazala su oba hibrida, osim kod parametar V_I gdje nije utvrđena razlika.

Dvofaktorijalnom analizom varijance za parametre F_0 , F_m i V_J utvrđene su statistički opravdane razlike ($p < 0,05$) između testiranih hibrida, vremena mjerenja (prijepodne i poslijepodne) i interakcije hibrid \times vrijeme mjerenja, dok su za parametar V_I utvrđene statistički opravdane razlike samo između testiranih hibrida (Tablica 7 u Prilogu).



Slika 23. Srednje vrijednosti i standardne devijacije ($n = 12$) parametara: (a) minimalni intenzitet fluorescencije – O korak (F_0), $LSD = 16,39$; (b) maksimalni intenzitet fluorescencije – P korak (F_m), $LSD = 75,63$; (c) varijabilna fluorescencija na J koraku (V_J), $LSD = 0,02$ i (d) varijabilna fluorescencija na I koraku (V_I), $LSD = 0,03$, izračunate iz vrijednosti mjerenja na listovima suncokreta tijekom prijepodnevnih i poslijepodnevni sati izražene u relativnim jedinicama. Vrijednosti označene istim slovima nisu statistički značajno različite prema LSD testu ($p < 0,05$).

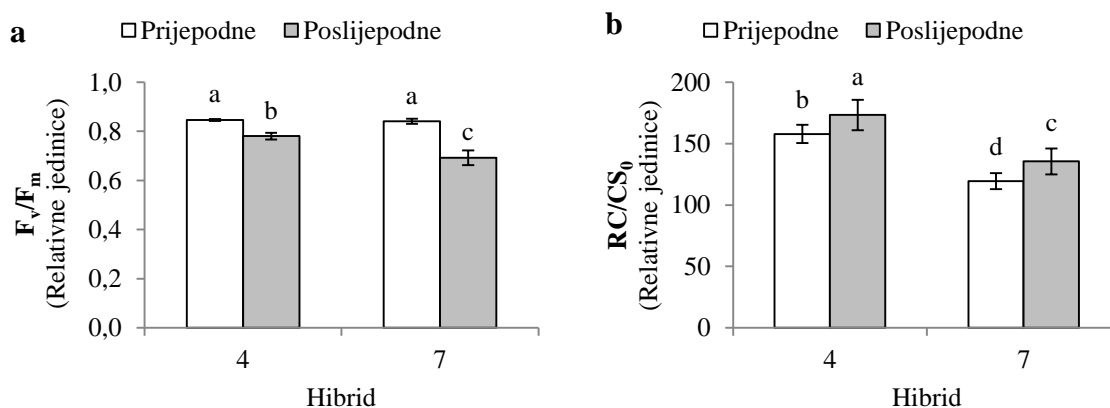
4.12.2. Učinkovitost fotosustava II

Srednje vrijednosti i standardne devijacije parametara: maksimalni kvantni prinos fotosustava II (F_v/F_m) i gustoća aktivnih reakcijskih središta (RC/CS_0) izračunate iz dobivenih vrijednosti mjerenja u prijedpodnevnim i poslijepodnevnim satima izražene u relativnim jedinicama prikazane su na Slici 24 a i b.

Srednje vrijednosti parametra F_v/F_m kretale su se u rasponu od 0,69 (hibrid 7 poslijepodne) do 0,85 (hibrid 4 prijedpodne), a kod parametra RC/CS_0 u rasponu od 119,35 (hibrid 7 prijedpodne) do 173,32 (hibrid 4 poslijepodne) (Tablica 6 u Prilogu).

Rezultati analize varijance i LSD testa pokazali su statistički značajnu razliku ($p < 0,05$) između srednjih vrijednosti hibrida s obzirom na to da su mjerenja prijedpodne i poslijepodne testirana skupno (Slika 24 a i b). LSD vrijednost parametra F_v/F_m iznosila je 0,01, a za parametar RC/CS_0 7,84. Značajnu razliku između mjerenja prijedpodne i poslijepodne pokazala su oba hibrida.

Dvofaktorijalnom analizom varijance za parametar F_v/F_m utvrđene statistički opravdane razlike ($p < 0,05$) između testiranih hibrida, vremena mjerenja (prijepodne i poslijepodne) i interakcije hibrid \times vrijeme mjerenja, dok su za parametar RC/CS_0 utvrđene su statistički opravdane razlike ($p < 0,05$) između testiranih hibrida i vremena mjerenja (prijepodne i poslijepodne) (Tablica 7 u Prilogu).



Slika 24. Srednje vrijednosti i standardne devijacije ($n = 12$) parametara: (a) maksimalni kvantni prinos fotosustava II (F_v/F_m), $LSD = 0,01$ i (b) gustoća aktivnih reakcijskih središta (RC/CS_0), $LSD = 7,84$, izračunate iz vrijednosti mjerenja na listovima suncokreta tijekom prijedpodnevnih i poslijepodnevnih sati izražene u relativnim jedinicama. Vrijednosti označene istim slovima nisu statistički značajno različite prema LSD testu ($p < 0,05$).

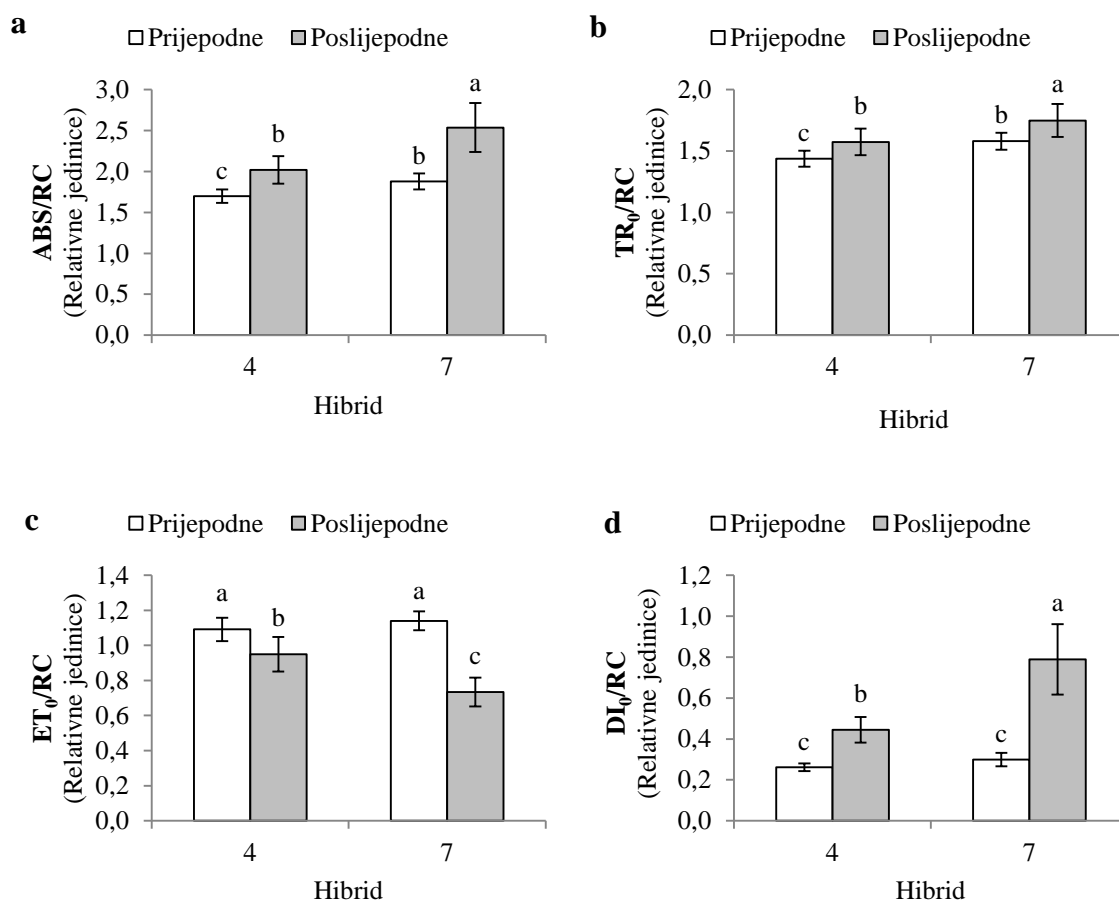
4.12.3. Prijenos energije po aktivnom reakcijskom središtu

Srednje vrijednosti i standardne devijacije parametara: apsorpcija po aktivnom reakcijskom središtu (ABS/RC), protok uhvaćenih fotona po aktivnom reakcijskom središtu (TR_0/RC), elektronski transport po aktivnom reakcijskom središtu (ET_0/RC) i rasipanje po aktivnom reakcijskom središtu (DI_0/RC) izračunate iz dobivenih vrijednosti mjerenja u prijedpodnevnim i poslijepodnevnim satima izražene u relativnim jedinicama prikazane su na Slici 25 a, b, c i d.

Srednje vrijednosti parametra ABS/RC kretale su se u rasponu od 1,70 (hibrid 4 prijedpodne) do 2,54 (hibrid 7 poslijepodne), parametra TR_0/RC u rasponu od 1,44 (hibrid 4 poslijepodne) do 1,75 (hibrid 7 poslijepodne), parametra ET_0/RC u rasponu od 0,73 (hibrid 7 poslijepodne) do 1,14 (hibrid 7 prijedpodne) i parametra DI_0/RC u rasponu od 0,26 (hibrid 4 prijedpodne) do 0,79 (hibrid 7 poslijepodne) (Tablica 6 u Prilogu).

Rezultati analize varijance i LSD testa pokazali su statistički značajnu razliku ($p < 0,05$) između srednjih vrijednosti hibrida s obzirom na to da su mjerenja prijedpodne i poslijepodne testirana skupno (Slika 25 a, b, c i d). LSD vrijednost parametra ABS/RC iznosila je 0,15, parametra TR_0/RC 0,08, parametra ET_0/RC 0,06 i parametra DI_0/RC 0,08. Značajnu razliku između srednjih vrijednosti mjerenja prijedpodne i poslijepodne pokazala su oba hibrida.

Dvofaktorijalnom analizom varijance za parametre ABS/RC, ET_0/RC i DI_0/RC utvrđene su statistički opravdane razlike ($p < 0,05$) između testiranih hibrida, vremena mjerenja (prijepodne i poslijepodne) i interakcije hibrid \times vrijeme mjerenja, a za parametar TR_0/RC utvrđene su statistički opravdane razlike između testiranih hibrida i vremena mjerenja (prijepodne i poslijepodne) (Tablica 7 u Prilogu).



Slika 25. Srednje vrijednosti i standardne devijacije ($n = 12$) parametara: (a) apsorpcija po aktivnom reakcijskom središtu (ABS/RC), $LSD = 0,15$; (b) protok uhvaćenih fotona po aktivnom reakcijskom središtu (TR_0/RC), $LSD = 0,08$; (c) elektronski transport po aktivnom reakcijskom središtu (ET_0/RC), $LSD = 0,06$ i (d) rasipanje po aktivnom reakcijskom središtu (DI_0/RC), $LSD = 0,08$, izračunate iz vrijednosti mjerenja na listovima suncokreta tijekom prijepodnevni i poslijepodnevni sati izražene u relativnim jedinicama. Vrijednosti označene istim slovima nisu statistički značajno različite prema LSD testu ($p < 0,05$).

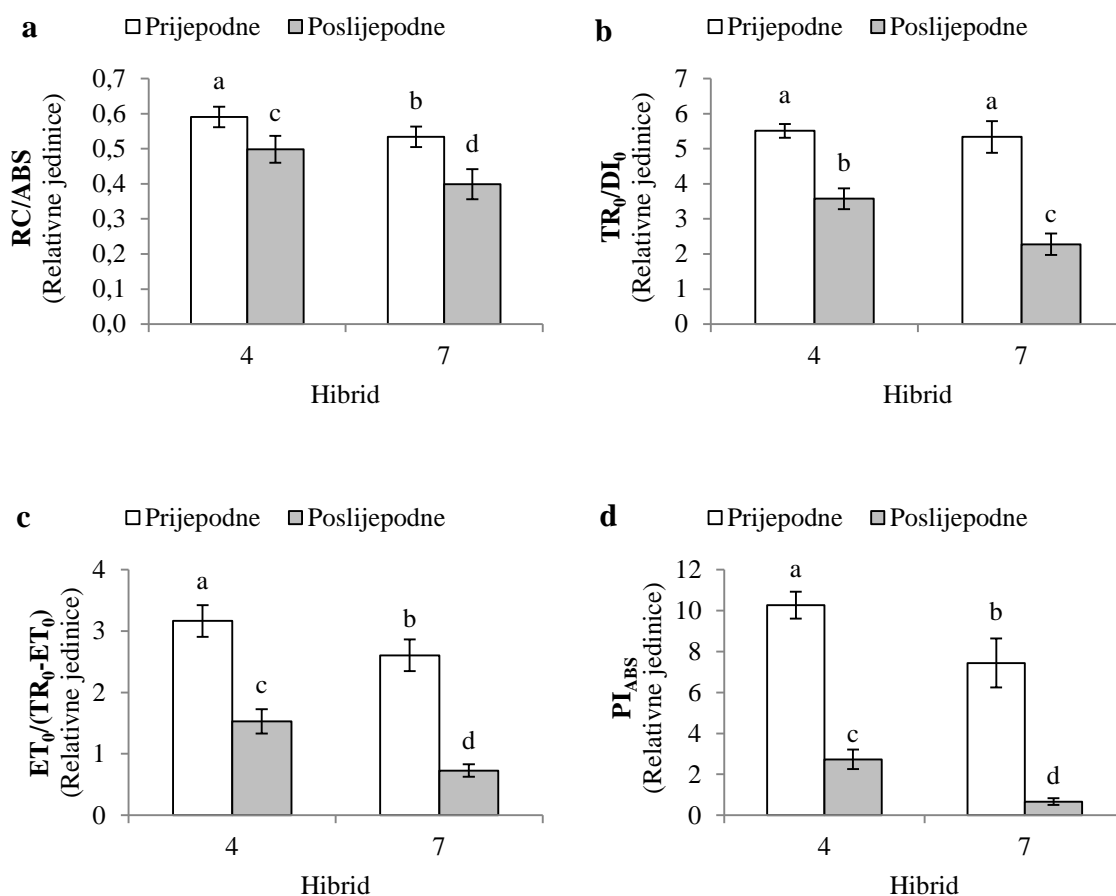
4.12.4. Indeks fotosintetske učinkovitosti i njegove komponente

Srednje vrijednosti i standardne devijacije parametara: omjer koncentracije klorofila reakcijskih središta i koncentracije antena klorofila (RC/ABS), omjer protoka uhvaćenih fotona i rasipanja energije (TR_0/DI_0), transport elektrona dalje od primarnog akceptora Q_A ($ET_0/(TR_0-ET_0)$) i indeks fotosintetske učinkovitosti (PI_{ABS}) izračunate iz dobivenih vrijednosti mjerenja u prijedpodnevnim i poslijepodnevnim satima izražene u relativnim jedinicama prikazane su na Slici 26 a, b, c i d.

Srednje vrijednosti parametra RC/ABS kretale su se u rasponu od 0,40 (hibrid 7 poslijepodne) do 0,59 (hibrid 4 prijedpodne), parametra TR_0/DI_0 u rasponu od 2,28 (hibrid 7 poslijepodne) do 5,51 (hibrid 4 prijedpodne), parametra $ET_0/(TR_0-ET_0)$ u rasponu od 0,73 (hibrid 7 poslijepodne) do 3,16 (hibrid 4 prijedpodne) i parametra PI_{ABS} u rasponu od 0,67 (hibrid 7 poslijepodne) do 10,26 (hibrid 4 prijedpodne) (Tablica 6 u Prilogu).

Rezultati analize varijance i LSD testa pokazali su statistički značajnu razliku ($p < 0,05$) između srednjih vrijednosti hibrida s obzirom na to da su mjerenja prijedpodne i poslijepodne testirana skupno (Slika 26 a, b, c i d). LSD vrijednost parametra RC/ABS iznosila je 0,03, parametra TR_0/DI_0 0,27, parametra $ET_0/(TR_0-ET_0)$ 0,17 i parametra PI_{ABS} 0,60. Značajnu razliku između srednjih vrijednosti mjerenja prijedpodne i poslijepodne pokazala su oba hibrida.

Dvofaktorijskom analizom varijance za parametre RC/ABS i TR_0/DI_0 utvrđene su statistički opravdane razlike ($p < 0,05$) između testiranih hibrida, vremena mjerenja (prijepodne i poslijepodne) i interakcije hibrid \times vrijeme mjerenja, a za parametre $ET_0/(TR_0-ET_0)$ i PI_{ABS} utvrđene su statistički opravdane razlike između testiranih hibrida i vremena mjerenja (prijepodne i poslijepodne) (Tablica 7 u Prilogu).

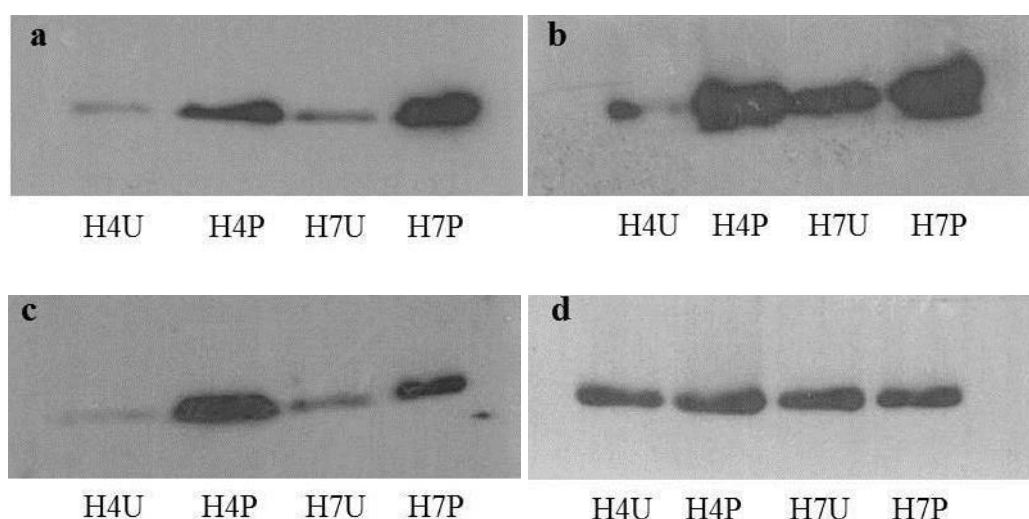


Slika 26. Srednje vrijednosti i standardne devijacije ($n = 12$) parametara: (a) omjer koncentracije klorofila reakcijskih središta i koncentracije antena klorofila (RC/ABS), LSD = 0,03; (b) omjer protoka uhvaćenih fotona i rasipanja energije (TR_0/DI_0), LSD = 0,27; (c) transport elektrona dalje od primarnog akceptora Q_A ($ET_0/(TR_0-ET_0)$), LSD = 0,17 i (d) indeks fotosintetske učinkovitosti (PI_{ABS}), LSD = 0,60, izračunate iz vrijednosti mjerenja na listovima suncokreta tijekom prijepodnevni i poslijepodnevni sati izražene u relativnim jedinicama. Vrijednosti označene istim slovima nisu statistički značajno različite prema LSD testu ($p < 0,05$).

4.13. Relativna akumulacija fotosintetskih proteina Lhcb2, D1, citokroma *f* i Rubisco LSU

Relativna akumulacija fotosintetskih proteina: kompleksa za prikupljanje svjetlosti fotosustava II (Lhcb2), D1, citokroma *f* (Cyt *f*) i velike podjedinice (LSU) enzima Rubisco određena u prijepodnevnim i poslijepodnevnim satima na listovima suncokreta prikazane su na Slici 27 a, b, c i d.

Relativna akumulacija Lhcb2, D1, citokroma *f* i Rubisco LSU proteina varirala je ovisno o hibridu suncokreta. Ispitani hibridi 4 i 7 imali su nižu razinu proteina Lhcb2, D1 i Cyt *f* u prijepodnevnim mjerenjima, u odnosu na razinu proteina u poslijepodnevnim mjerenjima. Relativna akumulacija proteina Rubisco LSU bila je podjednaka kod oba hibrida i vremena mjerenja (prijepodne i poslijepodne). Hibrid 7 je u poslijepodnevnim mjerenjima za fotosintetske proteine Lhcb2 i D1 imao višu razinu proteina, dok je kod hibrida 4 viša bila relativna akumulacija proteina Cyt *f*.



Slika 27. Relativne akumulacija fotosintetskih proteina: (a) kompleksa za prikupljanje svjetlosti fotosustava II (Lhcb2), (b) D1, (c) citokroma *f* (Cyt *f*) i (d) velike podjedinice (LSU) enzima Rubisco u listovima suncokreta za hibrid 4 (H4) i hibrid 7 (H7) određene u prijepodnevnim (U) i popodnevnim (P) satima.

5. RASPRAVA

Istraživanje za potrebu izrade ove doktorske disertacije provedeno je s intencijom pojašnjenja reakcije hibrida suncokreta na utjecaj povišenih temperatura i pojačanog intenziteta svjetlosti za koje je poznato da ometaju rad metabolizma u biljkama i dovode do smanjenja fotosintetske učinkovitosti (Chen i sur., 2017). Utjecaj abiotskih čimbenika koji su izazvali toplinski i svjetlosni stres na testiranim hibridima suncokreta istražen je u fazi cvatnje pomoću relativnog sadržaja vode u listu, razine lipidne peroksidacije, ukupne i specifične aktivnosti gvajakol peroksidaze, koncentracije topljivih proteina, udjela suhe tvari, koncentracije fotosintetskih pigmenata, uroda zrna, parametara fotosinteze i relativne akumulacije fotosintetskih proteina. Cvatnja je odabrana kao kritična generativna faza razvoja suncokreta (Hewezi i sur., 2006, García-López i sur., 2014) jer u toj fazi lisna površina doseže svoj maksimalan razvoj (Gadžo i sur., 2011), što je vrlo bitan kriterij za uvid u fotosintetsku učinkovitost biljaka. Poznavanje specifične reakcije pojedinih genotipova na nepovoljne okolišne uvjete omogućava oplemenjivačima bolji uvid u karakteristike materijala prilikom selekcije što ujedno povećava i uspješnost samog oplemenjivačkog programa. Budući da različiti abiotski čimbenici utječu na svojstvenu prilagodbu biljaka na određene uvjete kroz molekularne, biokemijske i fiziološke procese ovisno o stresoru za sada je razjašnjen utjecaj pojedinog stresa, ali utjecaji stresora u kombinaciji nisu još uvijek dovoljno dobro razjašnjeni zbog čega istraživanja kao što je ovo mogu značajno doprinijeti unaprjeđenju budućih hibrida suncokreta.

5.1. Utjecaj toplinskog i svjetlosnog stresa na parametre utvrđene laboratorijskim metodama

Abiotski čimbenici stresa, osim što izazivaju nastanak vizualnih oštećenja na biljkama, utječu i na morfološke i fiziološke promjene u biljkama (Potters i sur., 2009, Leung, 2015) pri čemu djeluju na rast, razvoj, distribuciju i produktivnost biljaka (Rajeevkumar i sur., 2015). Slijedom toga, dokazano je da su abiotski čimbenici mogući uzročnici stresa na biljkama zbog kojih nastaju oštećenja membranskih sustava biljaka koja pritom vode do poremećaja metabolizma kojeg izaziva povećana proizvodnja reaktivnih kisikovih jedinki (ROS) uslijed nedostatka ili suviška dostupne vode u tlu, onečišćenja tla teškim metalima, suviška soli u tlu, niskih ili visokih temperatura, niskog ili visokog intenziteta svjetlosti itd. (Vukadinović i sur., 2014, Rajeevkumar i sur., 2015). Molekule ROS-ova imaju bitnu ulogu kao signalne molekule koje sudjeluju u regulaciji bioloških procesa poput rasta, razvoja te odgovora biljnih organizama na biotske ili abiotske čimbenike okoline (Mittler i sur., 2011). ROS-ovi su uzročnici oksidacijskog stresa u biljkama pri čemu imaju toksično djelovanje na njih, a uključuju: superoksidni radikal ($O_2^{\bullet-}$), hidroksilni radikal (OH^{\bullet}), alkoksilni radikal (RO^{\bullet}) i peroksidni radikal (ROO^{\bullet}), te molekule kao što su vodikov peroksid (H_2O_2), singlet kisik (1O_2), ozon (O_3) i hipoklorastu kiselinu ($HClO$) (Corpas i sur., 2015). Nekontrolirano nakupljanje ROS-ova uzrokuje lipidnu peroksidaciju membranskih lipida, inaktivaciju proteina, oksidaciju ugljikohidrata, DNA i RNA, te negativno utječe na aktivnost enzima (Noctor i Foyer, 1998, Mendoza, 2011). U blizini

mjesta proizvodnje ROS-ova u biljnim stanicama smješteni su brojni enzimatski i neenzimatski antioksidacijski obrambeni sustavi čija je uloga onemogućavanje nastanka negativnih učinaka ROS-ova i moduliranja njihove signalne uloge kako bi održali unutarstanično redoks stanje homeostaze (Alscher i sur., 2002, Fang i Xiong, 2015). Međutim, stanična ravnoteža između proizvodnje i uklanjanja ROS-ova može se znatno narušiti uslijed djelovanja nepovoljnih okolišnih čimbenika zbog kojih ROS-ovi prevladavaju obrambene barijere te izazivaju oksidacijsko oštećenje sa smrtonosnim posljedicama za biljku (Corpas i sur., 2015).

U ovom istraživanju potvrđeno je djelovanje abiotskih stresova na biljkama suncokreta uzrokovanih povišenim temperaturama i suviškom svjetlosti. Evaluacija hibrida temeljem rezultata laboratorijskih analiza ukazala je na to da među njima postoje statistički značajne razlike. Također su potvrđene i statistički značajne razlike između vremena mjerenja (mjerenja tijekom prijepodnevnih sati predstavljali su uvjete bez djelovanja stresa, a tijekom poslijepodnevnih sati uvjete pod djelovanjem stresa na biljke) osim u slučaju parametra razina lipidne peroksidacije i koncentracija topljivih proteina (Tablica 5 u Prilogu).

Fiziološki parametar relativni sadržaj vode (RWC) u listu je jedna od korištenih metoda u ovom istraživanju jer se smatra brzom i jeftinom laboratorijskom metodom koju su oplemenjivači uvrstili u svoje oplemenjivačke programe kao tehniku pomoću koje procjenjuju genotipove s potencijalom tolerancije ili osjetljivosti na sušne uvjete uzgoja kultura (Condon i sur., 2004, Silva i sur., 2007). RWC, uz vodni potencijal i njegove komponente (osmotski i turgor potencijal), jedan je od najčešće korištenih metoda za određivanje statusa vode u biljkama (Tezara i sur., 2002, Poormohammad Kiani i sur., 2007a). Iako se određivanje RWC-a u listovima velikim dijelom koristi za dokazivanje nastanka sušnog stresa u biljkama (Viljevac i sur., 2013, Chowdhury i sur., 2017, Zaman i sur., 2018, Shu-han i sur., 2018), taj isti parametar korišten je i u ovom istraživanju s obzirom na činjenicu da visoke temperature uz intenzivnu svjetlost direktno utječu na dostupnu količinu vode u tlu (Aker i Islam, 2017) koja je biljkama neophodna za njihov rast i razvoj te pravilno funkcioniranje mehanizama jer ukazuje na razinu hidratacije stanice i tkiva (Silva i sur., 2007). S obzirom na to da je suncokret ratarska kultura koja ima djelomičnu mogućnost sprječavanja nastanka stresa zbog korijenskog sustava koji prodire u dublje slojeve tla kako bi dopro do podzemnih voda o kojima ovisi razina transpiracije lista (García-López i sur., 2014), ovaj parametar korišten je i u svrhu istraživanja utjecaja povišenih temperatura i suviška svjetlosti na vodni status u biljkama. RWC je za hibride suncokreta kod kojih je potvrđen utjecaj toplinskog i svjetlosnog stresa bio niži u odnosu na vrijednosti RWC-a hibrida koji su pokazali bolju otpornost na stresore (Slika 5). Takvu različitu reakciju hibrida na okolišne uvjete s gledišta RWC-a potvrdili su i Sairam i sur. (2003) u istraživanju provedenom tijekom faze zriobe suncokreta. U navedenom istraživanju potvrđeno je da RWC uvelike ovisi o pozicioniranosti lista na stabljici biljke te da viši RWC imaju listovi pri vrhu stabljike, dok su u donjim etažama listova vrijednosti niže. Također su brojna istraživanja potvrdila pad RWC-a prilikom

djelovanja deficita vode (Andrade i sur., 2017, Akram i sur., 2018, Chowdhury i sur., 2017, Zaman i sur., 2018, Shu-han i sur., 2018). Ipak, prema Gunes i sur. (2008) RWC vrijednosti kod većine genotipova suncokreta prilikom sušnih uvjeta uzgoja mogu se povisiti dodavanjem silicija u tlo.

Kao potvrdu za nastanak oksidacijskog stresa u biljkama, uz RWC, često se koristi i metoda određivanja razine lipidne peroksidacije, odnosno produkcije njezinog produkta MDA (Göbel i sur., 2009) koji se izražava kao supstanca koja reagira s tiobarbiturnom kiselinom i često se označava kao TBARS (reaktivne supstance tiobarbiturne kiseline), te se upravo TBARS smatra indikatorom slobodnih radikala u stanicama (Nair i sur., 2008). Peroksidaciju lipida uzrokuje povećana produkcija ROS-ova u uvjetima stresa (Gunes i sur., 2008, Kaya, 2017, Farid i sur., 2017). U stresnim uvjetima peroksidaciju lipida utvrdili su Gunes i sur. (2008) u istraživanju utjecaja silicija na suncokret u sušnim uvjetima što je dovelo do rasta vrijednosti koncentracije MDA. Također povećanje koncentracije MDA u suncokretu potvrdili su Akram i sur. (2012) u uvjetima solnog stresa, Farid i sur. (2017) u uvjetima stresa izazvanog povećanjem koncentracije kroma u tlu, Kaya i Yiğit (2014) u uvjetima stresa uzrokovanog herbicidima, dok su povećanje koncentracije MDA u uljanoj repici tijekom stresa izazvanog sušom utvrdili Akram i sur. (2018). Prilikom testiranja posljedica stresa uzrokovanog herbicidima, Kaya (2017) utvrdio je kako biljke suncokreta koje su bile izložene 50 mM NaCl i pendimetalinu (herbicidu) u različitim koncentracijama izazivaju povećanje koncentracije MDA, za razliku od smanjivanja koncentracija MDA u tretmanu s askorbinskom kiselinom što dovodi do zaključka da askorbinska kiselina smanjuje negativne učinke stresa. Iako je u mnogim istraživanjima potvrđen rast razine lipidne peroksidacije u uvjetima stresa, u ovom istraživanju toplinski i svjetlosni stres nisu utjecali na vrijednosti koncentracije produkata lipidne peroksidacije, odnosno kod pojedinih hibrida suncokreta došlo je do povećanja koncentracije TBARS-a (Slika 6) pri čemu razlike između vremena mjerenja (prijepodnevi i poslijepodnevi sati), nisu bile statistički značajne, ali razlike između hibrida suncokreta unutar pojedinog vremena mjerenja jesu (Tablica 5 u Prilogu). Jedan od razloga zašto u ovom istraživanju nije došlo do statistički značajnog utjecaja toplinskog i svjetlosnog stresa na hibridima suncokreta možda počiva u činjenici da su testiranja vršena na mladim listovima biljke koji su u odnosu na starije listove bolje zaštićeni od oksidacijskih oštećenja preko antioksidacijskih sustava zaštite što su Gür i sur. (2010) potvrdili u svom istraživanju. Provedenim istraživanjem na listovima smokve, Mlinarić i sur. (2016) su istražili utjecaj visoke temperature i suviška svjetlosti na mladim, odnosno starim listovima. Utvrdili su da se koncentracija TBARS-a na starim listovima povećala za 13,3 %, dok je na mladim listovima koncentracija ostala nepromijenjena. S druge strane, postoji mogućnost da su antioksidacijski enzimi reagirali pri samom početku nastanka stresa te na vrijeme otklonili produkte reaktivnih kisikovih jedinki i spriječili oksidacijsko oštećenja na biljkama.

Nadalje, ispitano je djelovanje ukupne aktivnosti enzima gvajakol peroksidaze (GPOD) koji pripada enzimatском antioksidacijskom sustavu zaštite čija je zadaća smanjivanje

mogućnosti nastanka oksidacijskih oštećenja u biljnom organizmu koji uvelike ovisi o biljnoj vrsti i o uzročniku stresa (Milone i sur., 2003). Peroksidaze te vrste su s jedne strane vrlo bitne zbog sudjelovanja u brojnim staničnim procesima tijekom razvoja biljaka, dok su s druge strane uključene u odgovore biljaka na stresne okolišne činitelje (Passardi i sur., 2005). Općenito, povećanje ukupne aktivnosti enzima GPOD kod biljaka koje su pod stresom dokazano je u brojnim istraživanjima (Ali i sur., 2005, Mlinarić i sur., 2016, Farid i sur., 2017, Jovičić i sur., 2017, Saidi i sur., 2017), ali to nije bio slučaj u ovom istraživanju jer je ukupna aktivnost enzima GPOD u poslijepodnevnim satima (toplinski i svjetlosni stres) bila snižena (Slika 7). Jedan od mogućih razloga za ovakve rezultate je prisustvo visokih koncentracija H_2O_2 . Iako je GPOD uz enzim katalazu najvažniji enzim koji regulira unutarstaničnu razinu H_2O_2 , smatra se da su peroksidaze odgovorne za uklanjanje nižih koncentracija H_2O_2 , a aktivnost katalaze je primijećena u slučaju relativno visokih koncentracija H_2O_2 (Gadjev i sur., 2008). Dakle, postoji mogućnost da su u ovom istraživanju drugi enzimi antioksidacijskog sustava odradili svoju funkciju razgradnje ROS-ova. Drugi mogući razlog je prisustvo visokih količina osvjetljenja koje prema Lu i sur. (2007) mogu smanjiti kapacitet peroksidaznog uklanjanja H_2O_2 , iako enzim GPOD, u odnosu na katalazu učinkovitije uklanja ROS-ove jer posjeduje veći afinitet za H_2O_2 (Gill i Tuteja, 2010). Izostanak očekivane reakcije aktivnosti GPOD-a kod suncokreta utvrdili su i Farid i sur. (2017) u čijem je istraživanju antioksidacijski sustav normalno funkcionirao u svim varijantama zagađenosti tla kromom (0, 5, 10 i 20 mg/kg). S jedne strane, pri zagađenosti tla s 5 i 10 mg/kg kroma došlo je do povećanja aktivnosti GPOD enzima u odnosu na kontrolu, dok je s druge strane, zagađenje tla s 20 mg/kg kroma izazvalo smanjenu aktivnost GPOD enzima. Pad aktivnosti GPOD-a na uljanoj repici utvrdili su Jovičić i sur. (2017) u uvjetima solnog stresa. Suprotno tim rezultatima, Saidi i sur. (2017) su u uvjetima uzgoja suncokreta u različitim koncentracijama salicilne kiseline te pod utjecajem arsena utvrdili povećanje aktivnosti GPOD i drugih enzima. Povećana aktivnost GPOD-a utvrđena je i na klijancima pšenice kao rezultat djelovanja povišenih temperatura (Gupta i sur., 2013). Isti slučaj je bio i na korijenu i izdancima klijanaca pšenice pri povećanim koncentracijama $Pb(NO_3)_2$, pri čemu je aktivnost GPOD-a pratila tendenciju povećanja koncentracije $Pb(NO_3)_2$. Naprotiv, u slučaju tretmana sa $CdCl_2$, koncentracija GPOD-a kod klijanaca pšenice starih sedam dana snižavala se s povećanjem koncentracije $CdCl_2$, dok je na izdancima rasla (Day i sur., 2007). Iz navedenog možemo zaključiti kako je još jedan mogući razlog zbog čega značajno povećanje koncentracije TBARS-a u ovom istraživanju nije potvrđeno može biti to što se antioksidacijski sustav zaštite biljke razvija vrlo rano tijekom razvoja lista što su potvrdili Sairam i sur. (2003). Oni su proveli istraživanje na genotipovima suncokreta u fazi butonizacije i fazi nalijevanja zrna te utvrdili kako se ukupna aktivnost enzima GPOD povećava od prvog do 15. lista u fazi butonizacije, odnosno do 13. lista u fazi nalijevanja zrna. Obje faze je karakterizirala snižena aktivnost GPOD-a od prvog do devetog lista nakon čega se aktivnost povećala idući prema donjim etažama listova.

Pored sniženih ukupnih aktivnosti GPOD-a, u ovom istraživanju dokazan je i pad vrijednosti specifičnih aktivnosti GPOD-a na svim hibridima suncokreta tijekom

toplinskog i svjetlosnog stresa (Slika 8). Iako se specifična aktivnosti GPOD izražava po jedinici mase proteina i moguća je pojava nešto drugačijih rezultata u odnosu na ukupnu aktivnost GPOD-a, to se nije dogodilo. U do sada provedenim istraživanjima pokazalo se kako se specifična aktivnost antioksidacijskog enzima GPOD povećava pri tretiranju kultivara ječma s različitim koncentracijama mangana i bakra (Demirevska-Kepova i sur., 2002), što su potvrdili i Teklić i sur. (2008) u istraživanju utjecaja bakra na zelenu salatu (*Lactuca sativa*). Suprotno tim istraživanjima, Egert i Tevini (2002) su na vlasu (*Allium schoenprasum*) tijekom utjecaja suše utvrdili da nema statističkih značajnih razlika između kontrole i suše u vrijednostima specifične aktivnosti GPOD-a, TBARS-a, topljivih proteina, koncentracije ukupnih klorofila i koncentracije karotenoida.

Ispitivanjem koncentracija udjela topljivih proteina u svježoj tvari u poslijepodnevnim satima (toplinski i svjetlosni stres) u odnosu na prijedodne sate nisu ustanovljene statističke značajne razlike između hibrida suncokreta. S obzirom na to, rezultati za hibride se nisu međusobno razlikovali prema LSD testu osim u slučaju kod hibrida 4 koji je jedini pokazao razliku između mjerenja prijedodne i poslijepodne, uzrokujući smanjenje koncentracije topljivih proteina u stresnim uvjetima što je vidljivo iz Slike 9. Budući da je koncentracija topljivih proteina sklona promjenama zbog utjecaja širokog raspona stresnih čimbenika, ona se smatra važnim pokazateljem ireverzibilnih i reverzibilnih promjena u metabolizmu (Doganlar i Atmaca, 2011). Razgradnja proteina u biljkama je prisutna u mnogim razvojnim fazama, primjerice u germinaciji, morfogenezi, diferencijaciji i senescenciji. Promjene u koncentraciji proteina mogu nastati zbog oštećenja membrana čime se povećava njezina propusnost i dolazi do gubitka postojećih proteina te zbog oštećenja nukleinskih kiselina stvaranjem lezija čime se sprječava sinteza novih proteina. Međutim, na koncentraciju topljivih proteina utječe i sadržaj kemijskih elemenata u tlu pri čemu brojni metali zbog stvaranja kompleksa s aminokiselinama mijenjaju njihovu strukturu te narušavaju proces sinteze proteina (Emamverdian i sur., 2015). Smanjena normalna metabolička aktivnost, odnosno niske koncentracije proteina pokazatelj su utjecaja nepovoljnih uvjeta na biljku (Bonjoch i Tamayo, 2001).

Uz koncentraciju proteina, udio suhe tvari u listovima biljaka također je jedan od indikatora stresa koji je ispitan u ovom istraživanju. Jedna polovina testiranih hibrida suncokreta reagirala je sa sniženjem udjela suhe tvari, a druga polovina je reagirala s povećanjem udjela suhe tvari u tkivu listova suncokreta tijekom djelovanja povišenih temperatura i suviška svjetlosti (Slika 10). U istraživanju Gunes i sur. (2008) zabilježeno je značajno smanjenje udjela suhe tvari u korijenu i stabljici biljaka suncokreta u stresu izazvanom sušom, pri čemu je primjena silicija ublažila negativne učinke sušnog stresa na polovici testiranih genotipova suncokreta. Također, prema Hattori i sur. (2005) primjena silicija u uvjetima stresa izazvanog sušom izaziva pojačanu proizvodnju suhe tvari u biljkama sirka metlaša (*Sorghum bicolor*).

Nadalje, o abiotskim čimbenicima ovise i koncentracije klorofila i karotenoida u biljkama koji svojom reakcijom na trenutačne uvjete imaju sposobnost ograničiti aktivnost

fotosinteze, odnosno uzrokovati promjene u fotosintetskoj učinkovitosti biljaka. Svaki zeleni dio biljke bogat je klorofilima i karotenoidima koji predstavljaju centralni dio energetskog sustava svake biljke. Bilo kakve značajne promjene u okolini dovest će do poremećaja njihove prvotne funkcije što se može negativno odraziti na cijeli metabolizam biljke (Agrawal i Mishra, 2009). Biljke se s obzirom na uvjete u kojima se nalaze prilagođavaju na količinu dostupne svjetlosti mijenjajući pritom gustoću kloroplasta i koncentraciju klorofila (Wang i sur., 2007). U ovom eksperimentu povišene temperature i suvišak svjetlosti su prouzročili porast koncentracija klorofila *a* (Chl *a*), klorofila *b* (Chl *b*) i ukupnih klorofila (Chl *a+b*) kod većine hibrida suncokreta (Slika 11, 12 i 13) što ukazuje na prilagodbu kompleksa za prikupljanje svjetlosti (LHC) na stresne uvjete uzgoja biljaka. Efeoglu i Terzioglu (2009) su ustanovili da se koncentracija klorofila *a* i ukupnih klorofila na kultivarima pšenice izloženim temperaturi od 37°C tijekom osam sati nije promijenila, dok se kod kultivara izloženih temperaturi od 45°C u trajanju od osam sati povećala. Do promjena u koncentraciji klorofila *b* i ukupnih karotenoida nije došlo bez obzira na temperaturu. Vodeći se tim rezultatima te uzimajući u obzir činjenicu da je prosječna vrijednost temperature tijekom uzorkovanja tkiva suncokreta za potrebe ovog istraživanja iznosila oko 35°C može se primijetiti da se povećanje koncentracija pigmenata kod suncokreta, u odnosu na pšenicu, događa pri nižim temperaturama. O povećanju koncentracija klorofila *a* i *b* te ukupnih klorofila *a* i *b* tijekom toplinskog stresa izvijestili su Feng i sur. (2014) na pšenici te Lepeduš i sur. (2017) na kotiledonima suncokreta. Istražujući korelaciju količine Sunčevog zračenja s koncentracijom i omjerom klorofila, Beisel (2010) je dokazao kako niža količina svjetlosti povisuje koncentraciju klorofila *a* i *b* na razvijenim listovima što je rezultiralo s optimalnom razinom fotosinteze, iako se smatra kako ograničena količina svjetlosti rezultira niskom koncentracijom klorofila te niskom razinom apsorpcije svjetlosti (Gu i sur., 2017). Do smanjenja kloroplastnih pigmenata *a*, *b*, ukupnih klorofila i karotenoida pri smanjenom intenzitetu svjetlosti dolazi zbog inhibicije određenih enzima koji sudjeluju u sintezi klorofila (Prasad i sur., 2005). Također, Gupta i sur. (2013) su zaključili kako do smanjenja koncentracije klorofila dolazi i uslijed bilo kakvog oštećenja tilakoidne membrane uzrokovanog povišenim temperaturama što su i potvrdili na klijancima pšenice. Smanjenu koncentraciju klorofila kao odgovor na toplinski stres potvrdili su Kumar i sur. (1998) na krastavcu te Efeoglu i Terzioglu (2009) na pšenici. Ujedno, Chen i sur. (2017) su potvrdili pad koncentracije ukupnih klorofila u uvjetima kombiniranog toplinskog i svjetlosnog stresa.

U ovom istraživanju, kod većine hibrida suncokreta utvrđene su i povišene koncentracije ukupnih karotenoida (Car) kao rezultat djelovanja toplinskog i svjetlosnog stresa (Slika 14). S druge strane, značajna redukcija ukupnih karotenoida može se direktno odraziti na smanjenje fotosintetske učinkovitosti biljke jer karotenoidi štite klorofile od fotooksidacijske destrukcije (Prasad i sur., 2005). Karotenoidi u biljkama uz prvotnu funkciju apsorpcije svjetlosne energije i njezinom prenošenju na klorofil *a* sudjeluju i u zaštitnoj ulozi od oštećenja koja mogu nastati uslijed intenzivnog osvjetljenja (Pevalek-Kozlina, 2003). Oni su neenzimatski čistači ROS-ova koji disipacijom viška energije štite fotosintetski aparat tijekom svjetlosnog stresa (Gill i Tuteja, 2010), a ujedno imaju i

sposobnost spriječiti lipidnu peroksidaciju jer uklanjaju peroksi radikale puno učinkovitije nego ostale ROS-e jer s njima najčešće reagiraju (Stahl i Sies, 2003). Prema tome, povišene koncentracije ukupnih karotenoida u stresnim uvjetima utvrđene u ovom istraživanju ukazuju na pokretanje fotoprotektivnog obrambenog mehanizma biljaka sa svrhom izbjegavanja fotooksidacije. Ovo je dodatno potvrđeno smanjenjem omjera Chl $a/b+Car$ koji je prikazan na Slici 16.

Nadalje, povišene temperature i suvišak svjetlosti su rezultirali redukcijom vrijednosti omjera koncentracija klorofila a i b (Chl a/b) na svim testiranim hibridima, osim na hibridu 5 (Slika 15), a omjer koncentracija klorofila a i b i karotenoida (Chl $a+b/Car$) se u tim uvjetima smanjio samo kod pojedinih hibrida suncokreta (Slika 16). Omjer koncentracija klorofila a i b se smatra vrlo bitnim indirektnim pokazateljem fotosintetske učinkovitosti pomoću kojeg se dobiva uvid u kompleks za prikupljanje svjetlosti fotosustava II (LHCII) (Răuciu i Creanga, 2007) jer se upravo u LHCII nalazi skoro sva koncentracija klorofila b i polovina ukupnih klorofila $a+b$ zbog čega promjene u omjeru Chl a/b direktno utječu na akumulaciju LHCII (Oguchi i sur., 2003). Iz navedenog se može potvrditi da su u ovom eksperimentu utvrđeni niži omjeri Chl a/b prilikom povećane akumulacije proteina kompleksa za prikupljanje svjetlosti fotosustava II – Lhcb2 (Slika 27 a). Također, utvrđena je i statistički značajna razlika za koncentracije i omjere pigmenata između hibrida pri čemu su za hibrid 7 ustanovljene niže koncentracije klorofila a , ukupnih klorofila, ukupnih karotenoida te omjera klorofila i karotenoida u odnosu na druge hibride, što potvrđuje različitu razgradnju klorofila i različitu sposobnost hibrida za apsorpciju svjetlosti. Feng i sur. (2014) su pri izlaganju kultivara pšenice toplinskom stresu utvrdili smanjenje koncentracija klorofila a i b , ukupnih klorofila i karotenoida te omjera klorofila a/b . Osim toplinskog i svjetlosnog stresa dokazano je kako i stres izazvan teškim metalima utječe na stimulaciju ili redukciju biosinteze klorofila (Aggarwal i sur., 2012) što su Farid i sur. (2017) potvrdili na hibridima suncokreta uzgojenim u vegetacijskim posudama. Naime, utvrdili su značajno smanjenje koncentracije klorofila a i klorofila b , ukupnih klorofila i karotenoida u svim varijantama uzgoja suncokreta u tlu kontaminiranim s kromom (0, 5, 10 i 20 mg/kg kroma) pri čemu je potvrđena manja redukcija pigmenata kod tolerantnijeg hibrida suncokreta.

5.2. Fotosintetska učinkovitost tijekom utjecaja toplinskog i svjetlosnog stresa

Biljke svjetlosnu energiju apsorbiraju molekulama klorofila te ju dalje koriste za procese fotosinteze, dio se disipira u obliku topline, a dio se disipira u obliku fotona što predstavlja fluorescenciju klorofila *a*. Sva tri načina su međusobno povezana i ovisna jedan o drugom (Maxwell i Johnson, 2000). Fotosinteza je iznimno toplinski i svjetlosno osjetljiva i ti ju faktori mogu potpuno inhibirati. Inhibicijom aktivnosti fotosustava II dolazi do smanjenja fotosintetske učinkovitosti. Ujedno fotosustav II je najlabilnija komponenta fotosintetskog lanca transporta elektrona na toplinu (Camejo i sur., 2005). Metodu fluorescencije klorofila *a* brojni istraživači zbog svoje jednostavnosti i brzine koriste kao biomarker i bioindikator prilikom selekcije materijala za detekciju genotipova tolerantnih na neke od brojnih uzroka koji izazivaju stres. Također, kako je fotosintetska učinkovitost u visokoj korelaciji s urodom (Li i sur., 2006, Kalaji i Guo, 2008), ova metoda može poslužiti za indirektnu selekciju visokoprinosnih samooplodnih i stranooplodnih kultura.

Toplinski i svjetlosni stres su u učinkovitosti fotosintetskog aparata hibrida 4 i 7 u poslijepodnevnom satima, kada je prosječna temperatura zraka iznosila 34,64°C, a prosječan intenzitet Sunčevog zračenja 837,84 W/m², uzrokovali promjene u odnosu na mjerenja tijekom prijepodnevnih sati (prosječna temperatura zraka i intenzitet Sunčevog zračenja su iznosile 22,52°C, odnosno 349,06 W/m²), što je vidljivo iz OJIP koraka na krivuljama fluorescencije klorofila *a* prikazanim na Slikama 21 i 22. OJIP krivulje su korištene za utvrđivanje svojstava transporta elektrona te pri evaluaciji fotokemijskog kvantnog prinosa fotosustava II. Analiziranje fluorescencije pomoću OJIP krivulja našlo je široku primjenu prilikom praćenja učinaka brojnih biotskih i abiotskih uzročnika stresova koji mijenjaju status i funkciju fotokemijskog aparata (Strasser i sur., 2004, 2010).

Prije mjerenja porasta fluorescencije klorofila *a*, uzorci se podvrgavaju uvjetima tame prilikom čega nema elektronskog toka u fotosintetskom lancu transporta elektrona i oksidacije vode u fotosustavu II zbog toga što dolazi do oksidiranog stanja akceptora elektrona fotosustava II. Otvaraju se sva reakcijska središta fotosustava II pri čemu je intenzitet fluorescencije minimalan (F_0). Razina F_0 se primjećuje samo kada je prvi stabilni akceptor elektrona iz fotosustava II nazvan Q_A potpuno oksidiran (Kalaji i Guo, 2008). Osvjetljenje fotosintetskog uzorka s jakim intenzitetom svjetlosti posjeduje mogućnost uzbuditi sve molekule pigmenta u pigment-protein kompleksu tilakoidne membrane nakon čega neposredno dolazi do brzog prijenosa elektrona. Taj proces se obilježava kao O-J porast koji se odvija unutar 2 ms i prikazuje fotokemijsku fazu koja je rezultat redukcije primarnog akceptora Q_A . Trenutni maksimum reduciranog Q_A zabilježen je na J koraku, a na I koraku daljnja redukcija Q_A i Q_B . Iza O-J porasta nastaju termalne polagane faze J-I i I-P koje predstavljaju nefotokemijsku fazu (Strauss i sur., 2006). J-I porast karakterizira nastanak Q_B^- i Q_B^{2-} , a I-P porast zbog oksidacije ukupnog plastokinona izaziva postepeno gašenje fluorescencije klorofila *a* (Strasser i sur., 2004). Slijedi zatvaranje svih reakcijskih središta fotosustava II i maksimalne akumulacije Q_A^- , Q_B^{2-} i PQH_2 (plastohidrokinon) što

se postiže unutar intervala od 200 ms do 1 s i naziva se F_m ili P korak (Govindjee, 2004, Schansker i sur., 2005). Sve navedene faze prikazane su na Slikama 21, 22 i 23.

Parametri OJIP porasta fluorescencije klorofila *a* korišteni za potrebe ovog istraživanja su minimalni intenzitet fluorescencije (F_0 ili korak O), maksimalni intenzitet fluorescencije (F_m ili korak P), varijabilna fluorescencija na J koraku (V_J) i varijabilna fluorescencija na I koraku (V_I) (Slika 23 a, b, c i d). Prema dvofaktorijalnoj analizi varijance i LSD testu potvrđena je statistički značajna razlika između hibrida, vremena mjerenja (prijepodne i poslijepodne) i interakcije hibrid \times vrijeme mjerenja za parametre F_0 , F_m i V_J , za razliku od parametra V_I za koji je potvrđena statistički opravdana razlika samo između hibrida (Tablica 7 u Prilogu) zbog čega se može pretpostaviti da toplinski i svjetlosni stres na taj parametar nisu djelovali. S obzirom na to da se OJIP krivulje koriste za detekciju stresa, na nativnim OJIP krivuljama (Slika 22) u koraku O tijekom toplinskog i svjetlosnog stresa uočen je rast vrijednosti na oba hibrida. Budući da se početni, odnosno minimalni intenzitet fluorescencije (F_0) mjeri na uzorcima podvrgnutim uvjetima tame kada su sva reakcijska središta otvorena, a plastokinoni reducirani, u ovom eksperimentu došlo je do naglog rasta vrijednosti F_0 na hibridima suncokreta izloženima toplinskom i svjetlosnom stresu što ukazuje na inaktivaciju fotosustava II i dezorganizaciju tilakoida pri povišenim temperaturama (Havaux, 1993.). Toplinski stres povećava vrijednosti parametra F_0 zbog čega se on smatra indikatorom fotoinhibicije u tim uvjetima (Gamon i Pearcy, 1990), te se može koristiti pri određivanju tolerancije biljaka na toplinski stres jer je povećanje F_0 izravno povezano s temperaturom okoline (Efeoglu i Terzioglu, 2009, Feng i sur., 2014). Ujedno, povećanje vrijednosti parametra F_0 najvjerojatnije nastaje zbog odvajanja povećanog broja funkcionalnih molekula klorofila od reakcijskog središta fotosustava II (Demmig i sur., 1987), ali i zatvaranja reakcijskih središta zbog pomaka u redoks ravnoteži fotosustava II (Havaux i sur., 1988, Pastanes i Horton, 1999). Hibrid 4 je rezultirao s manjom razlikom u povećanju F_0 vrijednosti tijekom toplinskog i svjetlosnog stresa u odnosu na prijednevna mjerenja zbog čega se može smatrati manje osjetljivim hibridom na te uvjete (Slika 23 a). Također, razlika se kod testiranih hibrida s obzirom na vrijeme mjerenja primjećuje u koraku P u kojem su se vrijednosti u poslijepodnevnom satima smanjile. Pri maksimalnom intenzitetu fluorescencije (F_m) nastaje inhibicija kompleksa koji katalizira oksidaciju vode (OEC) uzrokovana toplinskim (Lazár, 1999) i svjetlosnim (Earl i Ennahli, 2004) stresom što je potvrđeno i u ovom istraživanju jer su stresori uzrokovali pad vrijednosti F_m na oba hibrida suncokreta. Niže vrijednosti F_m su zabilježene kod hibrida 7 kako u prijednevnom tako i u poslijepodnevnom mjerenju (Slika 23 b). Snižene vrijednosti F_m mogu biti rezultat strukturnih promjena fotosustava II što dovodi do smanjenja fotokemije fotosustava II, povećanog propadanja ekscitacijske energije u obliku fluorescencije te povećanja propadanja uzrokovanog prestankom zračenja ili prijenosa ekscitacijske energije u korist fotosustava I (Mishra i Singhal, 1992). Normalizirane OJIP krivulje (Slika 21) prikazuju značajno odstupanje na J koraku tijekom stresa uzrokovanog povišenim temperaturama i suviškom svjetlosti kada su porasle vrijednosti hibrida 4 i 7 u poslijepodnevnom mjerenju, ali su se promijene jače odrazile na hibrid 7. Varijabilna fluorescencija na J koraku (V_J) je prema Strasser i sur. (2004) opisana kao vjerojatnost s

kojom uhvaćeni eksciton pomiče elektron u lanac transporta elektrona dalje od primarnog akceptora Q_A , odnosno određen je redoksnim stanjem Q_A , prvim kinonskim akceptorom fotosustava II (Duysens i Sweers, 1963, Stirbet i Govindjee, 2011). Budući da su u toplinskom i svjetlosnom stresu vrijednosti V_J (Slika 23 c) kod oba testirana hibrida porasle (hibrid 4 za oko 67 %, a hibrid 7 za oko 107 %) reoksidacija Q_A je bila ograničena pri čemu se reducirani Q_A akumulira što se odražava na smanjenje elektronskog transporta (Strasser i sur., 2004). Pri analiziranju varijabilne fluorescencije na I koraku (V_I) dokazano je da se hibridi 4 i 7 statistički značajno razlikuju, ali da ne postoje značajne razlike između vremena mjerenja (prijepodne/poslijepodne) bez obzira na nastali stres (Tablica 7 u Prilogu). U poslijepodnevnom mjerenjima hibridi su pokazali izuzetno slične rezultate prijedpodne mjerenjima (Slika 23 d). Utjecaj abiotičkih čimbenika kao uzročnika stresa, uočen u ovom eksperimentu na parametrima F_0 , F_m , V_J i V_I potvrđen je i u istraživanjima Brestic i sur. (2012) i Feng i sur. (2014) na pšenici.

Kao što je ranije dokazano u brojnim znanstvenim radovima, biljke se prilagođavaju na stresnu okolinu snižavajući vrijednosti maksimalnog kvantnog prinosa fotosustava II (F_v/F_m ili TR_0/ABS) što se primjećuje i pri povišenim temperaturama te suvišku svjetlosti kod hibrida suncokreta (Slika 17 i 24) kroz potvrđene statistički značajne razlike između hibrida, vremena mjerenja (prijepodne i poslijepodne) i interakcije hibrid \times vrijeme mjerenja (Tablica 7 u Prilogu). F_v/F_m opisuje učinkovitost primarne fotokemije fotosustava II, a dobije se iz vrijednosti parametara F_0 i F_m , odnosno minimalnog i maksimalnog intenziteta fluorescencije (Strasser i sur., 2000). U prijedpodne mjerenjima (uvjeti bez stresa) između hibrida suncokreta nije zabilježena statistički značajna razlika prema LSD testu za vrijednosti parametra F_v/F_m što je prikazano na Slici 17 gdje je ispitano svih osam hibrida i na Slici 24 na kojoj su prikazana samo dva odabrana hibrida. Naprotiv tim rezultatima, potvrđena je statistički značajna razlika između hibrida nakon inicijacije toplinskog i svjetlosnog stresa (poslijepodnevna mjerenja) kada su se vrijednosti F_v/F_m značajno smanjile na svih osam hibrida (Slika 17), odnosno na oba testirana hibrida (Slika 24), posebice za hibrid 7. U usporedbi prijedpodne s poslijepodne vrijednosti, parametar F_v/F_m kod hibrida 4 je smanjen za oko 8 %, a kod hibrida 7 za oko 18 %. Optimalne vrijednosti F_v/F_m kod C3 biljaka, kojima pripada suncokret, u idealnim uvjetima prema Björkman i Demmig (1987) i Pfündel (1988) iznose 0,83–0,84, a kod C4 biljaka 0,78 (Pfündel, 1988). S obzirom na to da je fotosintetski aparat učinkovit kada se vrijednosti F_v/F_m kreću između 0,75 – 0,85 (Bolhar-Nordenkamp i sur., 1989), može se primijetiti kako je polovici testiranih hibrida suncokreta u toplinskom i svjetlosnom stresu narušena provedba fotosintetskih procesa jer su im vrijednosti F_v/F_m niže od 0,75 (Slika 17). U usporedbi hibrida 4 i 7 (Slika 24 i Tablica 6 u Prilogu), vidljivo je kako hibrid 4 u stresu ima F_v/F_m vrijednost 0,78 čime je zadržao pravilnu funkciju fotosintetskog aparata, a kod hibrida 7 oštećen je fotosintetski aparat jer je F_v/F_m vrijednost iznosila 0,68. Nastale snižene vrijednosti F_v/F_m u uvjetima toplinskog i svjetlosnog stresa ukazuju na smanjenu maksimalnu učinkovitost kvanta svjetlosti u fotokemijskom sustavu fotosustava II uzrokovanu sporim procesima gašenja fluorescencije i fotooštećenjima reakcijskih središta fotosustava II (Murchie i Lawson, 2013). Pri zasićenju svjetlosnog impulsa parametar

F_v/F_m predstavlja potencijalnu fotokemijsku učinkovitost fotosustava II elektronskog transporta. Pri fotoinhibiciji dolazi do smanjenja vrijednosti F_v/F_m što ukazuje na deaktivaciju ili oštećenje reakcijskih središta fotosustava II (Sharma i sur., 2015). Snižene F_v/F_m vrijednosti potvrdili su i Feng i sur. (2014) kada su ispitivali utjecaj toplinskog stresa na dva kultivara pšenice. Brestic i sur. (2012) potvrdili su rast vrijednosti F_0 i pad vrijednosti parametara F_m i F_v/F_m na pšenici pod djelovanjem visokih temperatura. Također na pšenici, Chen i sur. (2017) su dokazali smanjenje vrijednosti parametra F_v/F_m tijekom toplinskog i svjetlosnog stresa. Zbog djelovanja povišenih temperatura koje su u ovom istraživanju praćene i visokim intenzitetom svjetlosti, došlo je do fotoinhibicije uzrokovane gubitkom učinkovitosti primarne fotokemije što su Lichtenthaler i Burkart (1999) ranije potvrdili u svom istraživanju na soji. Smanjene vrijednosti F_v/F_m najvjerojatnije su uzrokovane djelovanjem povišenih temperatura koje su inducirale rast vrijednosti varijabilne fluorescencije na J koraku što je posljedica smanjenja vrijednosti parametra F_m i porasta vrijednosti parametra F_0 (Slika 23 i 24). Prema Mishra i Singhal (1992) smanjen je fotokemijski prijenos učinkovitosti od kompleksa za prikupljanje svjetlosti do redukcijskog središta.

Jedan od procjenitelja fotosintetske učinkovitosti je gustoća aktivnih reakcijskih središta (RC/CS_0) koja se u ovom istraživanju povisila s pojavom povišene temperature okoline i Sunčeve svjetlosti što ukazuje na to kako nije došlo do inaktivacije određenog broja reakcijskih središta s obzirom na nastali stres. Općenito, hibrid 4 je imao više vrijednosti parametra RC/CS_0 u odnosu na hibrid 7, ali su stresni uvjeti ipak bili utjecajni na hibrid 7 (Slika 24, Tablica 6 u Prilogu). Prema drugim istraživanjima provedenim na pšenici (Feng i sur., 2014), biljci čaj (Lin i sur., 2009) i kvinoji (Fghire i sur., 2015) stresni uvjeti su izazvali smanjenja vrijednosti parametra RC/CS_0 što je direktno utjecalo na smanjenje maksimalnog kvantnog prinosa fotosustava II (F_v/F_m), povećanje apsorpcije po aktivnom reakcijskom središtu (ABS/RC), te na povećano rasipanje po aktivnom reakcijskom središtu (DI_0/RC). U ovom istraživanju provedenom na suncokretu unatoč pojavi stresnih uvjeta (povišena temperatura i suvišak svjetlosti) vrijednosti parametara RC/CS_0 se nisu snizile, ali došlo je do navedenih promjena kod parametara F_v/F_m , ABS/RC i DI_0/RC . Iz opisanog se može konstatirati kako postoji mogućnost da suncokret posjeduje drugačiju reakciju obrane fotosintetskog aparata u stresnim uvjetima od drugih biljnih vrsta barem što se tiče parametra RC/CS_0 .

Prijenos energije po aktivnom reakcijskom središtu fotosustava II čine parametri: apsorpcija po aktivnom reakcijskom središtu (ABS/RC), protok uhvaćenih fotona po aktivnom reakcijskom središtu (TR_0/RC), elektronski transport po aktivnom reakcijskom središtu (ET_0/RC) i rasipanje po aktivnom reakcijskom središtu (DI_0/RC) čije je djelovanje na toplinski i svjetlosni stres u usporedbi s kontrolom prikazano na Slici 25 a, b, c i d. Parametar ABS/RC označava omjer molekula klorofila koje su sposobne apsorbirati energiju i broja aktivnih reakcijskih središta pomoću kojeg se dobiva uvid u funkcionalnu veličinu antena kompleksa (Strasser i sur., 2000.). Toplinski i svjetlosni stres su značajno povećali vrijednosti parametra ABS/RC (Slika 25 a). Povećanje od oko 35 % je zabilježeno

kod hibrida 7 za razliku od hibrida 4 kod kojeg je postotak povećanja iznosio oko 19 % u odnosu na prijednevna mjerenja što ukazuje na smanjenje broja aktivnih reakcijskih središta. Veće povećanje vrijednosti parametra ABS/RC praćeno je većim smanjenjem vrijednosti parametra F_v/F_m i većim povišenjem vrijednosti parametra TR_0/RC što se primjećuje na hibridu 7 (Slika 24 i 25 b). Povećanje protoka uhvaćenih fotona po aktivnom reakcijskom središtu (TR_0/RC) kroz tilakoidne membrane nastaje zbog visokog protonskog gradijenta uslijed čega nastaju strukturne promjene reakcijskih „tihih“ središta pretvarajući violaksantin u zeaksantin pri čemu emitiraju energiju u obliku topline (Critchley, 2000) što je ujedno i uzrok rasta rasipanja suviška svjetlosti preko reakcijskog središta (DI_0/RC). TR_0/RC označava brzinu kojom je reakcijsko središte uhvatilo eksciton što izaziva redukciju Q_A do Q_A^- (Strasser i sur., 2004). Suprotno povećanju vrijednosti parametara ABS/RC i TR_0/RC u uvjetima djelovanja povišenih temperatura i suviška svjetlosti vrijednosti elektronskog transporta po aktivnom reakcijskom središtu (ET_0/RC) su se smanjile (Slika 25 a, b i c). Pad vrijednosti je bio izraženiji kod hibrida 7 (postotak smanjenja vrijednosti između mjerenja prijedodne i poslijepodne za hibrid 4 iznosio je oko 13 %, a hibrida 7 oko 36 %), iako su vrijednost u uvjetima bez stresa kod oba hibrida bile jednake. Upravo ta snižena aktivnost elektronskog transporta pod utjecajem toplinskog i svjetlosnog stresa prikazuje smanjenu sposobnost redukcije iza primarnog akceptora elektrona (Q_A). Djelovanjem stresnih uvjeta na biljku također se mijenja i protok energije kroz fotosintetski aparat što rezultira s povećanjem vrijednosti parametara ABS/RC i DI_0/RC (Tsimilli-Michael i sur., 2000, Lin i sur., 2009). U ovom istraživanju, statističkom analizom potvrđena je značajna razlika između vremena mjerenja (Tablica 7 u Prilogu), odnosno djelovanjem toplinskog i svjetlosnog stresa došlo je do povećanja parametra DI_0/RC zbog visoke disipacije neaktivnih reakcijskih središta koje je povezano sa smanjenjem ET_0/RC (Slika 25 c i d). Rasipanje po aktivnom reakcijskom središtu (DI_0/RC) predstavlja omjer ukupne količine svjetlosti raspršene prema broju svih aktivnih reakcijskih središta koji se povećava zbog visokog rasipanja neaktivnih reakcijskih središta (Strasser i sur., 2000). Veći broj neaktivnih reakcijskih središta dovodi do većeg broja fotona koja reakcijska središta ne mogu uhvatiti te se suvišna energije rasipa samo u obliku topline. Raspršena (disipacijska) energija je jedna vrsta obrambenog mehanizma koji biljci pruža zaštitu od fotooksidacijskog oštećenja putem otpuštanja energije u obliku topline. S druge strane, iz rezultata ovog istraživanja može se primijetiti kako su neaktivna reakcijska središta u uvjetima nastanka toplinskog i svjetlosnog stresa povezana sa smanjenjem maksimalnog kvantnog prinosa fotosustava II (F_v/F_m) što je prikazano na Slici 17 i Slici 24. Također, po reakciji hibrida 4 i 7 na testirane uvjete stresa može se primijetiti da je niska koncentracija omjera klorofila *a* i klorofila *b* (Slika 11 i 12) povezana s povišenim vrijednostima parametara ABS/RC i DI_0/RC (Slika 25 a i d) što su ranije potvrdili Lepeduš i sur. (2009).

Indeks fotosintetske učinkovitosti (PI_{ABS}) određen je s parametrom RC/ABS koji predstavlja omjer koncentracije klorofila reakcijskih središta i koncentracije antena klorofila, s parametrom TR_0/DI_0 s pomoću kojeg se utvrđuje omjer protoka uhvaćenih fotona i rasipanja energije te s parametrom $ET_0/(TR_0-ET_0)$ koji ukazuje na transport

elektrona dalje od primarnog akceptora Q_A (Strasser i sur., 2004). U ovom istraživanju, očekivano je zabilježen pad vrijednosti svih navedenih parametara u uvjetima stresa izazvanog povišenim temperaturama i suviškom svjetlosti (Slika 26 a, b, c i d) što je i potvrđeno statističkom analizom. Prema vrijednostima testiranih hibrida vidljivo je kako je hibrid 7 osjetljiviji na toplinski i svjetlosni stres u odnosu na hibrid 4 jer su kod njega snižene vrijednosti parametara RC/ABS , TR_0/DI_0 , $ET_0/(TR_0-ET_0)$ i PI_{ABS} bile izraženije (Slika 26 a, b, c i d). Parametar PI_{ABS} se bazira na apsorpciji svjetlosne energije i njegova značajna razlika zabilježena je u uvjetima stresa kod oba hibrida, s tim da je hibrid 4 i u uvjetima bez stresa i sa stresom imao veće vrijednosti PI_{ABS} . U toplinskom i svjetlosnom stresu vrijednost PI_{ABS} se smanjila za oko 73 % kod hibrida 4, odnosno za oko 91 % kod hibrida 7. Smanjene vrijednosti parametra PI_{ABS} ovise o parametru ET_0/RC zbog smanjene sposobnosti redukcije iza primarnog akceptora elektrona (Q_A). Nadalje, parametri F_v/F_m i PI_{ABS} se vrlo često koriste u istraživanjima učinka stresa na biljke kao pokazatelji učinkovitosti fotosintetskog aparata, pri čemu se preko parametra PI_{ABS} koji prikazuje vitalnost biljke dobiva bolji uvid u fiziološko stanje biljke.

5.3. Utjecaj toplinskog i svjetlosnog stresa na fotosintetske proteine

Četiri proteinska kompleksa su odgovorna za odvijanje primarnih reakcija fotosinteze, a čine ih fotosustav II, citokrom *b6f*, fotosustav I i F-ATP-aza (Nelson i Benn-Shem, 2005). Kako bi što detaljnije ispitali lanac transporta elektrona za potrebe ovog istraživanja, semikvantitativnom metodom ispitani su fotosintetski proteini: Lhc2 tip II (Lhcb2), D1 protein fotosustava II, C terminala (PsbA), citokrom *f* protein (*petA*), tilakoidnog kompleksa Cyt *b6f* (Cyt *f*) i velika podjedinica (LSU) enzima ribuloza-1,5-bisfosfat karboksilaza/oksigenaza (Rubisco). Abiotski čimbenici često izazivaju nepovoljne promjene strukture i aktivnosti proteina te destabilizaciju staničnih membrana (Gill i Tuteja, 2010). Oksidacija proteina, uz brojne promjene drugih staničnih funkcija koje su uzrokovane pojavom stresa, dovode do smanjene preciznosti i učinkovitosti različitih biokemijskih procesa (Dalle-Donne i sur., 2003).

Antene kompleksa za prikupljanje svjetlosti fotosustava II (LHCII) smještene su u tilakoidnoj membrani kloroplasta. LHCII je građen kao trimer proteina Lhcb1, Lhcb2 i Lhcb3 i tri manja monomerna kompleksa Lhcb4, Lhcb5 i Lhcb6 (Lehninger, 2008). Glavnu proteinsku strukturu LHCII čine Lhcb2 proteini koji vežu 45 – 60 % molekula pigmentata (klorofila *a*, *b* i karotenoida), odnosno LHCII sadrži gotovo sav klorofil *b* i polovinu Chl *a+b* pigmentata. Posljedično, promjene u akumulaciji LHCII očituju se na koncentraciju Chl *a/b*, te se zbog toga prema Busheva i sur. (1991) omjer klorofila smatra indikatorom razine LHCII. Općenito, protein LHCII je vrlo bitan u brzini prilagodbe biljaka na promjene intenziteta svjetlosti pri čemu dolazi do različite relativne akumulacije proteina u biljkama i do promjena u organizaciji i poziciji antena. Na ovaj način biljke istovremeno reguliraju apsorpciju svjetlosti i nefotokemijsko rasipanje suviška ekscitacijske energije. U prijepodnevnim mjerenjima hibridi 4 i 7 su imali nižu razinu fotosintetskog proteina Lhcb2. U poslijepodnevnim satima kada su na biljke suncokreta djelovali toplinski i svjetlosni stres razina Lhcb2 se povisila (Slika 27 a). Višu razinu proteina Lhcb2 pod djelovanjem stresa u odnosu na hibrid 4 je imao hibrid 7. Budući da je razina proteina Lhcb2 povezana s omjerom klorofila *a* i *b* može se primijetiti kako je hibrid 4 u odnosu na hibrid 7 imao veću koncentraciju Chl *a/b* i nižu razinu proteina Lhcb2 u uvjetima toplinskog i svjetlosnog stresa (Slika 15 i Slika 27 a). Višu razinu proteina Lhcb2 na pšenici u uvjetima toplinskog i svjetlosnog stresa potvrdili su i Chen i sur. (2017). Relativna akumulacija proteina Lhcb2 se osim s koncentracijom omjera klorofila *a* i *b* može povezati i s fotosintetskim parametrima ABS/RC i DI_0/RC što su dokazali Lepeduš i sur. (2009). Autori su iznijeli kako smanjeni omjer koncentracija Chl *a/b* upućuje na povišenje razine antena kompleksa fotosustava II koji povisuju apsorpciju svjetlosti što rezultira prezasićenjem fotosustava II elektronima i prilagodbom reakcijskih središta u raspršna središta. Navedeno je potvrđeno i u rezultatima ovog eksperimenta kroz više vrijednosti parametara ABS/RC i DI_0/RC (Slika 25 a i d) kod hibrida 7 koji je u odnosu na hibrid 4 imao niži omjer Chl *a/b* (Slika 15).

Jedan od glavnih članova reakcijskih središta fotosustava II je transmembranska podjedinica protein D1 (kodiran genom *psbA*) koji je ujedno i komponenta kompleksa fotosustava II koja je najosjetljivija na okolišne stresore (Li i sur., 2016). Su i sur. (2014) su utvrdili da je protein D1 ciljano mjesto djelovanja toplinskog i svjetlosnog stresa. Također potvrđeno je kako toplinski i/ili svjetlosni stres potiču nastanak ROS-ova u tilakoidnim membranama koje uništavaju djelovanje D1 proteina (Yamamoto i sur., 2008). Iako su druga istraživanja potvrdila smanjenje razine proteina D1 tijekom utjecaja toplinskog i svjetlosnog stresa u kombinaciji (Yamamoto i sur., 2008, Su i sur., 2014), u ovom istraživanju to nije potvrđeno. Naime, prema vrpcama proteina D1 prikazanim na Slici 27 b može se primijetiti povišenje razine proteina D1 u uvjetima stresa, pri čemu se povišenje više odrazilo na hibrid 4. Chen i sur. (2017) su u istraživanju na pšenici utvrdili viši pad razine proteina D1 nakon trosatnog izlaganja biljaka toplinskom i svjetlosnom stresu nego nakon jednosatnog izlaganja što su autori opisali kao kasni odgovor biljke na te uvjete koji mogu objasniti nastanak fotoinhibicije. Kako su se relativne akumulacije D1 proteina kod oba testirana hibrida suncokreta povisile u stresu može se pretpostaviti kako ROS-ovi nisu utjecali na oštećenje D1 proteina, odnosno da su sustavi djelomično spriječili oksidacijsko oštećenje stanica. Dokazano je kako na razinu proteina D1 veći utjecaj od temperature ima intenzitet svjetlosti. Viši intenzitet svjetlosti uzrokuje povećanu fosforilaciju proteina (Guo i sur., 2009). Novije pretpostavke su kako visoka reaktivnost D1 proteina u nepovoljnim uvjetima suviška svjetlosti nije tek puka posljedica fotoinhibirajućih procesa već da je u funkciji zaštite fotosustava I od prevelikog toka elektrona generiranog u fotosustavu II koje može dovesti do potencijalnog oksidacijskog oštećenja (Järvi i sur., 2015). Tome u prilog govori i istraživanje Vojta i sur. (2015) koje potkrepljuje paralelno postojanje i djelovanje različitih ruta protoka elektrona u lancu transporta elektrona, a za svrhu imaju prevenciju prekomjernog stvaranja ROS-ova.

Uz D1 protein, na dnevne fluktuacije u promjeni temperatura i osvjtljenja reagiraju još i proteini kompleksa citokrom *b6f*. Membranski proteinski kompleks citokrom *b6f* poznat je zbog svoje funkcije povezivanja fotosustava I i fotosustava II elektronskim vezama (Cramer i sur., 2008). Ovaj kompleks je po građi dimer koji se sastoji od četiri velike (citokrom *b6*, citokrom *f*, Rieske-željezo sumporni protein i podjedinica VI) i četiri male (PetG, PetL, PetM i PetN) podjedinice (Baniulis i sur., 2011). Za potrebe ovog istraživanja korišten je citokrom *f* protein. U istraživanju hibrida suncokreta tijekom prijepodnevnih sati hibrid 4 imao je nižu relativnu akumulaciju proteina Cyt *f* u odnosu na hibrid 7. Suprotno tome, tijekom djelovanja toplinskog i svjetlosnog stresa u hibridu 4 akumulirano je više proteina Cyt *f* u odnosu na akumulaciju u hibridu 7 (Slika 27 c). Navedeno proizlazi iz činjenice kako se biljke na visoki intenzitet svjetlosti prilagođavaju povećavajući sintezu proteina Cyt *f* (Evans, 1987) pri čemu je relativna akumulacija proteina Cyt *f* u uvjetima visokog intenziteta svjetlosti jedna od najosjetljivijih komponenti prijenosa elektrona (Björkman, 1981). Višu razinu proteina Cyt *f* u uvjetima povišenog intenziteta svjetlosti potvrdili su i Yamori i sur. (2010) na smreci te Pavlovič i sur. (2016) na listovima duhana.

Iako je učinkovitost fotosinteze smanjena pod djelovanjem toplinskog i svjetlosnog stresa, iz rezultata se može primijetiti kako je provodljivost puči bila u funkciji, odnosno pretpostavlja se kako su puči bile otvorene i provodile funkciju difuzije CO₂ što se odrazilo na aktivaciju enzima ribuloza-1,5-bisfosfat karboksilaza/oksigenaza poznatog pod nazivom Rubisco. Opće je poznato kako difuzija CO₂ i aktivnost Rubisco-a u procesu RuBP (ribuloza-1,5-fosfat) karboksilacije utječu na fotosintetsku brzinu. Rubisco u velikoj mjeri utječe na učinkovitost fotosustava II i relativni transport elektrona preko fiksacije ugljikovog dioksida (Cheng i sur., 2001), a građen je od osam velikih podjedinica koje su kodirane u kloroplastnoj DNA te osam malih podjedinica kodiranih u nukleinskoj DNA. Također, Rubisco koji se razgrađuje tijekom senescencije listova (Parry i sur., 1997), čini preko 50 % ukupnih proteina u listovima biljaka. U ovom istraživanju, razina Rubisco-a tijekom djelovanja povišenih temperatura i suviška svjetlosti se vrlo malo razlikovala u hibridima suncokreta 4 i 7, odnosno ostala je gotovo podjednaka razini koja je bila u uvjetima bez stresa (Slika 27 d) što također može ukazivati na sniženu količinu ROS-ova koji inače utječe na degradaciju i fragmentaciju enzima Rubisco. Da visoke temperature i suvišak svjetlosti u podne nisu utjecale na promjenu akumuliranog enzima Rubisco utvrdili su i Mlinarić i sur. (2016). Suprotno tim rezultatima, Chen i sur. (2017) kao i Zivcak i sur. (2015) su dokazali deaktivaciju Rubisco-a u uvjetima toplinskog i svjetlosnog stresa.

5.4. Urod zrna suncokreta pod djelovanjem toplinskog i svjetlosnog stresa

Posljedice djelovanja toplinskog i svjetlosnog stresa na biljke tijekom reproduktivnog razvoja se prema Feng i sur. (2014) primjećuju po smanjenoj stopi fotosinteze i preuranjenoj senescenciji što direktno utječe na smanjenje uroda zrna kroz indukciju peludne starosti i abortusa sjemena. Posljedice se očituju i na težinu sjemena, ispunjenost ljuske endospermom, kvalitetu i sami urod zrna. Također, pojava stresnih prilika uzrokuje promjene u trajanju pojedinih vegetativnih i generativnih faza rasta i razvoja biljaka što je direktno povezano s formiranjem zrna (Akter i Islam, 2017). Glavni čimbenik pomoću kojeg se određuje komercijalni uspjeh nekog usjeva je urod zrna koji ovisi i o karakteristikama genotipa, okolini i njihovoj interakciji (Balalić i sur., 2012, Hussain i sur., 2018). Upravo to ostvarenje višeg uroda kulture omogućava veću zaradu i veći prihod za sjemenare i uzgajivače (Saleem ud Din i sur., 2014).

Iako su Kovačević i sur. (2017) dokazali kako su parametri fotosintetske učinkovitosti dobar prediktor agronomskih osobina u ranoj fazi rasta pšenice, to u ovom istraživanju nije bio slučaj. Naime, iz prikazanih rezultata može se primijetiti kako parametri F_v/F_m i PI_{ABS} nisu imali utjecaj na količinu uroda zrna, odnosno bili su neovisni jedan o drugome (Slika 17, 18, 24 i 26 d). Hibrid 4 i 7 nisu se statistički značajno razlikovali po urodu zrna (4,35 i 4,42 t/ha; Slika 19), iako su u toplinskom i svjetlosnom stresu vrijednosti parametara F_v/F_m i PI_{ABS} za hibrid 4 bile veće od vrijednosti hibrida 7 (Tablica 3 i 6 u Prilogu) što ukazuje na to da iako je funkcija fotosintetskog aparata kod hibrida 7 narušena, to se nije statistički značajno odrazilo na urod zrna. Da vrijednosti parametra PI_{ABS} u uvjetima kratkotrajne suše također nisu utjecale na urod zrna utvrdili su i Kovačević i sur. (2015) na ječmu. Suprotno tim rezultatima, niska, ali statistički značajna korelacija između PI_{ABS} i uroda zrna ustanovljena je na biljkama kukuruza (Franić i sur., 2015), dok je kod pšenice urod zrna bio u pozitivnoj korelaciji s parametrom F_v/F_m (Araus i sur., 1998). S druge strane, Liović i sur. (2017) su dokazali utjecaj vremenskih prilika kako na urod zrna, tako i na sadržaj i urod ulja. Vremenske prilike tijekom vegetacijskog uzgoja suncokreta mogu smanjiti urod zrna za 1 – 3 t/ha (Mijić i sur., 2012) ovisno o vremenskoj situaciji što se može izbjeći odabirom hibrida za sjetvu prilagođenim za određene uvjete uzgoja (Šimić i sur., 2008b).

6. ZAKLJUČAK

Na osnovi provedenog istraživanja koje je uključivalo utjecaj toplinskog i svjetlosnog stresa na fotosintetsku učinkovitost u listovima hibrida suncokreta može se zaključiti sljedeće:

1. Analiziranjem biokemijskih parametara i fotosintetske učinkovitosti u fazi cvatnje te agronomskog svojstva uroda zrna, utvrđena je statistički značajna razlika između istraživanih hibrida suncokreta pri čemu su hibridi pokazali različitu osjetljivost na okolišni stres uzrokovan povišenim temperaturama i suviškom svjetlosti kao i različit genetski potencijal za rodnost.
2. Svi istraživani parametri u testiranim hibridima pokazali su velike fluktuacije vrijednosti, kao i nedostatak jasno uočljive opće pravilnosti u uvjetima bez djelovanja stresa i tijekom djelovanja toplinskog i svjetlosnog stresa.
3. U ispitivanim hibridima suncokreta nije se mogla utvrditi nikakva pravilnost u ponašanju parametara relativni sadržaj vode (RWC) i razine lipidne peroksidacije (TBARS), kao glavnih pokazatelja stresa uzrokovanog povišenim temperaturama i suviškom svjetlosti, i parametara fotosintetske učinkovitosti (maksimalni kvantni prinos fotosustava II – F_v/F_m i indeks fotosintetske učinkovitosti – PI_{ABS}).
4. Toplinski i svjetlosni stres rezultirali su smanjenjem ukupne i specifične aktivnosti enzima gvajakol peroksidaze (GPOD) u hibridima suncokreta, dok se koncentracije topljivih proteina u stresnim uvjetima nisu značajno mijenjale. Iz ovog se može zaključiti kako GPOD nije glavni antioksidacijski enzim u listovima suncokreta odgovoran za obranu stanice u ispitivanim uvjetima djelovanja toplinskog i svjetlosnog stresa.
5. Učinci povišenih temperatura i suviška svjetlosti doveli su do promjena u koncentracijama fotosintetskih pigmenata. Većina hibrida suncokreta je reagirala s povećanjem koncentracija klorofila *a*, klorofila *b*, ukupnih klorofila *a* i *b* te ukupnih karotenoida, dok su se omjeri klorofila *a* i *b* te omjer ukupnih klorofila *a* i *b* i ukupnih karotenoida većinom smanjili. Iz ovog se općenito može zaključiti kako modulacija sadržaja fotosintetskih pigmenata u ispitivanim hibridima suncokreta predstavlja jedan od mehanizama prilagodbe na uvjete toplinskog i svjetlosnog stresa.
6. Za detaljno istraživanje biokemijskih mehanizama regulacije učinkovitosti fotosustava II u uvjetima djelovanja toplinskog i svjetlosnog stresa tijekom ranih poslijepodnevnih sati odabrana su dva hibrida (4 i 7) koji su pokazali različito grupiranje temeljem istraživanih fizioloških i biokemijskih parametara. Iako su oba

odabrana hibrida tijekom djelovanja toplinskog i svjetlosnog stresa reagirali smanjenjem vrijednosti maksimalnog kvantnog prinosa fotosustava II (F_v/F_m), kod hibrida 7 ta je vrijednost pala ispod 0,75 (relativna jedinica), što ukazuje na oštećenje fotosustava II u smislu narušavanja njegove primarne fotokemije. Također, u stresnim uvjetima dolazi i do značajnog smanjenja vrijednosti indeksa fotosintetske učinkovitosti (PI_{ABS}), koje je izraženije kod hibrida 7 u odnosu na hibrid 4, a što dodatno potvrđuje slabiju toleranciju fotosintetskog aparata ovog hibrida na opisane stresne uvjete.

7. Apsorpcija svjetlosti po aktivnom reakcijskom središtu (ABS/RC) značajno se povećala kod oba ispitivana hibrida u uvjetima stresa, što sa smanjenjem omjera koncentracija klorofila *a* i *b* govori o porastu veličine antena fotosustava II. Međutim, povišenje vrijednosti ovog parametra bilo je znatno izraženije kod hibrida 7. Razlog ovakvoj reakciji leži u većem potencijalu relativnu akumulacije proteina za prikupljanje svjetlosti (Lhcb2) kod hibrida 7 u odnosu na hibrid 4.
8. Također, hibrid 7 pokazao je jače izražen porast protoka uhvaćenih fotona po aktivnom reakcijskom središtu (TR_0/RC) i u uvjetima bez stresa i sa stresnim uvjetima, nego hibrid 4, što govori o većoj sposobnosti njegovih reakcijskih središta za iskorištenje apsorbirane svjetlosne energije. Iako su oba hibrida pokazala dobar kapacitet relativne akumulacije proteina D1 u uvjetima stresa, hibrid 4 je pokazao slabiju dinamiku između razgradnje i biosinteze proteina D1, u odnosu na hibrid 7, što je vidljivo iz razine proteina D1 u jutarnjim satima koja pokazuje puno slabiju relativnu akumulaciju ovog proteina u hibridu 4 u periodu nakon stresa, tj. oporavka tijekom noći.
9. Porast veličine antena fotosustava II (ABS/RC) i protoka uhvaćenih fotona po aktivnom reakcijskom središtu (TR_0/RC) nužno dovode do povećanog dotoka elektrona u lanac za prijenos elektrona, uslijed čega dolazi do njegovog prekomjernog zasićenja što se ogleda u padu vrijednosti parametra transport elektrona dalje od primarnog akceptora Q_A ($ET_0/(TR_0-ET_0)$), te u konačnici i u sniženju vrijednosti indeksa fotosintetske učinkovitosti (PI_{ABS}). Iako je pad vrijednosti parametra $ET_0/(TR_0-ET_0)$ vidljiv kod oba istraživana hibrida, izraženiji je kod hibrida 7. Analiza akumulacije glavnih proteina koji reguliraju fotosintetski tok elektrona (Rubisco LSU i citokrom *f*) pokazala je kako se uzrok ovoj razlici regulacije prijenosa elektrona nalazi na razini kompleksa citokrom *b₆f*, a ne na razini funkcioniranja Calvin-Bensonovog ciklusa. Razine relativne akumulacije velike podjedinice enzima Rubisco (Rubisco LSU) nisu se mijenjale tijekom perioda stresa kod oba istraživana hibrida, dok je protein citokrom *f* pokazao snažnu akumulaciju tijekom perioda stresa. Ipak, akumulacija je bila znatno slabija kod hibrida 7, u odnosu na hibrid 4, što je razlog za izraženiji pad vrijednosti parametra $ET_0/(TR_0-ET_0)$ kod hibrida 7.

10. Smanjenje kapaciteta lanca za prijenos elektrona dalje od primarnog akceptora Q_A ($ET_0/(TR_0-ET_0)$) posljedično uzrokuje prekomjernu redukciju fotosustava II. Porast vrijednosti parametra varijabilna fluorescencija na J koraku (V_J) kod hibrida 4 i 7 u stresnim uvjetima ukazuje na inhibiciju prijenosa elektrona s vezanog plastokinona (Q_A) do slabo vezanog plastokinona (Q_B), zbog čega dolazi do akumulacije reduciranog oblika vezanog plastokinona i do smanjenja elektronskog transporta po reakcijskom središtu (ET_0/RC) fotosustav II. Iako je opisani mehanizam vidljiv kod oba istraživana hibrida, jače je izražen kod hibrida 7, koji je pokazao i jaču inhibiciju elektronskog transporta po reakcijskom središtu (ET_0/RC) od hibrida 4, te u konačnici i niže vrijednosti indeksa fotosintetske učinkovitosti (PI_{ABS}).
11. Zaštitni mehanizam protiv prekomjerne redukcije fotosustava II koji se u kloroplastima aktivira u uvjetima toplinskog i svjetlosnog stresa, prvenstveno sa svrhom zaštite proteina D1 od razgradnje, jest rasipanje suviška apsorbirane svjetlosti u obliku topline (DI_0/RC). Ovaj parametar pokazuje porast kod oba istraživana hibrida, ali je znatno više izražen kod hibrida 7, što objašnjava i njegovu bolju koordinaciju dinamike razgradnje i biosinteze proteina D1 u odnosu na hibrid 4.
12. Iz prikazanih rezultata sinergijskog djelovanja toplinskog i svjetlosnog stresa može se zaključiti kako je hibrid 7 osjetljiviji u odnosu na hibrid 4. Naime, hibrid 7 je reagirao s nižim relativnim sadržajem vode u listu, s nižom ukupnom i specifičnom aktivnošću enzima gvajakol peroksidaza, s razlikom u udjelu suhe tvari, s nižom koncentracijom klorofila *a*, s nižom koncentracijom ukupnih klorofila, s nižom koncentracijom ukupnih karotenoida, s nižim omjerom klorofila *a* i *b* te s višim omjerom ukupnih klorofila *a* i *b* i ukupnih karotenoida. Također, kod hibrida 7 uočene su izraženije promjene u vrijednostima parametara fotosinteze i fotosintetskih proteina u odnosu na hibrid 4. Sve navedene razlike ukazuju na prisutnost varijabilnosti genetski uvjetovane reakcije testiranih hibrida suncokreta na povišene temperature i suvišak svjetlosti.
13. Urod zrna suncokreta se bez obzira na sve utvrđene razlike u prilagodbi na stresne uvjete između hibrida 4 i 7 nije statistički značajno razlikovao. Iz ovog se može zaključiti kako je ekološka valencija suncokreta kao vrste dovoljno velika za adekvatnu kompenzaciju razine toplinskog i svjetlosnog stresa koja je opisana u ovom istraživanju.

Prikazani rezultati ovog istraživanja koji opisuju utjecaj toplinskog i svjetlosnog stresa u kombinaciji mogu se koristiti za potrebe provođenja oplemenjivanja suncokreta pri povećanju tolerancije genotipova na abiotičke stresore. Naime, ovo istraživanje će doprinijeti oplemenjivačima prilikom kreiranja linija, odnosno hibrida suncokreta koji će

posjedovati toleranciju na okolišne stresore, prvenstveno povišenu temperaturu i suvišak svjetlosti, ali bi moglo biti korisno i za proučavanje djelovanja drugih okolišnih stresora. Također, istraživanje će doprinijeti određivanju faze razvoja suncokreta najpogodnije za povezivanje fizioloških i biokemijskih parametara s agronomskim. Postizanje veće tolerancije genotipova na okolišne stresore uvelike će doprinijeti razvoju stabilnih i adaptabilnih genotipova koji bi mogli rezultirati s većim urodom zrna i sadržajem ulja što je i krajnji ekonomski cilj proizvodnje ove poljoprivredne kulture.

7. POPIS LITERATURE

Aggarwal, A., Sharma, I., Tripathi, B. N., Munjal, A. K., Baunthiyal, M., Sharma, V. 2012. Metal Toxicity and Photosynthesis. U: Itoh, S., Mohanty, P., Guruprasad, K. N. (ur.). Photosynthesis: Overviews on Recent Progress & Future Perspective, 229–236.

Agrawal, S. B., Mishra, S. 2007. Effects of supplemental ultraviolet-B and cadmium on growth, antioxidants and yield of *Pisum sativum* L. Ecotoxicol. Environ. Saf., 72: 610–618.

Ali, M. B., Hahn, E.-J., Paek, K.-Y. 2005. Effects of temperature on oxidative stress defense systems, lipid peroxidation and lipoxygenase activity in *Phalaenopsis*. Plant Physiol. Biochem., 43: 213–223.

Akter, N., Islam, M. R. 2017. Heat stress effects and management in wheat. A review. Agron. Sustain. Dev., 37 (37): 1–17. DOI: 10.1007/s13593-017-0443-9

Akram, N. A., Ashraf, M., Al-Qurainy, F. 2012. Aminolevulinic acid induced regulation in some key physiological attributes and activities of antioxidant enzymes in sunflower (*Helianthus annuus* L.) under saline regimes. Sci. Hort., 142: 143–148.

Akram, N. A., Iqbal, M., Muhammad, A., Ashraf, M., Al-Qurainy, F., Shafiq, S. 2018. Aminolevulinic acid and nitric oxide regulate oxidative defense and secondary metabolisms in canola (*Brassica napus* L.) under drought stress. Protoplasma, 255: 163–174. DOI 10.1007/s00709-017-1140-x

Allakhverdiev, S. I., Kreslavski, V. D., Klimov, V. V., Los, D. A., Carpentier, R., Mohanty, P. 2008. Heat stress: an overview of molecular responses in photosynthesis. Photosyn. Res., 98 (1-3): 541–550.

Alscher, R. G., Erturk, N., Heath, L.S. 2002. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. J. Exp. Bot., 53: 1331–134.

Alter, P., Dreissen, A., Luo, F. L., Matsubara, S. 2012. Acclimatory responses of *Arabidopsis* to fluctuating light environment: comparison of different sunfleck regimes and accessions. Photosyn. Res., 113: 221–237. DOI 10.1007/s11120-012-9757-2

Amutha R., Muthulaksmi, S., Baby Rani, W., Indira, K., Mareeswari, P. 2007. Alleviation of High Temperature Stress in Sunflower (*Helianthus annuus* L.) by Plant Growth Regulators and Chemicals. Res. j. agric. biol. sci., 3 (12): 1658–1662.

Andrade, A., Escalante, M., Vigliocco, A., Tordable, M. C., Sergio Alemano, S. 2017. Involvement of jasmonates in responses of sunflower (*Helianthus annuus*) seedlings to moderate water stress. Plant Growth Regul., 83 (3): 501–511. <https://doi.org/10.1007/s10725-017-0317-9>

Anjum, F., Wahid, A., Javed, F., Arshad, M. 2008. Influence of foliar applied thiourea on

flag leaf gas exchange and yield parameters of bread wheat (*Triticum aestivum*) cultivars under salinity and heat stresses. *Int. J. Agri. Biol.*, 10: 619–626.

Anjum, S. A., Xie, X., Wang, L., Saleem, M. F., Man, C., Lei, W. 2011. Morphological, physiological and biochemical responses of plants to drought stress. *Afr. J. Agric. Res.*, 6 (9): 2026–2032.

Antunović Dunić, J., Lepeduš, H., Šimić, D., Lalić, A., Mlinarić, S., Kovačević, J., Cesar, V. Physiological response to different irradiation regimes during barley seedlings growth followed by drought stress under non-photoinhibitory light. *J Agric Sci*, 7 (6): 69–83.

Araus, J. L., Amaro, T., Voltas, H., Nakkoul, M., Nachit, M. 1998. Chlorophyll fluorescence as a selection criterion for grain yield in durum wheat under Mediterranean conditions. *Field. Crop. Res.*, 55 (3): 209–223.

Arora, A., Sairam, R. K., Srivastava, G. C. 2002. Oxidative stress and antioxidative system in plants, *Current Science*, 82: 1227–1238.

Arumuganathan, K., Earle, E. D. 1991. Nuclear DNA content of some important plant species. *Plant Mol. Biol. Rep.*, 9: 208–218.

Ayranci, R., Sade, B. Soylu, S. 2014. The response of bread wheat genotypes in different drought typesi grain yield, drought tolerance and grain yield stability. *Turk J Field Crops*, 19: 183–198. DOI: 10.17557/tjfc.17813.

Asada, K. 2006. Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. *Plant Physiol.*, 141 (2): 391–396.

Asseng, S., Foster, I., Turner, N. C. 2011. The impact of temperature variability on wheat yields. *Glob Change Biol*, 17: 997–1012. DOI:10.1111/j.1365-2486.2010.02262.x

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

Atkinson, N. J., Urwin, P. E. 2012. The interaction of plant biotic and abiotic stresses: from genes to the field. *J Exp Bot*, 63: 3523–3543. DOI:10.1093/jxb/ers100

Alexieva, V., Ivanov, S., Sergiev, I., Karanov, E. 2003. Interaction between stresses. *Bulg. J. Plant Physiol.*, Special Issue: 1–17.

Balalić, I., Miklič, V., Jocić, S., Marinković, R., Cvejić, S., Hladni, N., Miladinović, D. 2012. Ocena NS Hibrida suncokreta u mikro-ogledima preko interakcije hibrid × lokalitet. *Ratarstvo i povrtarstvo*, 49 (3): 270–281.

- Balalić, I., Balalić, I., Crnobarac, J., Jocić, S., Miklič, V., Radić, V., Dušanić, N. 2016. Variability of head diameter in sunflower hybrids depending on planting date. *Genetika*, 48 (3): 983–990.
- Baniulis, D., Zhang, H., Zakharova, T., Hasan, S. S., Cramer, W. A. 2011. Purification and crystallization of the cyanobacterial cytochrome b6f complex. *Methods Mol Biol*, 684: 65–77.
- Beisel, K. G. 2010. Dynamic adjustment of photosynthetic pigment composition in leaves, Doktorski rad, Heinrich-Heine Universität, Dusseldorf.
- Berville, A., 2010. Oil composition variations. U: Hu, J., Seiler, G., Kole, C. (ur.). *Genetics, genomics and breeding of sunflower*. Science Publisher, 253–277.
- Björkman, O. 1981. Response to different quantum flux densities. U: *Physiological Plant Ecology I. Responses to the Physical Environment*. Lange, O. D., Nobel, P. S., Osmond, C. B., Ziegler, H. (ur.). *Encycl. Plant Physiol. New Ser.*, 12 A, 57-107. (Springer-Verlag: Berlin.)
- Björkman, O., Demmig, B. 1987. Photon yield of O₂ evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77 K among vascular plants of diverse origins. *Planta*, 170: 489–504.
- Blanchet, R., Merrien, A., Gelfi, I., Cavalie, G., Courtiade, B. 1982. Estimation et evolution comparee de l'assimilation nette de couverts de maïs (*Zea mays* L.), tournesol (*Helianthus annuus* L.) et soja (*Glycine max* L. Merrill) au cours de leurs cycle de developpe. *Agronomie*, 2 (2): 149–154.
- Blagojević, A. 2008. Zemljopisno, povijesno, upravno i pravno određenje istočne Hrvatske – korijeni suvremenog regionalizma. *Zb. Prav. fak. Sveuč. Rij.* (1991), 29 (2): 1149–1180.
- Blokhina, O. 2000. Anoxia and oxidative stress: Lipid peroxidation, antioxidant status and mitochondrial functions in plants. Academic dissertation, Faculty of Science, University of Helsinki.
- Bohnert, H. J., Bressan, R. A. 2001. Abiotic stresses, plant reactions and new approaches towards understanding stress tolerance. U: Nösberger, J., Geiger, H. H., Struik, P. C. (ur.). *Crop science: Progress and prospects*. CABI Publishing, UK. 81–101.
- Bolhar-Nordenkampf, H. R., Long, S. P., Baker, N. R., Öquist, G., Schreiber, U., Lechner, E. G. 1989. Chlorophyll fluorescence as a probe of the photosynthetic competence of leaves in the field: A review of current Instrumentation. *Funct. Ecol.*, 3 (4): 497–514.
- Bonjoch, N. P., Tamayo, P. R. 2001. Protein content quantification by Bradford method U: Reigosa Roger, M. J. (ur.). *Handbook of Plant Ecophysiology Techniques*. Kluwer

Academic Publisher, Nizozemska, 283–295.

Bradford, M. M. 1976. Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72 (1-2): 248–254.

Brestic, M., Zivcak, M., Kalaji, H. K., Carpentier, R., Allakhverdiev, S. I. 2012. Photosystem II thermostability in situ: Environmentally induced acclimation and genotype-specific reactions in *Triticum aestivum* L. *Plant Physiol. Biochem.*, 57: 93–105.

Brestic, M., Zivcak, M. 2013. PSII fluorescence techniques for measurement of drought and high temperature stress signal in plants: protocols and applications. U: Rout G. R., Das, A. B. (ur.). *Molecular stress physiology of plants*, Dordrecht, Nizozemska, Springer. 87–131.

Busheva, M., Garab, G., Liker, E., Tóth, Z., Széll, M., Nagy, F. 1991. Diurnal fluctuations in the content and functional properties of the light harvesting chlorophyll a/b complex in thylakoid membranes. *Plant Physiol.*, 95: 997–1003.

Buchner, O., Karadar, M., Bauer, I., Neuner, G. 2013. A novel system for in situ determination of heat tolerance of plants: first results on alpine dwarf shrubs. *Plant Methods*, 9 (7): 1–13. <http://www.plantmethods.com/content/9/1/7>

Camejo, D., Rodríguez, P., Moralesb, M. A., Amicoa, J. M. D., Torrecillas, A., Alarcón, J. J. 2005. High temperature effects on photosynthetic activity of two tomato cultivars with different heat susceptibility. *J. Plant Physiol.*, 162: 281–289.

Chandra, S. 2003. Effects of leaf age on transpiration and energy exchange of *Ficus glomerata*, a multipurpose tree species of central Himalayas. *Physiol. Mol. Biol. Plants*, 9: 255–260.

Chen, Y. E., Zhang, C. M., Su, Y. Q., Ma, J., Zhang, Z. W., Yuan, M., Zhang, H. U., Yuan, S. 2017. Responses of photosystem II and antioxidative systems to high light and high temperature co-stress in wheat. *Environ. Exp. Bot.*, 135: 45–55.

Cheng, L., Fuchigami, L. H., Breen, P. J. 2001. The relationship between photosystem II efficiency and quantum yield for CO₂ assimilation is not affected by nitrogen content in apple leaves. *J. Exp. Bot.*, 52 (362): 1865–1872.

Chowdhury J. A., Karim, M. A., Khaliq, Q. A., Ahmed, A. U., Mondol, A. T. M. A. I. 2017. Effect of drought stress on water relation traits of four soybean genotypes. *SAARC J. Agri.*, 15 (2): 163–175.

Christen, D., Schönmann, S., Jermini, M., Strasser, R. J., Défago, G. 2007. Characterization and early detection of grapevine (*Vitis vinifera*) stress responses to esca

disease by in situ chlorophyll fluorescence and comparison with drought stress. *Environ. Exp. Bot.*, 60: 504–514.

Claverie, M., Demarez, V., Duchemin, B., Hagolle, O., Ducrot, D., Marais-Sicre, C., Dejoux, J. F., Huc, M., Keravec, P., Béziat, P., Fieuzal, R., Ceschia, E., Dedieu, G. 2012. Maize and sunflower biomass estimation in southwest France using high spatial and temporal resolution remote sensing data. *Remote Sens Environ.*, 124: 844–857.

Cooper, G. M., Hausman, R. E., 2007. *The Cell: A Molecular Approach*, Sinauer Associates Inc, Sunderland.

Condon, A. G., Richards, R. A., Rebetzke, G. J., Farquhar, G. D. 2004. Breeding for high water-use efficiency. *J. Exp. Bot.*, 55: 2447–2460.

Corpas, F. J., Gupta, D. K., Palma, J. M. 2015. Production Sites of Reactive Oxygen Species (ROS) in Organelles from Plant Cells. U: Gupta, D. K. i sur. (ur.). *Reactive Oxygen Species and Oxidative Damage in Plants Under Stress*, Springer International Publishing Switzerland. DOI 10.1007/978-3-319-20421-5_1

Cowley, R., Luckett, D. 2011. Chlorophyll fluorescence as a method to detect moisture limiting stress in canola. 17th Australian Research Assembly on *Brassicas* (ARAB), Wagga Wagga NSW. 1–4.

Cramer, W. A., Baniulus, D., Yamashita, E., Zhang, H., Zatsman, A. I., Hendrich, M. P. 2008. Cytochrome b6f complex, colon structure, spectroscopy, and function of heme c_n: n-side electron and proton transfer reactions. U: Fromme, P. (ur.). *Photosynthetic protein complexes*. Weinheim, Germany: Wiley - Blackwell Verlag GmbH&Co. 155-179.

Critchley, C. 2000. Photoinhibition. U: Raghavendra, A. S. (ur.). *Photosynthesis: A Comprehensive Treatise*, Cambridge University Press, Cambridge, UK, 264–272.

Cvejić, S., Jocić, S., Miladinović, D., Jocković, M., Imerovski, I., Sakač, Z., Miklič, V. 2014. Development and utilization of sunflower genotypes with altered oil quality/Stvaranje i korišćenje genotipova suncokreta sa promenjenim kvalitetom ulja. *Journal on processing and energy in agriculture*, 18 (4): 191–195.

Dąbrowski, P., Baczewska, A. H., Pawluśkiewicz, B., Paunovc, M., Alexantrov, V., Goltsev, V., Kalaji, M. H. 2016. Prompt chlorophyll a fluorescence as a rapid tool for diagnostic changes in PSII structure inhibited by salt stress in Perennial ryegrass. *J. Photochem. Photobiol. B, Biol.*, 157: 22–31.

Dalle-Donne, I., Rossi, R., Giustarini, D., Milzani, A., Colombo, R. 2003. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin. Chim. Acta*, 329 (1): 23–38.

Dash, S., Mohanty, N. 2001. Evaluation of assays for the analysis of thermo-tolerance and

recovery potentials of seedlings of wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars. *Plant Physiol. Biochem.*, 158 (9): 1153–1165.

De Costa, W. A. J. M. 2011. A review of the possible impacts of climate change on forests in the humid tropics. *J Natl Sci Found Sri*, 39: 281–302. DOI:10.4038/jnsfsr.v39i4.3879

del Rió, L. A. 2015. ROS and RNS in plant physiology: an overview. *J Exp Bot*, 66: 2827–2837.

Debaeke, P., Bedoussac, L., Bonnet, C., Bret-Mestries, E., Seassau, C., Gavaland, A., Raffailac, D., Tribouillois, H., Véricel, G., Justes, E., 2017. Sunflower crop: environmental-friendly and agroecological. *OCL*, 23: 1–12.

Deryng, D., Conway, D., Ramankutty, N., Price, J., Warren, R. 2014. Global crop yield response to extreme heat stress under multiple climate change futures. *Environ Res Lett*, 9: 1–13. DOI:10.1088/1748-9326/9/3/034011

Demmig-Adams, B., Gilmore, M. A., Adams, W. W. 1996. In vivo functions of carotenoids in higher plants. *The FASEB Journal*, 10: 403–412.

Demiral, T., Türkan, I. 2005. Comparative lipid peroxidation, antioxidant defense systems and proline content in roots of two rice cultivars differing in salt tolerance. *Environ Exp Bot*, 53: 247–257.

Demirevska-Kepova, K., Simova-Stoilova, L., Stoyanova, Z., Holzer, R., Feller, U. 2002. Biochemical changes in barley plants after excessive supply of copper and manganese. *Environ Exp Bot.*, 52: 253–266.

Devi, R., Kaur, N., Gupta, A. K. 2012. Potential of antioxidant enzymes in depicting drought tolerance of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Indian J Biochem Biophys*, 49: 257–265.

Dey, S., K., Dey, J., Patra, S., Pothal, D. 2007. Changes in the antioxidative enzyme activities and lipid peroxidation in wheat seedlings exposed to cadmium and lead stress. *Braz. J. Plant. Physiol.*, 19 (1): 53–60.

DHMZ – Državni hidrometeorološki zavod. 2016. Klima Hrvatske. <http://klima.hr/klima.php?id=k1>

Ding, B., Shi, G., Xu, Y., Hu, J., Xu, Q. 2007. Physiological responses of *Alternanthera philoxeroides* (Mart.) Griseb leaves to cadmium stress. *Environ Pollut*, 147: 800–803.

Dlugolecki, A. 2008. An overview of the impact of climate change on the insurance industry. U: Diaz, H. F., Murnane, R. J. (ur.). *Climate extremes and society*. Cambridge.

Doganlar, Z. B., Atmaca, M. 2011. Influence of Airborne Pollution on Cd, Zn, Pb, Cu, and

Al accumulation and physiological parameters of plant leaves in Antakya (Turkey). *Water Air Soil Pollut*, 214: 509–523.

Dolferus, R., Ji, X., Richards, R. A. 2011. Abiotic stresses and control of grain number in cereals. *Plant Sci.*, 181: 331–341.

Donatelli, M., Srivastava, A. K., Duveiller, G., Niemeier, S., Fumagalli, D. 2015. Climate change impact and potential adaptation strategies under alternate realizations of climate scenarios for three major crops in Europe. *Environ. Res. Lett.*, 10: 1–12.

Dušanić, N., Miklič, V., Joksimović, J., & Atlagić, J. 2004. Path coefficient analysis of some yield components of sunflower. *Proc. 16th Inter. Sunflower Conf.*, Fargo North Dakota, USA, 531–537.

Duque, A. S., de Almeida, A. M., da Silva, A. B., da Silva, J. M., Farinha, A. P., Santos, D., Fevereiro, P., de Sousa Araújo, S. 2013. Abiotic stress responses in plants: unraveling the complexity of genes and networks to survive. U: Vahdati, K., Leslie, C. (ur.). *Abiotic stress-Plant Responses and Applications in Agriculture*. InTech

Duysens, L. N. M., Sweers, H. E. 1963. Mechanisms of two photochemical reactions in algae as studied by means of fluorescence. U: *Studies on microalgae and photosynthetic bacteria, special issue of plant and cell physiology*. Japanese Society of Plant Physiologists, University of Tokyo Press, Tokyo, 353–372.

Earl, H. J., Ennahli, S. 2004. Estimating photosynthetic electron transport via chlorophyll fluorometry without photosystem II light saturation. *Photosyn. Res.*, 82: 177–186.

Efeoglu, B., Terzioglu, S. 2009. Photosynthetic responses of two wheat varieties to high temperature. *EurAsia J BioSci*, 3: 97–106.

Egert, M., Tevini, M. 2002. Influence of drought on some physiological parameters symptomatic for oxidative stress in leaves of chives (*Allium schoenoprasum*). *Environ Exp Bot.*, 48: 43–49.

Emamverdian A., Ding, Y., Mokhberdorran, F., Xie, Y. 2015. Heavy metal stress and some mechanisms of plant defense response. *Sci World J*, 2015: 1–18.

Evans, J. R. 1987. The Relationship between Electron Transport Components and Photosynthetic Capacity in Pea Leaves grown at Different Irradiances. *Aust. J. Plant Physiol.*, 14: 157–170.

Fang, Y. J., Xiong, L. Z. 2015. General mechanisms of drought response and their application in drought resistance improvement in plants. *Cell. Mol. Life Sci.*, 72: 673–689.

Faostat 2017. (<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>) 27.10.2017.

- Farid, M., Ali, S., Akram, N. A. Rizwan, M., Abbas, F., Bukhari, S. A. H., Saeed, R. 2017. Phyto-management of Cr-contaminated soils by sunflower hybrids: physiological and biochemical response and metal extractability under Cr stress. *Environ Sci Pollut Res*, 24: 16845–16859. DOI 10.1007/s11356-017-9247-3
- Farmer, E. F., Mueller, M. J. 2013. ROS-mediated lipid peroxidation and RES-activated signaling. *Annu Rev Plant Biol*, 64: 429–450.
- Feng, B., Liu, P., G. Li, G., Dong, S. T., Wang, F. H., Kong, L. A., Zhang, J. W. 2014. Effect of Heat Stress on the Photosynthetic Characteristics in Flag Leaves at the Grain-Filling Stage of Different Heat-Resistant Winter Wheat Varieties. *J Agro Crop Sci*, 200: 143–155.
- Fghire, R., Anaya, F., Ali, O. I., Benhabib, O., Ragab, R., Wahbi, S. 2016. Physiological and photosynthetic response of quinoa to drought stress. *ChileanJAR*, 75 (2): 174–183.
- Franić, M., Mazur, M., Volenik, M., Brkić, J., Brkić, A., Šimić, D. 2015. Effect of plant density on agronomic traits and photosynthetic performance in the maize IBM population. *Agriculture*, 21 (2): 36–40.
- Gadžo, D., Đikić, M., Mijić, A. 2011. Industrijsko bilje. U: Biljevac, S. (ur.), Poljoprivredno-prehrambeni fakultet Univerziteta u Sarajevu. 12–32.
- Gadjev, I., Stone, J. M., Gechev, T. S. 2008. Programmed cell death in plants: new insights into redox regulation and the role of hydrogen peroxide. *Int Rev Cell Mol Biol*, 270:87–144.
- Galvagno, M., Rossini, M., Migliavacca, M., Cremonese, E., Colombo, R., Morra di Cella, U. 2013. Seasonal course of photosynthetic efficiency in *Larix decidua* Mill. in response to temperature and change in pigment composition during senescence. *Int J Biometeorol*, 57: 871–880. DOI: 10.1007/s00484-012-0614-y
- Gamon, J. A., Percy, R. W. 1990. Photoinhibition in *Vitis californica*. The role of temperature during high-light treatment. *Plant Physiol.*, 92 (2): 487–494.
- García-López, J., Lorite, I. J., García-Ruiz, R., Domínguez, J. 2014. Evaluation of three simulation approaches for assessing yield of rainfed sunflower in a Mediterranean environment for climate change impact modelling. *Clim. Change*, 124 (1–2): 147–162.
- Gagro, M. 1998. Suncokret. U: Milas, Z. (ur.). Industrijsko i krmno bilje. Hrvatsko agronomsko društvo, 25–40.
- Gent, M. P. N., Seginer, I. 2012. A carbohydrate supply and demand model of vegetative growth: response to temperature and light. *Plant Cell Environ.*, 1–13.

- Gill, S. S., Tuteja, N. 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol. Biochem.*, 48 (12): 909–930.
- Göbel, C., Feussner, I., Hause, B., Wasternack, C., Strack, D. 2009. Methods for the analysis of oxylipins in plants. *Phytochemistry*, 70: 1485–1503.
- González, L., González-Vila, M. 2001. Determination of Relative Water Content. U: Reigosa Roger, M. J. (ur.). *Handbook of Plant Ecophysiology Techniques*. Kluwer Academic Publishers. Printed in the Netherlands, 207–212.
- Gourdji, S., Mathews, K. L., Reynolds, M., Crossa, J., Lobell, D. B. 2013. An assessment of wheat yield sensitivity and breeding gains in hot environments. *Proc Biol Sci*, 280: 1471–2954. DOI:10.1098/rspb.2012.2190
- Govindjee 2004. Chlorophyll *a* fluorescence: a bit of basics and history. U: Papageorgiou, G. C., Govindjee (ur.). *Chl *a* fluorescence: a signature of photosynthesis, advances in photosynthesis and respiration*, 19. Springer, Dordrecht, 1–42.
- Greer, D. H. 2015. Temperature-dependent responses of the photosynthetic and chlorophyll fluorescence attributes of apple (*Malus domestica*) leaves during a sustained high temperature event. *Plant Physiol Biochem.*, 97: 139–46. DOI: 10.1016/j.plaphy.2015.10.002.
- Gu, J., Zhou, Z., Li, Z., Chen, Y., Wang, Z., Zhang, H., Yang, J. 2017. Photosynthetic Properties and Potentials for Improvement of Photosynthesis in Pale Green Leaf Rice under High Light Conditions. *Front. Plant Sci.*, 8: 1082. DOI: 10.3389/fpls.2017.01082
- Gunes, A., Pilbeam, D. J., Inal, A., Coban, S. 2008. Influence of Silicon on Sunflower Cultivars under Drought Stress, I: Growth, Antioxidant Mechanisms, and Lipid Peroxidation. *Commun Soil Sci Plant Anal.*, 39: (13-14): 1885-1903. DOI: 10.1080/00103620802134651
- Guo, W.-D., Guo, Y.-P., Liu, J.-R., Mattson, N. 2009. Midday depression of photosynthesis is related with carboxylation efficiency decrease and D1 degradation in bayberry (*Myrica rubra*) plants. *Sci Hortic*, 123 (2): 188–196.
- Gupta, N. K., Shubhi Agarwal, S., Agarwal, V. P., Nathawat, N. S., Gupta, S., Singh, G. 2013. Effect of short-term heat stress on growth, physiology and antioxidative defence system in wheat seedlings. *Acta Physiol Plant*, 35: 1837–1842.
- Gür, A., Demirel, U., Ozden, M., Kajhraman, A., Copur, O. 2010. Diurnal gradual heat stress affects antioxidant enzymes, proline accumulation and some physiological components in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Afr. J. Biotechnol.*, 9 (7): 1008–1015.
- Hall, A. E. 2001. *Crop responses to environment*. CRC Press LLC, Boca Raton, 17–28.

Halliwell, B. 2006. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol.*, 141: 312–322.

Hattori, T., Inanaha, S., Araki, H., An, P., Morita, S., Luxova, M., Lux, A. A. 2005. Application of silicon enhanced tolerance in *Sorghum bicolor*. *Physiol. Plant.*, 123: 459–466.

Havaux, M., Ernez, M., Lannoye, R. 1988. Correlation between heat tolerance and drought tolerance in cereals demonstrated by rapid chlorophyll fluorescence tests. *J. Plant Physiol.*, 33: 555–560.

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

Hewezi, T., Léger, M., El Kayal, W., Gentzbittel, L. 2006. Transcriptional profiling of sunflower plants growing under low temperatures reveals an extensive down-regulation of gene expression associated with chilling sensitivity. *J. Exp. Bot.*, 57: 3109–3122.

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

Hladni, N., Miklič, V., Jocić, S., Kraljević-Balalić, M., Škorić, D. 2014. Mode of inheritance and combining ability for plant height and head diameter in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Genetika*, 46 (1): 159–168.

Hussain, S., Ahmad, M., Ahmad, S., Iqbal, J., Subhani, M. N., Nadeem, S. M., Ibrahim, M. 2013. Improvement of drought tolerance in sunflower (*Helianthus annuus* L.) by foliar application of abscisic acid and potassium chloride. *Pak. J. Nutr.*, 12 (4): 345–352.

Hussain, M., Farooq, S., Hasan, W., Ul-Allah, S., Tanveer, M., Farooq, M., Nawaz, A. 2018. Drought stress in sunflower: Physiological effects and its management through breeding and agronomic alternatives. *Agric Water Manag.*, 201: 152–166.

Ibrahim, M. F. M., Faisal, A., Shehata, S. A. 2016. Calcium chloride alleviates water stress in sunflower plants through modifying some physio-biochemical parameters. *American-Eurasian J. Agric. Environ. Sci.*, 16 (4): 677–693.

IPCC 2001. *Climate Change 2001: The Scientific Basis*. Contribution of Working Group I to the Third Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Houghton, J. T., Ding, Y., Griggs, D. J., Noguer, M., van der Linden, P. J. Dai, X., Maskell, K., Johnson, C. A. (ur.), Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom i New York, NY, USA, 881.

Ipek, B., Uner, D. 2012. *Artificial Photosynthesis from a Chemical Engineering Perspective*, Artificial Photosynthesis. Mohammad Najafpour (ur.), ISBN: 978-953-307-

966-0, InTech, Available from: <http://www.intechopen.com/books/artificial-photosynthesis/artificial-photosynthesis-from-a-chemicalengineering-perspective>

Iqbal, Z., Nawaz, N., Ukasha, Musharaf, A., Mustafa, H. S. B., Mahmood, T., Aftab, M. 2017. An Overview: Effect of Different Abiotic Stresses on Quantitative Traits of Brassica, Sunflower and Soybean due to Climate Change. *Nat Sci.*, 15 (5): 74–81. doi:10.7537/marsnsj150517.10.

Jaggard, K. W., Qi, A., Ober, E. S., 2010. Possible changes to arable crop yields by 2050. *Phil. Trans. R Soc. B*, 365: 2835–2851.

Järvi, S., Suorsa, M., Aro, E.-M. 2015. Photosystem II repair in plant chloroplasts - Regulation, assisting proteins and shared components with photosystem II biogenesis. *Biochimica Biophysica Acta*, 1847 (9): 900–909. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbabi.2015.01.006>.

Josipović, A., Sudarić, A., Lončarić, Z., Kovačević, J., Matoša Kočar, M., Markulj, A., Jurković, V. Photosynthetic efficiency of soybean on cadmium contaminated soil. 7th international scientific/professional conference, „Agriculture in nature and environment protection“. Baban, M., Đurđević, B. (ur.). Osijek: Glas Slavonije d.d., Osijek, 2014. 201–205.

Jovičić, D., Štajner, D., Popović, B., Marjanović-Jeromela, A., Nikolić, Z., Petrović, G., Ždero-Pavlović, R. 2017. Salt-induced changes in the antioxidant system and viability of oilseed rape. *Zemdirbyste*, 104 (3): 249–258. DOI: 10.13080/z-a.2017.104.032

Kalaji, H. M., Loboda, T. 2007. Photosystem II of barley seedlings under cadmium and lead stress. *Plant, Soil, Environ.*, 53: 511–516.

Kalaji, H. M., Guo, P. 2008. Chlorophyll Fluorescence: a Useful Tool in Barley Plant Breeding Programs. U: Sánchez, A., Gutierrez, S. J. *Photochemistry Research Progress*. 439–463.

Kaya, M. D., Kolsarici, O. 2011. Seed yield and oil content of some sunflower (*Helianthus annuus* L.) hybrids irrigated at different growth stages. *Afr. J. Biotechnol.*, 10 (22): 4591–4595.

Kaya, Y., Jovic, S., Miladinović, D. 2012. Sunflower. U: Gupta, S. K. (ur.). *Technological innovations in major oil crops, Volume 1, Breeding*, Springer Science + Business Media, New York, NY, USA, 85–129.

Kaya, A., Yigit, E. 2014. The physiological and biochemical effects of salicylic acid on sunflowers (*Helianthus annuus*) exposed to flurochloridone. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 106: 232–238.

- Kaya, A. 2017. Exogenous ascorbic acid improves defence responses of sunflower (*Helianthus annuus*) exposed to multiple stresses. *Acta. Biol. Hung.*, 68 (3): 290–299. DOI: 10.1556/018.68.2017.3.6
- Kouřil, R., Dekker, J. P., Boekema, E. J. 2012. Supramolecular organization of photosystem II in green plants. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1817 (1): 2–12.
- Kovačević, J., Mazur, M., Lalić, A., Josipović, M., Josipović, A., Matoša Kočar, M., Marković, M., Antunović, J., Cesar, V. 2015. Photosynthetic performance index in early stage of growth, water use efficiency, and grain yield of winter barley cultivars. *Chil. J. Agric. Res.*, 75 (3): 275–283.
- Kovačević, J., Mazur, M., Drezner, G., Lalić, L., Sudarić, A., Dvojković, K., Viljevac-Vuletić, M., Josipović, M., Josipović, A., Markulj-Kulundžić, A., Lepeduš, H. 2017. Photosynthetic efficiency parameters as indicators of agronomic traits of winter wheat cultivars in different soil water conditions. *Genetika*, 49 (3): 891–910.
- Kreslavski, V., Lyubimov, V., Shabnova, N., Balakhnina, T., Kosobryukhov, A., 2009. Heat-induced impairments and recovery of photosynthetic machinery in wheat seedlings. Role of light and prooxidant-antioxidant balance. *Physiol Mol Biol Plants*, 15: 115–122.
- Krizmanić, M. 2012.a. Suncokret. U: Oplemenjivanje poljoprivrednog bilja u Hrvatskoj. Kozumplik, V., Pejić, I. (ur.). Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet; Zagreb 77–80.
- Krizmanić, M., Liović, I., Mijić, A., Krizmanić, G., Šimić, B., Duvnjak, T., Bilandžić, M., Marinković, R., Gadžo, D., Markulj, A. 2012.b. Utjecaj okolina na kvantitativnih svojstva novih OS-hibrida suncokreta. *Sjemenarstvo*, 29 (3-4): 121–135.
- Kumar, T. A., Charan, B. 1998. Temperature-stress-induced impairment of chlorophyll biosynthetic reactions in cucumber and wheat. *Plant Physiol*, 117: 851–858.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of head of Bacteriophage-T4. *Nature*, 227 (5259): 680–685.
- Larkindale, J., Knight, M. R. 2002. Protection against heat stress-induced oxidative damage in *Arabidopsis* involves calcium, abscisic acid, ethylene and salicylic acid. *Plant Physiol*, 128: 682–695.
- Lazár, D. 1999. Chlorophyll a fluorescence induction. *Biochim Biophys Acta*, 1412 (1): 1–28.
- Lehninger, I., Cox, M. M., L. Nelson, D. L. 2008. *Lehninger Principles of Biochemistry*, University of Wisconsin, Madison.
- Leon, A. J., Andrade, F. H., Lee, M. 2003. Genetic analysis of seed-oil concentration

across generations and environments in sunflower. *Crop Sci.*, 43: 135–140.

Lepeduš, H., Tomašić, A., Jurić, S., Katanić, Z., Cesar, V., Fulgosi, H. 2009. Photochemistry of PSII in CYP38 *Arabidopsis thaliana* deletion mutant. *Food Technol. Biotechnol.*, 47 (3): 275–280.

Lepeduš, H., Jakopec, M., Antunović Dunić, J., Krizmanić, G., Osmanović, S., Cesar, V. 2017. Temperature-dependent chlorophyll accumulation and photosystem II assembly during etioplast to chloroplast transition in sunflower cotyledons. *Acta Bot Croat.*, 76 (1): 107–110.

Leung, D. W. M. 2015. Relationship Between Changes in Contents of Nitric Oxide and Amino Acids Particularly Proline in Plants Under Abiotic Stress. U: Gupta, D. K. i sur. (ur.). *Reactive Oxygen Species and Oxidative Damage in Plants Under Stress*, Springer International Publishing Switzerland. DOI: 10.1007/978-3-319-20421-5_14

Li, R., Guo, P., Baum, M., Grande, S., Ceccarelli, S. 2006. Evaluation of chlorophyll content and fluorescence parameters as indicators of drought tolerance in barley. *Agricul. Sci. China*, 5: 751–757.

Li, H., Xu, H., Zhang, P., Gao, M., Wang, D., Zhao, H. 2016. High temperature effects on D1 protein turnover in three wheat varieties with different heat susceptibility. *Plant Growth Regul.*, 1–9.

Lichtenthaler, H. K. 1987. Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods Enzymol.*, 148: 350–382.

Lichtenthaler, H. K. 1998. The stress concept in plants: an introduction. *Ann N Y Acad. Sci.*, 851: 187–198.

Lichtenthaler, H. K., Burkart, S. 1999. Photosynthesis and high light stress. *Bulg. J. Plant Physiol.*, 25 (3–4): 3–16.

Lin, Z.-H., Chen, L.-S., Chen, R.-B., Zhang, F.-Z., Jiang, H.-X., Tang, N. 2009. CO₂ assimilation, ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase, carbohydrates and photosynthetic electron transport probed by the JIP-test, of tea leaves in response to phosphorus supply. *BMC Biology*, 9: 43.

Liović, I., Mijić, A., Markulj Kulundžić, A., Duvnjak, T., Gadžo, D. 2017. Utjecaj vremenskih uvjeta na urod zrna, sadržaj ulja i urod ulja novih os hibrida suncokreta. *Poljoprivreda*, 23 (1): 34–39.

Lu, P., Sang, W.-G., Ma K.-P. 2007. Activity of stress-related antioxidative enzymes in the invasive plant crofton weed (*Eupatorium adenophorum*). *J Integr Plant Biol*, 49 (11):

1555–1564.

Madhava Rao, K. V. 2006. Introduction. In: Madhava Rao, K. V., Raghavendra, A. S., Janardhan Reddy, K. (ur.). *Physiology and molecular biology of stress tolerance in plants*. Springer, Dordrecht, 1–14.

Marinković, R., Dozet, B., Vasic, D., 2003. *Oplemenjivanje suncokreta*. Monografija. Novi Sad, Školska knjiga.

Marinković, R., Jocković, M., Jocić, S., Ćirić, M. 2011. Variability of Plant Height and Head Diameter in New Hybrid Combinations of Sunflower. *Ratar. Povrt.*, 48 (1): 239–244.

Markulj Kulundžić, A., Kovačević, J., Viljevac Vuletić, M., Josipović, A., Liović, I., Mijić, A., Lepeduš, H., Matoša Kočar, M. 2016. Impact of abiotic stress on photosynthetic efficiency and leaf temperature in sunflower. *Poljoprivreda*, 22 (2): 17–22.

Martre, P., Quilot-Turion, B., Luquet, D., Memmah, M-M. O-S., Chenu, K., Debaeke, P. 2015. Model-assisted phenotyping and ideotype design. U: Sadras, V. O., Calderini, D., (ur.). *Crop physiology*. San Diego: Elsevier, 349–373.

Marutani, Y., Yamauchi, Y. K. Y., Mizutani, M, Sugimoto, Y. 2012. Damage to photosystem II due to heat stress without light-driven electron flow: involvement of enhanced introduction of reducing power into thylakoid membranes. *Planta*. 236: 753–761. DOI:10.1007/s00425-012-1647-5

Mathé, C., Barre, A., Jourda, C., Dunand, C. 2010. Evolution and expression of class III peroxidases. *Arch Biochem Biophys*, 500: 58–65.

Maxwell, K., Johnson, G. N. 2000. Chlorophyll fluorescence - a practical guide. *J Exp Bot*, 51 (345): 659–668.

Meher, Shivakrishna, P., Ashok Reddy, K., Manohar Raoa, D. 2018. Effect of PEG-6000 imposed drought stress on RNA content, relative water content (RWC), and chlorophyll content in peanut leaves and roots. *Saudi J Biol Sci.*, 25 (2): 285–289.

Mendoza, M. 2011. Oxidative burst in plant-pathogen interaction. *Biotecnol Veg*, 11: 67–75.

McGraw-Hill. 2007. *Photosynthesis*. Encyclopedia of Science & Technology 13. New York.

Melis, A. 1999. Photosystem-II damage and repair cycle in chloroplasts: what modulates the rate of photodamage in vivo? *Trends Plant Sci.*, 4: 1360–1385.

Miller, G., V., Shulaev, V., R., Mittler, R. 2008. Reactive oxygen signaling and abiotic stress. *Physio. Plant*, 133: 481–489.

Milone, M. T., Sgherri, C., Clijsters, H., Navari-Izzo, F. 2003. Antioxidative responses of wheat treated with realistic concentrations of cadmium. *Environ Exp Bot*, 50: 265–273.

Mishra, R. K., Singhal, G. S. 1992. Function of photosynthetic apparatus of intact wheat leaves under high light and heat stress and its relationship with peroxidation of thylakoid lipids. *Plant Physiol.*, 98: 1–6.

Mittler, R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci.*, 7 (9): 405–410.

Mittler, R. 2006. Abiotic stress, the field environment and stress combination. *Trends Plant Sci.*, 11 (1): 15–19.

Mittler, R., Vanderauwera, S., Suzuki, N., Miller, G., Tognetti, V. B., Vandepoele, K., Gollery, M., Shulaev, V., van Breusegem, F. 2011. ROS signaling: the new wave? *Trends Plant Sci.*, 16: 300–309.

Mijić, A., Krizmanić, M., Liović, I., Bilandžić, M., Zdunić, Z., Kozumplik, V. 2005. Procjena kombinacijskih sposobnosti i genetskih učinaka za visinu biljke i promjer glave suncokreta. *Poljoprivreda*, 11 (2): 18–23.

Mijić, A., Krizmanić, M., Liović, I., Bilandžić, M., Kovačević, J., Lalić, A., Kozumplik, V., Gunjača, J. 2008. Combining abilities and gene effects of sunflower grain and oil yield. *Period Biol.*, 110 (3): 277–284.

Mijić, A., Liović, I., Kovačević, V., Pepó, P. 2012. Impact of weather conditions on variability in sunflower yield over years in eastern part of Croatia and Hungary. *Acta Agron Hung.*, 60: 397–404.

Mijić, A., Liović, I., Sudarić, A., Gadžo, D., Jovović, Z., Jankulovska, M., Markulj Kulundžić, A., Duvnjak, T. 2017. The effect of environment on the phenotypic expression of grain yield, oil content and oil yield in sunflower hybrids. *Agriculture and Forestry*, 63 (1): 309–318.

Miklić, V., Balalić, I., Jocić, S., Marinković, R., Cvejić, S., Hladni, N., Miladinović, D. 2012. Rezultati mikro-ogleda suncokreta u 2011. i preporuka sortimenta za setvu u 2012. godini. *Zbornik referata sa 46. Savetovanja agronoma Srbije, Zlatibor*, 7–18.

Milošević, M., Kobiljski, B. 2011. Semenska proizvodna suncokreta. U: *Semenarstvo II monografija*. Institut za ratarstvo i povtarstvo, Novi Sad. 194–265.

Milošević, D., Savić, S. M., Stojanović, V., Popov-Raljić, J. 2015. Effects of precipitation and temperatures on crop yield variability in Vojvodina (Serbia). *Ital J Agrometeorol.*, 20 (3): 35–46.

Mishra, K. M., Iannacone, R., Petrozza, A., Mishra, A., Armentano, N., La Vecchia, G.,

- Trtílek, M., Cellini, F., Nedbal, L. 2012. Engineered drought tolerance in tomato plants is reflected in chlorophyll fluorescence emission. *Plant Sci.*, 182: 79–86.
- Mlinarić, S., Antunović Dunić, J., Štolfa, I., Cesar, V., Lepeduš, H. 2016. High irradiation and increased temperature induce different strategies for competent photosynthesis in young and mature fig leaves. *S. Afr. J. Bot.*, 103: 25–31.
- Mondal, S., Singh, R. P., Crossa, J., Huerta-Espino, J., Sharma, I., Chatrath, R., Singh, G. P., Sohu, V. S., Mavi, G. S., Sukaru, V. S. P., Kalappanavarg, I. K., Mishra, V. K., Hussain, M., Gautam, N. R., Uddin, J., Barma, N. C.D., Hakim, A., Joshi, A. K. 2013. Earliness in wheat: a key to adaptation under terminal and continual high temperature stress in south Asia. *Field Crops Res*, 151: 19–26. DOI:10.1016/j.fcr.2013.06.015
- Mullan, D., Julian Pietragalla, J. 2012. Canopy temperature, stomatal conductance and water relation traits. U: Pask, A., Pietragalla, J., Mullan, D., Reynolds, M. (ur.). *WHEAT Physiological Breeding II: A Field Guide to Wheat Phenotyping*. CIMMYT, 25–27.
- Murchie, E. H., Lawson, T. 2013. Chlorophyll fluorescence analysis: a guide to good practice and understanding some new applications. *J. Exp. Bot.*, 64 (13): 3983–3998.
- Mustafa, H.S.B., Mahmood, T., Ullah, A., Sharif, A., Bhatti, A.N., Nadeem, M., Ali, R. 2017. Role of seed priming to enhance growth and development of crop plants against biotic and abiotic stresses. *Bull. Bio. All. Sci. Res.*, 2:2.
- Nair, A. S., Abraham, T. K., Jaya, D. S. 2008. Studies on the changes in lipid peroxidation and antioxidants in drought stress induced cowpea (*Vigna unguiculata* L.) varieties. *J Environ Biol*, 29 (5): 689–691.
- Nandha, R., Singh, H., Garg, K., Rani, S. 2014. Therapeutic potential of sunflower seed: an overview. *IJRDP*, 3 (3): 967-972.
- Nelson, N., Ben-Shem, A. 2005. The structure of photosystem I and evolution of photosynthesis. *BioEssays*, 27: 914–922.
- Noctor, G., Foyer, C. H. 1998. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 49: 249–279.
- Oguchi, R., Hikosaka, K., Hirose, T., 2003. Does the photosynthetic light-acclimation need change in leaf anatomy? *Plant Cell Environ.*, 26: 505–512.
- Onemli, F. 2012. Impact of climate changes and correlations on oil fatty acids in sunflower. *Pak. J. Agri. Sci.*, 49 (4): 455–458.
- Panero, J. L., Funk, V. A. 2002. Toward a phylogenetic subfamilial classification for the *Compositae* (*Asteraceae*). *P. Biol. Soc. Wash.*, 115: 909–922.

- Parry, M. A. J., Andralojc, P. J., Parmar, P. J., Keys, A. J., Habash, D., Paul, M. J., Alred, R., Quick, W. P., Servaites, J. C. 1997. Regulation of Rubisco by inhibitors in the light. *Plant Cell Environ.*, 20: 528–534.
- Passardi, F., Cosio, C., Penel, C., Dunand, C. 2005. Peroxidases have more functions than a Swiss army knife. *Plant Cell Reports*, 24 (5): 255–265.
- Pastanes, C., Horton, P. 1999. Resistance of photosynthesis to high temperature in two bean varieties (*Phaseolus vulgaris* L.). *Photosyn. Res.*, 62: 197–203.
- Pavlovič, A., Stolárik, T., Nosek, L., Kouřil, R., Ilík, P. 2016. Light-induced gradual activation of photosystem II in dark-grown Norway spruce seedlings. *Biochim. Biophys. Acta*, 1857: 799–809.
- Pekcan, V., Evcı, G., Yılmaz, M.I., Nalcaiyi, A.S.B., Erdal, Ş.Ç., Cicek, N., Ekmekci, Y., Kaya, Y., 2015. Drought effects on yield traits of some sunflower inbred lines. *Agri. For.*, 61 (4): 101–107.
- Pellinen, R. 2001. Hydrogen peroxide in inducible plant stress responses. Academic dissertation, Faculty of Science, University of Helsinki.
- Pérez-Torres, E. E., Peredes, M., Polonco, V. V., Becerra V. 2009. Gene expression analysis: a way to study tolerance to abiotic stresses in crops species. *Chil. J. Agric. Res.*, 69 (2): 260–269.
- Pevalek-Kozlina, B. 2003. Fiziologija bilja. Profil, Zagreb, Hrvatska.
- Pfündel, E. 1998. Estimating the contribution of photosystem I to total leaf chlorophyll fluorescence. *Photosynth Res.*, 56: 185–195.
- Poormohammad Kiani, S. Grieu, S., P., Hewezi, P., Gentzbittel, L., Sarrafi, A. 2007a. Genetic variability for physiological traits under drought conditions and differential expression of water stress-associated genes increased sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Theor. Appl Genet.*, 114: 193–207.
- Poormohammad Kiani, S., Talia, P., Maury, P., Grieu, P., Heinz, R., Perrault, A., Nishinakamasu, V., Hopp, E., Gentzbittel, L., Paniego, N., Sarrafi, A. 2007b. Genetic analysis of plant water status and osmotic adjustment in recombinant inbred lines of sunflower under two water treatments. *Plant Sci.*, 172: 773–787.
- Porcar-Castell, A. 2008. Studying the diurnal and seasonal acclimation of photosystem II using chlorophyll-a fluorescence. Academic dissertation, University of Helsinki, Helsinki. 1795–7389.
- Potters, G., Pasternak, T. P., Guisez, Y., Jansen, M. A. K. 2009. Different stresses, similar

morphogenic responses: integrating a plethora of pathways. *Plant Cell Environ.*, 32: 158–169.

Pospišil, M. 2013. Ratarstvo. II. dio - industrijsko bilje. Zrinski d.d. Čakovec

Pospišil, P. 2016. Production of Reactive Oxygen Species by Photosystem II as a Response to Light and Temperature Stress. *Front. Plant Sci.*, 7: 1950. DOI: 10.3389/fpls.2016.01950

Prasad, S. M., Dwivedi, R., Zeeshan, M. 2005. Growth, photosynthetic electron transport, and antioxidant responses of young soybean seedlings to simultaneous exposure of nickel and UV-B stress. *Photosynthetica*, 43: 177–185.

Qu, A. L., Ding, Y. F., Jiang, Q., Zhu, C. 2013. Molecular mechanisms of the plant heat stress response. *Biochem Bioph Res Co.*, 432: 203–207.

Răcuciu, M., Creanga, D. E. 2007. Influence of water-based ferrofluid upon chlorophylls in cereals. *J Magn Magn Mater*, 311: 291–294.

Radić, S. 2007. Određivanje aktivnosti enzima stresa u biljkama. U: Ambrović Ristov, A., Brozović, A., Bruvo Mađarić, B., Četković, H., Herak Bosnar, M., Hranilović, D., Katušić Hećimović, S., Meštrović Radan, N., Mihaljević, S., Slade, N., Vujaklija, D. (ur.) Metode u molekularnoj biologiji. Institut Ruđer Bošković, Zagreb. 890–900.

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

Redondo-Gómez, S. 2013. Abiotic and Biotic Stress Tolerance in Plants. U: Ranjan Rout, G., Bandhu Das, A. (ur.) Molecular Stress Physiology of Plants. Springer, 1–21.

Rajeevkumar, S., Jagadeesan, H., Ramalingam, S. 2015. Transgenic Plants and Antioxidative Defense: Present and Future? U: Gupta, D. K. i sur. (ur.). Reactive Oxygen Species and Oxidative Damage in Plants Under Stress, Springer International Publishing Switzerland. DOI: 10.1007/978-3-319-20421-5_15

Robakowski, P., Antczak, P. 2008. Ability of silver fir and European beech saplings to acclimate photochemical processes to the light environment under different canopies of trees. *Pol. J. Ecol.*, 56 (1): 3–16.

Robert, G.A., Rajasekar, M., Manivannan, P., 2016. Triazole-induced drought stress amelioration on growth yield, and pigments composition of *Helianthus annuus* L. (sunflower). *Int. Multidiscip. Res. J.*, 5: 6–15.

Roháček, K., Soukupová, J., Barták, M. 2008. Chlorophyll fluorescence: A wonderful tool to study plant physiology and plant stress. U: Schoefs, B. (ur.), Plant Cell Compartments -

Selected Topics, 1st edition. Kerala - India: Research Signpost, 41-104. ISBN 978-81-308-0104-9.

Romić, D., Petošić, D., Stričević, I., Ondrašek, G., Rus, B., Kondres, N., Maurović, N. 2006. Hidropedološka studija s idejnim rješenjem navodnjavanja proizvodnih površina Poljoprivrednog instituta Osijek. Agronomski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zavod za poljoprivredne melioracije, Zagreb.

Roy, S. J., Tucker, E. J., Tester, M. 2011. Genetic analysis of abiotic stress tolerance in crops. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 14 (3): 232–239. DOI: 10.1016/j.pbi.2011.03.002.

Ruelland, E., Zachowski, A. 2010. How plants sense temperature. *Environ Exp Bot*, 69: 225–232. DOI:10.1016/j.envexpbot.2010.05.011

Sade, N., Galkin, E., Moshelion, M. 2015. Measuring Arabidopsis, Tomato and Barley Leaf Relative Water Content (RWC). *Bio-protocol*, 5 (8): 1–4. DOI: 10.21769/BioProtoc.1451

Saidi, I., Yousfi, N., Borgi, M. A. 2017. Salicylic Acid Improves the Antioxidant Ability against Arsenic-Induced Oxidative Stress in Sunflower (*Helianthus Annuus*) Seedling. *J Plant Nutr*, 40 (16): 2326-2335. DOI: 10.1080/01904167.2017.1310888

Sairam, R. K., Singh, D. V., Srivastova, G. C. 2003. Changes in activities of antioxidant enzymes in sunflower leaves of different ages. *Biol Plantarum*, 47 (1): 61–66.

Saleem-ud-Din, Khan, M. A., Gull, S., Usman, K., Saleem, F. Y., Sayal, O. U. 2014. Line × tester analysis of yield and yield related attributes indifferent sunflower genotypes. *Pak. J. Bot.*, 46 (2): 659–665.

Sánchez-Reinoso, A. D., Ligarreto-Moreno, G. A., Restrepo-Díaz, H. 2018. Physiological and biochemical expressions of a determinated growth common bean genotype (*Phaseolus vulgaris* L.) to water deficit stress periods. *J. Anim. Plant Sci.*, 28 (1): 119–127.

Sarazin, V., Duclercq, J., Guillot, X., Sangwan, B., Sangwan, R. S. 2017. Water-stressed sunflower transcriptome analysis revealed important molecular markers involved in drought stress response and tolerance. *Environ. Exp. Bot.*, 142: 45–53.

Schansker, G., Tóth, S. Z., Strasser, R. J. 2005. Methylviologen and dibromothymoquinone treatments of pea leaves reveal the role of photosystem I in the Chl a fluorescence rise OJIP. *Biochim Biophys Acta*, 1706: 250–261.

Schneiter, A. A., Miller, J. F. 1981. Description of sunflower growth stages. *Crop Sci.*, 21: 901–903.

Schneider, C. 2009. An update on products and mechanisms of lipid peroxidation. *Mol.*

Nutr. Food Res., 53: 315-321.

Schreiber, U., Bilger, W., Neubauer, C. 1994. Chlorophyll fluorescence as a non-destructive indicator for rapid access assessment of in vivo photosynthesis. Schulze E. D., Caldwell M. M. (ur.). Ecophysiology of photosynthesis, Berlin, Njemačka, Springer. 49–70.

Semenov, M. A., Stratonovitch, P., Alghabari, F., Gooding, M. J. 2014. Adapting wheat in Europe for climate change. J. Cereal Sci., 59, 245–256.

Shan, C., Wang, Y. 2017. Exogenous salicylic acid-induced nitric oxide regulates leaf water condition through root osmoregulation of maize seedlings under drought stress. Braz. J. Bot., 40 (2): 591–597. DOI 10.1007/s40415-016-0355-y

Sharma, P., Jha, A. B., Dubey, R. S., Pessarakli, M. 2012. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. J Bo., 1–26. ID 217037.

Sharma, D. K., Andersen, S. B., Ottosen, C. O., Rosenqvist, E. 2015. Wheat cultivars selected for high Fv/Fm under heat stress maintain high photosynthesis, total chlorophyll, stomatal conductance, transpiration and dry matter. Physiol. Plant., 153: 284–298.

Sharkey, T. D., Ducruet, J.-M., Parry, M. A. J. 2014. Chapter 2 - Biochemistry and photochemistry of terrestrial photosynthesis: a synopsis. U: Flexas, J., Loreto, F., Medrano, H. (ur.). Terrestrial Photosynthesis in a Changing Environment a Molecular, Physiological, and Ecological Approach., Cambridge University Press, 9–19.

Shell, G. S. G., Lang, A. R. G. 1976. Movements of sunflower leaves over a 24-h. Period Agric. Meteorol., 16: 161–170.

Shu-han, Z., Xue-feng, X., Ye-min, S., Jun-lian, Z., Chao-zhou, L. 2018. Influence of drought hardening on the resistance physiology of potato seedlings under drought stress. J Integr Agric., 17 (2): 336–347.

Siegel, B. Z., Galston, W. 1967. The peroxidase of *Pisum sativum*. Plant Physiol., 42: 221–226.

Silva, M., Jifon, J., Da Silva, J., Sharma, V. 2007. Use of physiological parameters as fast tools to screen for drought tolerance in sugarcane. Braz. J.Plant Physiol., 19: 193–201. DOI: 10.1590/S1677-04202007000300003

Singh, B. D. 2000. Plant breeding-principies and methods. Kalyani Publishers. Ludhiana, New Delhi, Noida, India. 1–896.

Smith, B. N., Harris, L. C., McCarlie, V. W., Stradling, D. L., Thygersen, T., Walker, J.,

Criddle, R. S., Hansen, L. D. 2001. Time, plant growth, respiration, and temperature. U: Pessarakli, M. (ur.). Handbook of plant and crop physiology. Marcel Dekker, New York, 1–12.

Soleimanzadeh, H., Habibi, D., Ardakani, M. R., Paknejad, F., Rejali, F., 2010. Effect of potassium levels on antioxidant enzymes and malondialdehyde content under drought stress in sunflower (*Helianthus annuus* L.). Am. J. Agric. Biol. Sci., 5 (1), 56–61.

Sorić, M. R. 1983. Fiziologija biljaka. Četvrto izdanje, Vidanović, B. (ur.). Naučna knjiga Beograd.

Stahl, W., Sies, H. 2003. Antioxidant activity of carotenoids. Molecular Aspects of Medicine, 24: 345–351.

Statistički ljetopis Republike Hrvatske 2016.
https://www.dzs.hr/Hrv_Eng/ljetopis/2016/sljh2016.pdf (3. 11. 2017.)

Strasser, B. J., Strasser, R. J. 1995. Measuring fast fluorescence transients to address environmental questions: the JIP- Test. U: Mathis, P. (ur.). Photosynthesis: from light to biosphere, Kluwer academic publishers, The Netherlands.

Strasser, R. J., Srivastava, A., Tsimilli-Michael, M. 2000. The fluorescent transient as a tool to characterise and screen photosynthetic samples. U: Yunus, M., Pathre, U., Mohanty, P. (ur.). Probing photosynthesis: Mechanisms, regulation and adaptation. Taylor and Francis, London, 445-483.

Strasser, R. J., Tsimilli-Michael, M., Srivastava, A. 2004. Analysis of the fluorescence transient. U: George, C., Papageorgiou, C., Govindjee (ur.). Chlorophyll Fluorescence: A Signature of Photosynthesis. Advances in Photosynthesis and Respiration Series. Springer, Dordrecht, 321–362.

Strasser, R. J., Tsimilli-Michael, M., Qiang, S., Goltsev, V. 2010. Simultaneous in vivo recording of prompt and delayed fluorescence and 820-nm reflection changes during drying and after rehydration of the resurrection plant *Haberlea rhodopensis*. Biochim. Biophys. Acta, 1797: 1313–1326.

Strauss, A. J., Kruger, G. H. J., Strasser, R. J., van Heerden, P. D. R. 2006. Ranking of dark chilling tolerance in soybean genotypes probed by the chlorophyll a fluorescence transient O-J-I-P. Environ Exp Bot, 56: 147–157.

Stryer, L., Berg, J. M., Tymoczko, J. L. 2006. Biochemistry. Sixth edition, W. H. Freeman and Company, New York, 541–588.

Stirbet, A., Govindjee, R. 2012. Chlorophyll a fluorescence induction: a personal

perspective of the thermal phase, the J-I-P rise. *Photosynth Res*, 113: 15–61.

Su, X. Y., Wu, S., Yang, L., Xue, R. L., Li, H., Wang, Y. X., Zhao, H. J. 2014. Exogenous progesterone alleviates heat and high light stress-induced inactivation of photosystem II in wheat by enhancing antioxidant defense and D1 protein stability. *Plant Growth Regul.*, 74: 311–318.

Swindell, W. R., Huebner, M., Weber, A, P. 2007. Transcriptional profiling of *Arabidopsis* heat shock proteins and transcription factors reveals extensive overlap between heat and non-heat stress response pathways. *BMC Genomics*, 8: 125.

Šimić, B., Ćosić, J., Liović, I., Krizmanić, M., Poštić, J. 2008a. The influence of weather conditions on eco-nomic characteristics of sunflower hybrids in macro experiments from 1997 to 2007. *Proc. 17th International Sunflower Conference, Córdoba, Spain*, 261–263.

Šimić, B., Ćosić, J., Popović, R., Vrandečić, K. 2008b. Influence of climate conditions on grain yield and appearance of white rot (*Sclerotinia sclerotiorum*) in field experiments with sunflower hybrids. *Cereal Res. Commun.*, 36: 63–66.

Šimić, D., Lepeduš, H., Jurković, V., Antunović, J., Cesar, V. 2014. Quantitative genetic analysis of chlorophyll a fluorescence parameters in maize in the field environments. *J Integr Plant Biol*, 56 (7): 695–708.

Škorić, D. 2009. Sunflower breeding for resistance to abiotic stresses. *Helia*, 32 (50): 1–16.

Škorić, D. 2012. Sunflower breeding for resistance to abiotic stress. U: Škorić, D, Sakač, Z. (ur.). *Sunflower genetics and breeding*. Serbian Academy of Sciences and Arts Branch in Novi Sad, Republic of Serbia, 245–255.

Tabatabaei, S. A., Rafiee, V., Shakeri, E., Salmani, M. 2012. Responses of Sunflower (*Helianthus Annus* L.) to Deficit Irrigation at Different Growth Stages. *IJARR*, 2 (5): 624-629.

Teklić, T., Engler, M., Cesar, V., Lepeduš, H., Parađiković, N., Lončarić, Z., Štolfa, I., Marotti, T., Mikac, N., Žarković, N. 2008. Influence of excess copper on lettuce (*Lactuca sativa* L.) grown in soil and nutrient solution. *J Food Agric Environ*, 6 (3&4): 439–444.

Tenhaken, R. 2015. Cell wall remodeling under abiotic stress, *Frontiers in plant science*, 5 (771): 1–9.

Tezara, W., Mitchall, V., Driscoll, S. P., Lawlor, D. W. 2002. Effects of water deficit and its interaction with CO₂ supply on the biochemistry and physiology of photosynthesis in sunflower. *J Exp Bot*, 375: 1781–1791.

- Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76 (9): 4350–4354.
- Tsimilli-Michael, M., Eggenberg, P., Biro, B., Köves-Pechy, K., Vörös, I., Strasser, R. J. 2000. Synergistic and antagonistic effects of arbuscular mycorrhizal fungi and *Azospirillum* and *Rhizobium* nitrogen-fixers on the photosynthetic activity of alfalfa, probed by the polyphasic chlorophyll a fluorescence transient O-J-I-P. *Agric., Ecosyst. Environ., Appl. Soil Ecol.*, 15: 169–182.
- Ugarte, C., Calderini, D. F., Slafer, G. A. 2007. Grain weight and grain number responsiveness to pre-anthesis temperature in wheat, barley and triticale. *Field Crops Res*, 100: 240–248. DOI:10.1016/j.fcr.2006.07.010
- Umena, Y., Kawakami, K., Shen, J. R., Kamiya, N. 2011. Crystal structure of oxygen-evolving photosystem II at a resolution of 1.9 Å. *Nature*, 473: 55–60.
- Uzilday, B., Ozgur, R., Sekmen, A. H., Turkan, I. 2015. Redox Regulation and Antioxidant Defence During Abiotic Stress: What Have We Learned from *Arabidopsis* and Its Relatives? U: Gupta, D. K. i sur. (ur.). *Reactive Oxygen Species and Oxidative Damage in Plants Under Stress*, Springer International Publishing Switzerland. DOI 10.1007/978-3-319-20421-5_4
- van Berkum, E. 2008. Leaf temperature and the speed of growth. (<http://blog.maripositas.org/horticulture/leaftemperature-and-the-speed-of-growth>)
- Verma, S., Dubey, R. S. 2003. Lead toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants. *Plant Sci.*, 164 (4): 645–655.
- Viljevac, M., Dugalić, K., Mihaljević, I., Šimić, D., Sudar, R., Jurković, Z., Lepeduš, H. 2013. Chlorophyll content, photosynthetic efficiency and genetic markers in two sour cherry (*Prunus cerasus* L.) genotypes under drought stress. *Acta Bot Croat*, 72 (2): 221–235.
- Vojta, L., Carić, D., Cesar, V., Antunović Dunić, J., Lepeduš, H., Kveder, M., Fulgosi, H. 2015. TROL-FNR interaction reveals alternative pathways of electron partitioning in photosynthesis. *Sci Rep*, 5: 10085.
- Voet, D., Voet, J. G. 2004. *Biochemistry*. John Wiley & Sons, Inc., New York, 871–909.
- Vranová, E., Inzé, D., van Breusegem, F. 2002. Signal transduction during oxidative stress. *J. Exp. Bot.*, 53 (372): 1227–1236.
- Vratarić, M. i suradnici 2004. Suncokret *Helianthus annuus* L. Poljoprivredni institut

Osijek.

Vrebalov, T. 1972. The role of leaves in the process of kandel yield and oil content formation in sunflower. Proc. of 5th Inter. Sunfl. Conf., Clermont-Ferrand, France: 57–62.

Vukadinović, V., Jug, I., Đurđević, B. 2012. Ekofiziologija bilja. Miklavčić, D. (ur.), Neformalna savjetodavna služba.

Wahid, A., Gelani, S., Ashraf, M., Foolad, M. R. 2007. Heat tolerance in plants: an overview. Environ Exp Bot, 61:199–223.

Wang, L. J., Huang, W. D., Li, J. Y., Liu, Y. F., Shi, Y. L. 2004. Peroxidation of membrane lipid and Ca²⁺ homeostasis in grape mesophyll cells during the process of cross-adaptation to temperature stresses. Plant Sci., 167 (1): 71–77.

Wang, H., Wang, F., Wang, G., Majourhat, K. 2007. The responses of photosynthetic capacity, chlorophyll fluorescence and chlorophyll content of nectarine (*Prunus persica* var. *Nectarina Maxim*) to greenhouse and field grown conditions. Sci Hort, 112: 66–72.

Weldearegay, D. F., Yan, F., Jiang, D., Liu, F. 2012. Independent and Combined Effects of Soil Warming and Drought Stress During Anthesis on Seed Set and Grain Yield in Two Spring Wheat Varieties. J Agron Crop Sci, 1–9.

Wewerinke, M., Yu III, V. P. 2010. Addressing climate change through sustainable development and the promotion of human rights. South Centre, Geneva, Switzerland. Dostupno na: https://www.southcentre.int/wp-content/uploads/2013/05/RP34_Climate-Change-Sustainable-Development-and-Human-Rights_EN.pdf

Whitney, K. D., Randell, R. A., Rieseberg, L. H. 2010. Adaptive introgression of abiotic tolerance traits in the sunflower *Helianthus annuus*. New Phytol., 187: 230–239. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2010.03234.x

Xu, Q. S., Hu, J. Z., Xie, K. B., Yang, H. Y., Du, K. H., Shi, G. X. 2010. Accumulation and acute toxicity of silver in *Potamogeton crispus* L. J Hazard Mater, 173: 186–193.

Yamamoto, Y., Aminaka, R., Yoshioka, M., Khatoon, M., Komayama, K., Takenaka, D., Yamashita, A., Nijo, N., Inagawa, K., Morita, N., Sasaki, T., Yamamoto, Y. 2008. Quality control of photosystem II: impact of light and heat stress. Photosynth. Res., 98: 589–608.

Yamori, W., Evans, J. R., von Caemmerer, S. 2010. Effects of growth and measurement light intensities on temperature dependence of CO₂ assimilation rate in tobacco leaves. Plant Cell Environ, 33: 332–343.

Yamori, W., Hikosaka, K., Way, D. A. 2014. Temperature response of photosynthesis in C₃, C₄, and CAM plants: temperature acclimation and temperature adaptation. Photosynth

Res, 119: 101–117.

Yoshida, K., Kaothien, P., Matsui, T., Kawaoka, A., Shinmyo, A. 2002. Molecular biology and application of plant peroxidase genes, *Appl. Microb. Biotech.*, 60: 665–670.

Zaman, N. K., Abdullah, M. Y., Othman, S., Zaman, N. K. 2018. Growth and Physiological Performance of Aerobic and Lowland Rice as Affected by Water Stress at Selected Growth Stages. *Rice Science*, 25 (2): 82–93.

Zaninović, K., Gajić-Čapka, M., Perčec Tadić, M. i sur. 2008. Klimatski atlas Hrvatske/Climate atlas of Croatia 1961.–1990., 1971.–2000. Državni hidrometeorološki zavod, Zagreb.

Zhang, F., Wang, Y., Lou, Z., Dong, J. 2007. Effect of heavy metal stress on antioxidative enzymes and lipid peroxidation in leaves and roots of two mangrove plant seedlings (*Kandelia candel* and *Bruguiera gymnorhiza*). *Chemosphere*, 67: 44–50.

Zhang, C., Shi, S., Wang, B., Zhao, J. 2018. Physiological and biochemical changes in different drought-tolerant alfalfa (*Medicago sativa* L.) varieties under PEG-induced drought stress. *Acta Physiol. Plant.*, 40: 25. <https://doi.org/10.1007/s11738-017-2597-0>

Zivcak, M., Brestic, M., Kunderlikova, K., Sytar, O., Allakhverdiev, S. I. 2015. Repetitive light pulse-induced photoinhibition of photosystem I severely affects CO₂ assimilation and photoprotection in wheat leaves. *Photosynth. Res.*, 126, 449–463.

Zmaić, K., Sudarić, T., Majdak, T., Nedić, I. 2014. Ekonomski rezultati proizvodnje suncokreta u Republici Hrvatskoj. U: Marić, S., Lončarić, Z. (ur.). 49. hrvatski i 9. međunarodni simpozij agronoma, 16. - 21. veljače, Dubrovnik, Hrvatska. 186–190.

8. SAŽETAK

Suncokret (*Helianthus annuus* L.) je poljoprivredna ratarska kultura koja djelomično dobro podnosi utjecaj abiotskih čimbenika u odnosu na druge ratarske kulture. Unatoč tome, abiotski čimbenici mogu negativno utjecati na rast i razvoj suncokreta te izazivati njegovu smanjenu produktivnost i reprodukciju sposobnost. Sinergijsko djelovanje toplinskog i svjetlosnog stresa u dosadašnjim istraživanjima nije u potpunosti razjašnjeno. Iz tog razloga, ciljevi ovog istraživanja bili su utvrditi razlike između istraživanih hibrida suncokreta u fazi cvatnje po vrijednostima parametara fotosintetske učinkovitosti te biokemijskih parametara stresa, što bi trebalo poslužiti kao indikator prilikom utvrđivanja tolerantnosti i rodosti hibrida u stresnim uvjetima uzgoja uzrokovanih povišenim temperaturama i suviškom svjetlosti. Također je cilj bio istražiti razlike između dva odabrana hibrida različitih fizioloških i biokemijskih karakteristika u mehanizmima regulacije učinkovitosti fotosustava II u uvjetima okolišnog stresa uzrokovano povišenom temperaturom i suviškom svjetlosti.

U svrhu istraživanja provedene su fiziološke i biokemijske analize, ispitana je fotosintetska učinkovitost na listovima osam hibrida suncokreta te je utvrđeno agronomsko svojstvo urod zrna. Istraživanje je provedeno u poljskim uvjetima u fazi cvatnje na odabranim biljkama iz srednja dva posijana reda. Obuhvaćalo je procjenu reakcija biljaka suncokreta na uvjete toplinskog i svjetlosnog stresa pomoću analiza za određivanje relativnog sadržaja vode u listovima, razine lipidne peroksidacije, ukupne i specifične aktivnosti enzima gvajakol peroksidaze, koncentracije topljivih proteina, udjela suhe tvari i koncentracija fotosintetskih pigmenata. Nadalje, određeni su i fotosintetska učinkovitosti pomoću metode polifaznog rasta fluorescencije klorofila *a*, relativna akumulacija proteina kompleksa za sakupljanje svjetlosti fotosustava II Lhcb2, D1 fotosustava II, citokrom *f* i velika podjedinica Rubisco-a te urod zrna suncokreta. Sve navedene analize su provedene na uzorcima uzorkovanim u prijepodnevnim (uvjeti bez stresa) i poslijepodnevnim satima (toplinski i svjetlosni stres).

Iz provedenih analiza utvrđene su statistički značajne razlike između istraživanih hibrida suncokreta pri čemu su hibridi pokazali različitu osjetljivost na okolišni stres uzrokovan povišenim temperaturama i suviškom svjetlosti kao i različit genetski potencijal za rodost. Ujedno su potvrđene i velike fluktuacije u vrijednostima svih ispitanih parametara u uvjetima bez djelovanja stresa te tijekom djelovanja toplinskog i svjetlosnog stresa. Porast temperatura i intenziteta svjetlosti u ranim poslijepodnevnim satima doveli su do promjena u fluorescenciji klorofila *a* što je rezultiralo oštećenjem fotosintetskog aparata na svih osam testiranih hibrida uključujući i klaster analizom odabrana dva hibrida suncokreta za daljnje istraživanje. Odabrana dva hibrida su različito reagirala na stres pri čemu je kod hibrida 4 prema vrijednostima maksimalnog kvantnog prinosa fotosintetski aparat ostao funkcionalan unatoč djelovanju povišenih temperatura i suviška svjetlosti, u odnosu na hibrid 7 kod kojeg snižena vrijednost maksimalnog kvantnog prinosa ukazuje na smanjenu funkciju fotosintetskog aparata. To potvrđuju i vrijednosti parametra indeks fotosintetske učinkovitosti u stresnim uvjetima. Iako je pomoću parametara fluorescencije klorofila *a* u uvjetima djelovanja povišenih temperatura i osvjetljenja potvrđena slabija sposobnost

elektronskog transporta, vrijednosti fotosintetskog proteina velike podjedinice Rubisco u stresu su ostale podjednake onima bez djelovanja stresora. U uvjetima djelovanja toplinskog i svjetlosnog stresa potvrđena je viša relativna akumulacija proteina Lhcb2, D1 i citokroma *f*. Iz prikazanih rezultata sinergijskog djelovanja toplinskog i svjetlosnog stresa može se zaključiti kako je hibrid 7 osjetljiviji u odnosu na hibrid 4. Urod zrna suncokreta se nije razlikovao između hibrida 4 i 7 bez obzira na sve utvrđene razlike u prilagodbi na stresne uvjete. Sve navedene razlike ukazuju na prisutnost varijabilnosti genetski uvjetovane reakcije testiranih hibrida suncokreta na povišene temperature i suvišak svjetlosti. Prikazani rezultati ovog istraživanja koji opisuju utjecaj toplinskog i svjetlosnog stresa u kombinaciji mogu se koristiti za potrebe provođenja oplemenjivanja suncokreta sa svrhom povećanja otpornosti genotipova na abiotske stresore.

9. SUMMARY

The sunflower (*Helianthus annuus* L.) is one of the crops which is relatively good at tolerating the effects of abiotic factors in comparison to other crops. Nevertheless, abiotic factors can negatively affect the growth and development of sunflower decreasing productivity and reproductive ability. Synergic effect of heat and light stress has still not been fully clarified in previous researches. The aims of this research were to determine the differences between investigated sunflower hybrids in photosynthetic efficiency and biochemical stress parameters during the flowering stage which could serve as an indicator for hybrid tolerance and yield potential in elevated temperatures and excess light induced stress conditions. Also, the aim was also to investigate the differences in the regulatory mechanisms of the photosystem II efficiency between two chosen hybrids with different physiology and biochemical characteristics which were subjected to environmental stress caused by elevated temperatures and excess light.

For the purpose of this research, physiologic and biochemical analyses were made, photosynthetic efficiency on eight sunflower hybrid leaves was tested, and yield was determined. The research was conducted in field conditions during the flowering stage on plants chosen from the middle two trial plot rows. It included the assessment of sunflower plants' reaction to heat and light stresses by determining the relative water content in leaves, lipid peroxidation, total and specific guaiacol peroxidase enzyme activity, soluble protein concentration, dry matter content and photosynthetic pigment concentration. Photosynthetic efficiency was also determined by the polyphase growth of chlorophyll *a* fluorescence method. Furthermore, the relative accumulation of protein complex for light harvesting in photosystem II Lhcb2, D1 of photosystem II, cytochrome *f*, and large Rubisco subunit, as well as seed yield, were determined. All of the mentioned analyses were conducted on samples collected in the morning (no stress conditions) and afternoon hours (heat and light stress).

Conducted analyses indicated statistically significant differences between tested sunflower hybrids considering their sensitivity to environmental stress effects caused by elevated temperatures and excess light, as well as differences in their genetic yield potential. At the same time, large fluctuations of all investigated parameters were determined when comparing conditions without and with heat and light stress. The temperatures and light intensity increase in early afternoon hours led to changes in chlorophyll *a* fluorescence which resulted in reduction in efficiency of the photosynthetic apparatus in all eight tested hybrids. Moreover, two hybrids chosen by the cluster analysis for further investigations reacted differently to stress. According to maximum quantum yield values, the photosynthetic apparatus of hybrid 4 remained in function despite elevated temperatures and excess light, whereas reduced maximum quantum yield in hybrid 7 implies damaged photosynthetic apparatus. This was further confirmed by the values of photosynthetic efficiency index in stressful conditions. Although chlorophyll *a* fluorescence values determined during elevated temperature and excess light conditions prove that electron transport ability was weaker, Rubisco large subunit values during stress remained almost the same as in no stress conditions. The occurrence of higher Lhcb2 protein, D1 and

cytochrome *f* relative accumulation was also proven in heat and light stress conditions. The results of the synergistic effects of heat and light stress on the two selected hybrids lead to the conclusion that hybrid 7 is more sensitive than hybrid 4. Despite the differences in adaptation to stressful conditions between hybrids 4 and 7, there was no significant difference in their seed yield. Determined differences between those hybrids indicate the variability of the genetically conditioned reaction of tested sunflower hybrids to elevated temperatures and excess light. The results of this research, which describe the effects of heat and light stress in combination, can be used for the purposes of sunflower breeding programmes which aim to increase genotypes' resistance to abiotic stressors.

10. PRILOZI

Tablica 3. Srednje vrijednosti i standardne devijacije istraživanih parametara hibrida suncokreta izračunate iz dobivenih vrijednosti mjerenja tijekom prijepodnevni i poslijepodnevni sati.

Vrijeme mjerenja/ Hibrid	Hibrid 1	Hibrid 2	Hibrid 3	Hibrid 4	Hibrid 5	Hibrid 6	Hibrid 7	Hibrid 8
Relativni sadržaj vode u %								
Prijepodne	65,53 ± 2,23	73,23 ± 2,37	65,51 ± 4,21	67,95 ± 2,45	70,11 ± 2,32	71,28 ± 3,04	64,58 ± 2,09	67,49 ± 3,12
Poslijepodne	66,52 ± 3,53	67,71 ± 5,85	67,47 ± 4,12	65,20 ± 3,40	70,77 ± 1,84	65,89 ± 2,73	58,73 ± 2,90	60,19 ± 3,49
Razina lipidne peroksidacije u nmol g⁻¹ svježe tvari								
Prijepodne	9,85 ± 0,39	8,64 ± 0,46	7,30 ± 0,71	7,20 ± 0,81	7,63 ± 0,51	8,24 ± 0,44	9,34 ± 0,23	8,27 ± 0,84
Poslijepodne	8,12 ± 0,40	8,51 ± 0,42	8,11 ± 0,41	7,68 ± 0,36	7,83 ± 0,31	8,35 ± 0,43	9,89 ± 0,30	9,18 ± 0,97
Ukupna aktivnost enzima gvajakol peroksidaza u min⁻¹ g⁻¹ svježe tvari								
Prijepodne	56,49 ± 5,40	62,94 ± 3,51	89,88 ± 10,28	72,14 ± 4,31	80,09 ± 8,55	59,26 ± 2,18	60,01 ± 4,35	46,02 ± 7,86
Poslijepodne	36,27 ± 2,70	47,83 ± 2,49	75,33 ± 6,78	66,86 ± 3,58	65,97 ± 8,52	44,94 ± 2,69	42,15 ± 3,25	29,20 ± 3,45
Specifična aktivnost enzima gvajakol peroksidaza ΔA min⁻¹ mg⁻¹ svježe tvari								
Prijepodne	1,38 ± 0,20	0,96 ± 0,11	1,81 ± 0,26	1,86 ± 0,22	1,69 ± 0,11	0,95 ± 0,12	0,99 ± 0,10	1,09 ± 0,21
Poslijepodne	0,90 ± 0,14	0,76 ± 0,06	1,47 ± 0,17	1,43 ± 0,10	1,60 ± 0,23	0,73 ± 0,06	0,71 ± 0,06	0,67 ± 0,11
Koncentracija topljivih proteina u mg g⁻¹ svježe tvari								
Prijepodne	41,46 ± 6,44	66,24 ± 5,28	49,91 ± 2,00	39,02 ± 3,45	47,29 ± 4,51	63,14 ± 5,36	61,03 ± 6,20	44,93 ± 6,40
Poslijepodne	41,28 ± 6,85	62,93 ± 5,92	51,42 ± 2,88	47,01 ± 4,72	41,75 ± 6,03	61,35 ± 2,26	59,19 ± 3,02	44,81 ± 2,54
Suha tvar u %								
Prijepodne	21,52 ± 0,16	19,59 ± 0,26	19,21 ± 0,09	19,80 ± 0,77	18,77 ± 0,17	20,32 ± 0,11	21,95 ± 0,14	17,18 ± 0,44
Poslijepodne	19,36 ± 0,18	19,22 ± 0,22	20,83 ± 0,54	20,28 ± 0,19	20,85 ± 0,25	19,93 ± 0,22	20,74 ± 0,13	20,39 ± 0,18
Urod zrna u t/ha								
2013. godina	3,97 ± 0,09	5,06 ± 0,51	5,00 ± 0,19	4,35 ± 0,51	4,65 ± 0,27	4,75 ± 0,40	4,42 ± 0,28	4,79 ± 0,43

Tablica 4. Srednje vrijednosti i standardne devijacije istraživanih parametara hibrida suncokreta izračunate iz dobivenih vrijednosti mjerenja tijekom prijepodnevni i poslijepodnevni sati.

Vrijeme mjerenja/ Hibrid	Hibrid 1	Hibrid 2	Hibrid 3	Hibrid 4	Hibrid 5	Hibrid 6	Hibrid 7	Hibrid 8
Klorofil <i>a</i> u mg g⁻¹ svježe tvari								
Prijepodne	1,36 ± 0,01	1,43 ± 0,01	1,33 ± 0,04	1,38 ± 0,01	1,47 ± 0,04	1,55 ± 0,03	1,46 ± 0,02	1,08 ± 0,02
Poslijepodne	1,38 ± 0,02	1,47 ± 0,04	1,40 ± 0,07	1,49 ± 0,03	1,49 ± 0,04	1,51 ± 0,05	1,37 ± 0,01	1,25 ± 0,01
Klorofil <i>b</i> u mg g⁻¹ svježe tvari								
Prijepodne	0,34 ± 0,00	0,37 ± 0,01	0,31 ± 0,01	0,32 ± 0,01	0,36 ± 0,01	0,39 ± 0,01	0,37 ± 0,00	0,28 ± 0,01
Poslijepodne	0,36 ± 0,01	0,40 ± 0,01	0,36 ± 0,01	0,35 ± 0,01	0,38 ± 0,01	0,40 ± 0,01	0,37 ± 0,01	0,34 ± 0,01
Ukupni klorofil <i>a</i> i <i>b</i> u mg g⁻¹ svježe tvari								
Prijepodne	1,70 ± 0,01	1,80 ± 0,01	1,64 ± 0,05	1,70 ± 0,02	1,83 ± 0,05	1,93 ± 0,04	1,83 ± 0,02	1,36 ± 0,03
Poslijepodne	1,73 ± 0,02	1,87 ± 0,05	1,75 ± 0,07	1,85 ± 0,03	1,86 ± 0,05	1,91 ± 0,06	1,74 ± 0,01	1,59 ± 0,02
Omjer klorofila <i>a</i> i <i>b</i>								
Prijepodne	3,98 ± 0,03	3,84 ± 0,08	4,24 ± 0,07	4,37 ± 0,20	4,03 ± 0,08	4,02 ± 0,03	3,99 ± 0,06	3,91 ± 0,08
Poslijepodne	3,85 ± 0,08	3,71 ± 0,05	3,93 ± 0,23	4,21 ± 0,04	3,96 ± 0,03	3,80 ± 0,07	3,70 ± 0,06	3,73 ± 0,15
Ukupni karotenoidi u mg g⁻¹ svježe tvari								
Prijepodne	0,40 ± 0,01	0,41 ± 0,01	0,43 ± 0,01	0,40 ± 0,00	0,43 ± 0,01	0,45 ± 0,01	0,41 ± 0,01	0,33 ± 0,01
Poslijepodne	0,40 ± 0,01	0,45 ± 0,01	0,44 ± 0,02	0,45 ± 0,01	0,45 ± 0,01	0,44 ± 0,02	0,40 ± 0,00	0,38 ± 0,00
Omjer ukupnih klorofila <i>a</i> i <i>b</i> i ukupnih karotenoida								
Prijepodne	4,30 ± 0,05	4,42 ± 0,04	3,83 ± 0,05	4,25 ± 0,02	4,29 ± 0,03	4,32 ± 0,02	4,47 ± 0,05	4,12 ± 0,06
Poslijepodne	4,32 ± 0,06	4,12 ± 0,02	4,00 ± 0,05	4,09 ± 0,03	4,12 ± 0,03	4,32 ± 0,03	4,39 ± 0,04	4,13 ± 0,04
Maksimalni kvantni prinos fotosustava II (F_v/F_m) u relativnim jedinicama								
Prijepodne	0,84 ± 0,01	0,84 ± 0,01	0,85 ± 0,01	0,85 ± 0,00	0,84 ± 0,01	0,84 ± 0,01	0,84 ± 0,01	0,85 ± 0,00
Poslijepodne	0,76 ± 0,03	0,70 ± 0,05	0,76 ± 0,02	0,78 ± 0,01	0,77 ± 0,03	0,72 ± 0,02	0,69 ± 0,03	0,70 ± 0,04
Indeks fotosintetske učinkovitosti (PI_{ABS}) u relativnim jedinicama								
Prijepodne	8,07 ± 0,58	6,99 ± 1,14	9,99 ± 0,85	10,26 ± 0,66	10,25 ± 0,83	8,39 ± 1,07	7,44 ± 1,19	6,06 ± 0,52
Poslijepodne	1,75 ± 0,64	0,91 ± 0,35	1,71 ± 0,42	2,73 ± 0,48	2,31 ± 0,87	1,16 ± 0,28	0,67 ± 0,17	0,49 ± 0,19

Tablica 5. Dvofaktorijalna analiza varijance za istraživane parametre hibrida suncokreta mjerenih tijekom prijepodnevnih i poslijepodnevnih sati.

Izvor varijabilnosti	Hibrid (A)		Vrijeme mjerenja (B)		Interakcija (A × B)	
	Stupnjevi slobode	F test	Stupnjevi slobode	F test	Stupnjevi slobode	F test
RWC	7	8,87*	1	15,83*	7	3,12*
TBARS	7	18,83*	1	1,59	7	6,04*
Ukupna aktivnost GPOD	7	73,43*	1	140,20*	7	1,54
Specifična aktivnost GPOD	7	62,76*	1	77,87*	7	1,90
Konc. proteina	7	37,60*	1	0,14	7	1,69
ST	7	35,17*	1	20,85*	7	50,89*
Chl <i>a</i>	7	112,96*	1	26,77*	7	15,74*
Chl <i>b</i>	7	96,37*	1	157,71*	7	10,22*
Chl <i>a+b</i>	7	126,00*	1	56,03*	7	17,00*
Chl <i>a/b</i>	7	28,26*	1	70,19*	7	1,67
Car	7	84,89*	1	96,57*	7	17,38*
Chl <i>a+b</i>/Car	7	150,48*	1	52,18*	7	32,95*
F_v/F_m	7	13,53*	1	972,44*	7	11,57*
PI_{ABS}	7	64,60*	1	4561,96*	7	10,49*

*Statistički značajno na nivou od 5 %;

RWC – relativni sadržaj vode, TBARS – razina lipidne peroksidacije, ukupna aktivnost GPOD – ukupna aktivnost enzima gvajakol peroksidaza, specifična aktivnost GPOD – specifična aktivnost enzima gvajakol peroksidaza, konc. proteina – koncentracija topljivih proteina, ST – suha tvar, Chl *a* – klorofil *a*, Chl *b* – klorofil *b*, Chl *a+b* – ukupni klorofil *a* i *b*, Car – ukupni karotenoidi, Chl *a/b* – omjer klorofila *a* i klorofila *b*, Chl *a+b*/Car – omjer ukupnih klorofila *a* i *b* i ukupnih karotenoida, F_v/F_m – maksimalni prinos kvanta fotosustava II, PI_{ABS} – indeks fotosintetske učinkovitosti

Tablica 6. Srednje vrijednosti i standardne devijacije istraživanih parametra fotosintetske učinkovitosti hibrida suncokreta izračunate iz dobivenih vrijednosti mjerenja tijekom prijepodnevni i poslijepodnevni sati izražene u relativnim jedinicama.

Vrijeme mjerenja	Prijepodne		Poslijepodne	
	Hibrid 4	Hibrid 7	Hibrid 4	Hibrid 7
F₀	267,50 ± 8,51	223,75 ± 7,31	348,75 ± 25,09	341,83 ± 28,87
F_m	1740,92 ± 67,50	1416,75 ± 99,07	1591,83 ± 104,15	1115,58 ± 92,91
V_J	0,24 ± 0,02	0,28 ± 0,02	0,40 ± 0,03	0,58 ± 0,03
V_I	0,46 ± 0,05	0,50 ± 0,05	0,45 ± 0,03	0,47 ± 0,03
RC/CS₀	157,84 ± 7,44	119,35 ± 6,53	173,22 ± 12,43	135,53 ± 10,54
F_v/F_m	0,85 ± 0,01	0,84 ± 0,01	0,78 ± 0,01	0,69 ± 0,03
ABS/RC	1,70 ± 0,08	1,88 ± 0,10	2,02 ± 0,17	2,54 ± 0,30
TR₀/RC	1,44 ± 0,06	1,58 ± 0,07	1,57 ± 0,11	1,75 ± 0,14
ET₀/RC	1,09 ± 0,07	1,14 ± 0,05	0,95 ± 0,10	0,73 ± 0,08
DI₀/RC	0,26 ± 0,02	0,30 ± 0,03	0,45 ± 0,06	0,79 ± 0,17
RC/ABS	0,59 ± 0,03	0,53 ± 0,03	0,50 ± 0,04	0,40 ± 0,04
TR₀/DI₀	5,51 ± 0,19	5,34 ± 0,45	3,57 ± 0,30	2,28 ± 0,31
ET₀/(TR₀- ET₀)	3,16 ± 0,26	2,61 ± 0,26	1,53 ± 0,20	0,73 ± 0,10
PI_{ABS}	10,26 ± 0,66	7,44 ± 1,20	2,73 ± 0,48	0,67 ± 0,17

F₀ – minimalni intenzitet fluorescencije, F_m – maksimalni intenzitet fluorescencije, V_J – varijabilna fluorescencija na J koraku, V_I – varijabilna fluorescencija na I koraku, RC/CS₀ – gustoća aktivnih reakcijskih središta, F_v/F_m – maksimalni kvantni prinos fotosustava II, ABS/RC – apsorpcija po aktivnom reakcijskom središtu, TR₀/RC – protok uhvaćenih fotona po aktivnom reakcijskom središtu, ET₀/RC – elektronski transport po aktivnom reakcijskom središtu, DI₀/RC – rasipanje po aktivnom reakcijskom središtu, RC/ABS – omjer koncentracije klorofila reakcijskih središta i koncentracije antena klorofila, TR₀/DI₀ – omjer protoka uhvaćenih fotona i rasipanja energije, ET₀/(TR₀-ET₀) – transport elektrona dalje od primarnog akceptora Q_A, PI_{ABS} – indeks fotosintetske učinkovitosti

Tablica 7. Dvofaktorijalna analiza varijance za parametre fotosintetske učinkovitosti hibrida suncokreta mjerenih tijekom prijedpodnevnih i poslijepodnevnih sati.

Izvor varijabilnosti	Hibrid (A)		Vrijeme mjerenja (B)		Interakcija (A × B)	
	Stupnjevi slobode	F test	Stupnjevi slobode	F test	Stupnjevi slobode	F test
F_0	1	19,39*	1	300,06*	1	10,25*
F_m	1	227,13*	1	71,87*	1	8,20*
V_J	1	219,12*	1	946,65*	1	95,06*
V_I	1	9,54*	1	3,40	1	0,35
RC/CS ₀	1	192,11*	1	33,11*	1	0,02
F_v/F_m	1	83,18*	1	443,37*	1	66,86*
ABS/RC	1	43,54*	1	85,31*	1	10,10*
TR ₀ /RC	1	31,11*	1	28,71*	1	0,29
ET ₀ /RC	1	13,97*	1	150,21*	1	35,07*
DI ₀ /RC	1	49,53*	1	154,61*	1	31,97*
RC/ABS	1	59,03*	1	124,54*	1	4,41*
TR ₀ /DI ₀	1	60,59*	1	698,58*	1	35,36*
ET ₀ /(TR ₀ -ET ₀)	1	122,72*	1	817,97*	1	3,89
PI _{ABS}	1	134,99*	1	1159,34*	1	3,30

*Statistički značajno na nivou od 5 %;

F_0 – minimalni intenzitet fluorescencije, F_m – maksimalni intenzitet fluorescencije, V_J – varijabilna fluorescencija na J koraku, V_I – varijabilna fluorescencija na I koraku, RC/CS₀ – gustoća aktivnih reakcijskih središta, F_v/F_m – maksimalni kvantni prinos fotosustava II, ABS/RC – apsorpcija po aktivnom reakcijskom središtu, TR₀/RC – protok uhvaćenih fotona po aktivnom reakcijskom središtu, ET₀/RC – elektronski transport po aktivnom reakcijskom središtu, DI₀/RC – rasipanje po aktivnom reakcijskom središtu, RC/ABS – omjer koncentracije klorofila reakcijskih središta i koncentracije antena klorofila, TR₀/DI₀ – omjer protoka uhvaćenih fotona i rasipanja energije, ET₀/(TR₀-ET₀) – transport elektrona dalje od primarnog akceptora Q_A, PI_{ABS} – indeks fotosintetske učinkovitosti

11. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 7. lipnja 1986. godine u Bugojnu (Bosna i Hercegovina). Završila sam srednju Medicinsku školu u Osijeku, nakon koje sam 2005. godine upisala Poljoprivredni fakultetu u Osijeku smjer Bilinogojstvo. S obranom završnog rada 2008. godine stekla sam akademski naziv sveučilišna prvostupnica inženjerka poljoprivrede (univ. bacc. agr.). U listopadu 2008. godine upisala sam sveučilišni diplomski studij Bilinogojstvo, smjer Biljna proizvodnja koji sam završila 2011. godine, te sam time stekla akademski naziv magistra inženjerka poljoprivrede (mag. ing. agr.). Tijekom studija (2008. – 2011.) bila sam stipendistica za darovite studente Osječko-baranjske županije, članica Povjerenstva za praćenje Bolonjskog procesa – Sveučilišni studij (2008. – 2011.) i članica Etičkog povjerenstva Poljoprivrednog fakulteta u Osijeku (2008. – 2011.).

U prosincu 2011. godine primljena sam u Poljoprivrednom institutu Osijek, Odjel za oplemenjivanje i genetiku industrijskog bilja na radno mjesto znanstvena novakinja u suradničkom zvanju asistentica za rad na znanstvenom projektu pod nazivom „Stabilnost genotipova suncokreta na važna agronomska svojstva i kakvoću ulja" financiranom od Ministarstva znanosti, obrazovanja i športa RH (voditelja dr. sc. Miroslava Krizmanića). Od tada aktivno sudjelujem u provedbi programa oplemenjivanja i sjemenarstva suncokreta koji je trajna znanstveno-istraživačka djelatnost Poljoprivrednog instituta Osijek. Sveučilišni poslijediplomski interdisciplinarni doktorski studija *Molekularne bioznanosti*, modul Biologija bilja upisala sam akademske godine 2012./2013.

Objavila sam 20 izvornih znanstvenih radova kao autor/suautor. Sudjelovala sam u popularizaciji znanosti u sklopu „Festivala znanosti“ (2013., 2015. i 2016. godine) organizirajući radionice te s izložbom postera. Aktivno sam sudjelovala na 11 međunarodnih skupova na kojima sam prezentirala ukupno 17 radova objavljenih kao znanstveni radovi ili sažeci radova.

Članica sam Hrvatskog genetičkog društva i Alumni kluba Poljoprivrednog fakulteta u Osijeku u kojem sam bila članica Nadzornog odbora Alumni kluba Poljoprivrednog fakulteta u Osijeku od 2015. do 2018. godine. Trenutno sam Predstavnica znanstvenih novaka Etičkog povjerenstva Poljoprivrednog instituta Osijek.

Popis objavljenih publikacija

Znanstveni radovi u časopisima

1. Kovačević, Josip; Mazur, Maja; Drezner, Georg; Lalić, Alojzije; Sudarić, Aleksandra; Dvojković, Krešimir; Viljevac Vuletić, Marija; Josipović, Marko; Josipović, Ana; **Markulj Kulundžić, Antonela**; Lepeduš, Hrvoje. Photosynthetic efficiency parameters as indicators of agronomic traits of winter wheat cultivars in different soil water conditions. *Genetika-Belgrade*. 49 (2017), 3; 891–910. WOS Accession Number: 000423604800012

2. Liović, Ivica; Mijić, Anto; **Markulj Kulundžić, Antonela**; Duvnjak, Tomislav; Gadžo, Drena. Utjecaj vremenskih uvjeta na urod zrna, sadržaj ulja i urod ulja novih OS hibrida suncokreta. *Poljoprivreda (Osijek)*. 23 (2017), 1; 34–39. CAB Abstracts Accession Number: 20173219829
3. Matoša Kočar, Maja; Sudarić, Aleksandra; Vila, Sonja; Petrović, Sonja; Rebekić, Andrijana; Josipović, Ana; **Markulj Kulundžić, Antonela**. Varijabilnost fenotipske ekspresije svojstava kvalitete zrna elitnih linija soje. *Poljoprivreda (Osijek)*. 23 (2017); 40–48. CAB Abstracts Accession Number: 20173219830
4. Mijić, Anto; Liović, Ivica; Sudarić, Aleksandra; Gadžo, Drena; Jovović, Zoran; Jankulovska, Mirjana; **Markulj Kulundžić, Antonela**; Duvnjak, Tomislav. The effect of environment on the phenotypic expression of grain yield, oil content and oil yield in sunflower hybrids. *Agriculture and Forestry*. 63 (2017), 1; 309–318. CAB Abstracts Accession Number: 20173190421
5. Josipović, Ana; Sudar, Rezica; Sudarić, Aleksandra; Jurković, Vlatka; Matoša Kočar, Maja; **Markulj Kulundžić, Antonela**. Total phenolic and total flavonoid content variability of soybean genotypes in eastern Croatia. *Croatian journal of food science and technology*. 8 (2016), 2; 60–65. CAB Abstracts Accession Number: 20173095437
6. **Markulj Kulundžić, Antonela**; Kovačević, Josip; Viljevac Vuletić, Marija; Josipović, Ana; Liović, Ivica; Mijić, Anto; Lepeduš, Hrvoje; Matoša Kočar, Maja. Impact of abiotic stress on photosynthetic efficiency and leaf temperature in sunflower. *Poljoprivreda (Osijek)*. 22 (2016), 2; 17–22. CAB Abstracts Accession Number: 20173025068
7. **Markulj Kulundžić, Antonela**; Viljevac Vuletić, Marija; Jocić, Siniša; Cvejić, Sandra; Matoša Kočar, Maja; Mijić, Anto; Liović, Ivica; Sudarić, Aleksandra; Lepeduš, Hrvoje; Kovačević, Josip; Josipović, Ana. Effect of different soil water content effect on genotype expression in photosynthetic efficiency and leaf temperature in sunflower. *Genetika-Belgrade*. 48 (2016), 3; 971–982. WOS Accession Number: 000392920900014
8. Krizmanić, Miroslav; Liović, Ivica; Mijić, Anto; Krizmanić, Goran; Šimić, Branimir; Duvnjak, Tomislav; Bilandžić, Marijan; Marinković, Radovan; Gadžo, Drena; **Markulj, Antonela**. Utjecaj okolina na kvantitativna svojstva novih OS-hibrida suncokreta. *Sjemenarstvo*. 29 (2012), 3-4; 121–135. CAB Abstracts Accession Number: 20133209859
9. Liović, Ivica; Krizmanić, Miroslav; Mijić, Anto; Bilandžić, Marijan; **Markulj, Antonela**; Marinković, Radovan; Gadžo, Drena. Linija x tester analiza u procjeni

- kombinatornih sposobnosti sadržaja ulja kod suncokreta. Poljoprivreda. 18 (2012), 2; 3–6. CAB Abstracts Accession Number: 20133036584
10. Liović, Ivica; Mijić, Anto; Krizmanić, Miroslav; Pepo, Peter; Kovačević, Vlado; **Markulj, Antonela**; Duvnjak, Tomislav; Krizmanić, Goran. Influence of sunflower cytoplasmic male sterile and restorer line on grain yield stability among different environmental conditions. Acta agronomica Hungarica. 60 (2012), 3; 247–255. CAB Abstracts Accession Number: 20123323431
11. Bukvić, Gordana; Grljušić, Sonja; Stanisavljević, Aleksandar; Varga, Ivana; **Markulj, Antonela**; Jozić, Anita. Utjecaj temperature i pH vrijednosti na klijavost sjemena i svojstva klijanaca kultivara crvene djeteline. Sjemenarstvo. 27 (2010), 1/2; 43–55. CAB Abstracts Accession Number: 20113157428
12. Marijanović, Marija; **Markulj, Antonela**; Tkalec, Monika; Jozić, Anita; Kovačević, Vlado. Impact of precipitation and temperature on wheat (*Triticum aestivum* L.) yields in Eastern Croatia. Acta Agriculturae Serbica. XV (2010), 30; 117–123. CAB Abstracts Accession Number: 20103342287
13. **Markulj, Antonela**; Marijanović, Marija; Tkalec, Monika; Jozić, Anita; Kovačević, Vlado. Effects of precipitation and temperature regimes on maize (*Zea mays* L.) yields in Northwestern Croatia. Acta Agriculturae Serbica. XV (2010), 29; 39–45. CAB Abstracts Accession Number: 20103342278

Ostali radovi u časopisima

1. **Markulj, Antonela**; Liović, Ivica; Mijić, Anto; Sudarić, Aleksandra; Josipović, Ana; Matoša Kočar, Maja. Zašto proizvoditi suncokret?. Agronomski glasnik. 76 (2014), 3; 163–176. CAB Abstracts Accession Number: 20153229232

Znanstveni radovi u zbornicima skupova s međunarodnom recenzijom

1. Josipović, Ana; Sudarić, Aleksandra; Matoša Kočar, Maja; **Markulj Kulundžić, Antonela**. Potencijal domaćih sorti soje u proizvodnji funkcionalne hrane. Zbornik radova 9. međunarodnog znanstveno-stručnog skupa "Hranom do zdravlja", Šubarić, Drago; Jašić, Midhat (ur.). Osijek i Tuzla: Studio HS internet d.o.o., Osijek, Hrvatska, 2017. 116–131.
2. Josipović, Ana; Sudarić, Aleksandra; Lončarić, Zdenko; Kovačević, Josip; Matoša Kočar, Maja; **Markulj, Antonela**; Jurković, Vlatka. Photosynthetic efficiency of soybean on cadmium contaminated soil. 7th international scientific/professional

- conference "Agriculture in nature and environment protection", Baban, Mirjana; Đurđević, Boris (ur.). Osijek: Glas Slavonije d.d., Osijek, 2014. 201–205. CAB Abstracts Accession Number: 20173162584
3. **Markulj, Antonela**; Viljevac Vuletić, Marija; Kovačević, Josip; Josipović, Ana; Liović, Ivica; Mijić, Anto; Sudarić, Aleksandra; Matoša Kočar, Maja. Water deficiency effects on photosynthetic performance in leaves of sunflower plants at developmental stage of butonisation. 7th international scientific/professional conference "Agriculture in nature and environment protection", Baban, Mirjana; Đurđević, Boris (ur.). Osijek: Glas Slavonije d.d., Osijek, 2014. 191–195. CAB Abstracts Accession Number: 20173162582
 4. Matoša Kočar, Maja; Sudarić, Aleksandra; Josipović, Ana; **Markulj, Antonela**; Mazur, Maja. Effect of beneficial microorganism technology and genotype interaction on soybean seed quality, 7th international scientific/professional conference "Agriculture in nature and environment protection", Baban, Mirjana; Đurđević, Boris (ur.). Osijek: Glas Slavonije d.d., 2014. 196–200. CAB Abstracts Accession Number: 20173162583
 5. Krizmanić, Miroslav; **Markulj, Antonela**; Mijić, Anto; Liović, Ivica; Sudarić, Aleksandra. Komparativna istraživanja novih OS hibrida suncokreta u različitim agroekološkim uvjetima Agriculture in nature and environment protection, Stipešević, Bojan; Sorić, Roberta (ur.). Osijek: Glas Slavonije d.d., 2012. 238–243. CAB Abstracts Accession Number: 20173178253
 6. **Markulj, Antonela**. Precipitation and temperature regime influences on maize (*Zea mays* L.) yields in Northwestern Croatia. Smotra naučnih radova studenata agronomije sa međunarodnim učešćem, Spasojević, M. (ur.). Čačak : Agronomski fakultet - Čačak, 2009. 49–54.

Sažeci u zbornicima skupova

1. Matoša Kočar, Maja; Sudarić, Aleksandra; Vila, Sonja; Petrović, Sonja; Rebekić, Andrijana; Josipović, Ana; **Markulj Kulundžić, Antonela**. Varijabilnost sadržaja izoflavona u domaćim genotipovima soje. Zbornik sažetaka 53. hrvatskog i 13. međunarodnog simpozija agronoma. Rozman, Vlatka; Antunović, Zvonko (ur.). Osijek: Poljoprivredni fakultet Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera, 2018. 99–100.
2. Mijić, Anto; Liović, Ivica; Sudarić, Aleksandra; Duvnjak, Tomislav; **Markulj Kulundžić, Antonela**. Interakcija genotip × okolina za prinos zrna i ulja novih OS

- hibrida suncokreta. 51st Croatian and 11th International Symposium on Agriculture - Book of abstracts. Pospišil, Milan; Vnućec, Ivan (ur.). Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet, Zagreb, Hrvatska, 2016. 57–58.
3. Liović, Ivica; Mijić, Anto; **Markulj, Antonela**; Šimić, Branimir. Utjecaj roka sjetve na proizvodna svojstva hibrida suncokreta. 50th Croatian and 10th International Symposium on Agriculture - Book of abstracts, Pospišil, Milan (ur.). Zagreb: University of Zagreb, Faculty of Agriculture, Zagreb, Croatia, 2015. 171–172.
 4. Josipović, Ana; Sudarić, Aleksandra; Lončarić, Zdenko; Matoša Kočar, Maja; **Markulj, Antonela**; Kovačević, Josip. Cadmium contamination effect on parameters of photosynthetic efficiency in soybean. V Congress of the Serbian Genetic Society. Vasiljević, Branka; Mladenović Drinić, Snežana (ur.). Beograd: Akademska izdanja, Beograd, 2014. 293–293.
 5. **Markulj, Antonela**; Viljevac Vuletić, Marija; Josipović, Ana; Kovačević, Josip; Mijić, Anto; Liović, Ivica; Sudarić, Aleksandra; Matoša Kočar, Maja. Effect of different soil water content on photosynthetic efficiency and leaf temperature in sunflower. V Congress of the Serbian Genetic Society, Vasiljević, Branka; Mladenović Drinić, Snežana (ur.). Beograd: Akademska izdanja, Beograd, 2014. 297–297.
 6. Matoša Kočar, Maja; Sudarić, Aleksandra; Josipović, Ana; **Markulj, Antonela**; Jurković, Vlatka. Fatty acid composition of oil in eight early maturing soybean genotypes. V Congress of the Serbian Genetic Society. Vasiljević, Branka; Mladenović Drinić, Snežana (ur.). Belgrade, Serbia: Akademska izdanja, Belgrade, 2014. 299–299.
 7. Mijić, Anto; Liović, Ivica; Sudarić, Aleksandra; Andrić, Luka; Šimić, Branimir; Duvnjak, Tomislav; **Markulj, Antonela**. Dostignuća u oplemenjivanju suncokreta u Poljoprivrednom institutu Osijek. 7. međunarodni kongres oplemenjivanje bilja, sjemenarstvo i rasadničarstvo i 2. regionalni dani sjemenara. Matotan, Zdravko, Haramija, Josip (ur.). Zagreb: Hrvatsko agronomsko društvo, 2014. 64–65.
 8. Josipović, Ana; Viljevac, Marija; Sudarić, Aleksandra; **Markulj, Antonela**; Liović, Ivica; Kovačević, Josip. Utjecaj genotipa i okoline na fotosintetsku učinkovitost soje. Zbornik sažetaka 48. hrvatskog i 8. međunarodnog simpozija agronoma. Marić, Sonja, Lončarić, Zdenko (ur.). Osijek: Poljoprivredni fakultet, Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, 2013. 88–89.
 9. **Markulj, Antonela**; Krizmanić, Miroslav; Kovačević, Josip; Viljevac, Marija; Liović, Ivica; Mijić, Anto; Sudarić, Aleksandra; Josipović, Ana. Fotosintetska

učinkovitost i temperatura lista hibrida suncokreta u stresnim uvjetima uzgoja. Zbornik sažetaka 48. hrvatskog i 8. međunarodnog simpozija agronoma. Marić, Sonja; Lončarić, Zdenko (ur.). Osijek: Poljoprivredni fakultet; Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, 2013. 116–117.

10. Josipović, Ana; Sudarić, Aleksandra; Sudar, Rezica; **Markulj, Antonela**; Duvnjak, Tomislav; Kovačević, Josip. Doprinos oplemenjivanja soje povećanju količine i kvalitete hrane. 2. zbornik sažetaka - Okolišno prihvatljiva proizvodnja kvalitetne i sigurne hrane. Kralik, Gordana (ur.). Osijek: Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, 2012. 35–36.
11. **Markulj, Antonela**; Krizmanić, Miroslav; Sudarić, Aleksandra; Liović, Ivica; Mijić, Anto; Josipović, Ana. Uloga suncokreta u proizvodnji hrane. 2. zbornik sažetaka - Okolišno prihvatljiva proizvodnja kvalitetne i sigurne hrane. Kralik, Gordana (ur.). Osijek: Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, 2012. 63–64.