

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku  
Institut Ruđer Bošković u Zagrebu  
Sveučilište u Dubrovniku  
Sveučilišni poslijediplomski interdisciplinarni doktorski studij  
*„Molekularne bioznanosti“*

Miroslav Lisjak, dipl. ing.

**INTERAKCIJE H<sub>2</sub>S I NO U PRIJENOSU SIGNALA U  
LISTOVIMA UROČNJAKA (*Arabidopsis thaliana* L.) I  
PAPRIKE (*Capsicum annuum* L.)**

Doktorski rad

Osijek, 2012.

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku  
Institut Ruđer Bošković u Zagrebu  
Sveučilište u Dubrovniku  
Sveučilišni poslijediplomski interdisciplinarni doktorski studij  
*„Molekularne bioznanosti“*

Miroslav Lisjak, dipl. ing.

**INTERAKCIJE H<sub>2</sub>S I NO U PRIJENOSU SIGNALA U  
LISTOVIMA UROČNJAKA (*Arabidopsis thaliana* L.) I  
PAPRIKE (*Capsicum annuum* L.)**

Doktorski rad predložen  
Sveučilišnome Vijeću za poslijediplomske interdisciplinarne  
doktorske studije  
zbog stjecanja akademskog stupnja  
doktora molekularnih bioznanosti-modul biologija biljaka

Osijek, 2012.

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

---

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku  
Institut Ruder Bošković, Zagreb  
Sveučilište u Dubrovniku  
Sveučilišni poslijediplomski interdisciplinarni  
doktorski studij *Molekularne bioznanosti*

Doktorski rad

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti  
Znanstveno polje: Biotehnologija

### INTERAKCIJE H<sub>2</sub>S I NO U PRIJENOSU SIGNALA U LISTOVIMA UROČNJAKA (*Arabidopsis thaliana* L.) I PAPRIKE (*Capsicum annuum* L.)

Miroslav Lisjak, dipl. ing.

Rad je izrađen na Poljoprivrednom fakultetu Osijek, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku i  
Faculty of Health and Life Sciences, University of the West of England, Bristol, UK

Mentori: Dr.sc. Tihana Teklić, red.prof.  
Dr.sc. John T. Hancock, izv.prof.

U ovom istraživanju je provedena serija pokusa s više genotipova uročnjaka (*Arabidopsis thaliana* L.) i paprike (*Capsicum annuum* L.) u kontroliranim uvjetima klima komore, s ciljem utvrđivanja fiziološke uloge H<sub>2</sub>S u biljkama i njegovog potencijalnog djelovanja kao signalne komponente, naročito u interakciji s NO signalnim putevima. Poseban naglasak je stavljen na mehanizam rada puči i prijenos signala u njihovom otvaranju i zatvaranju. Također, istraživana je učinak tretmana biljaka paprike s H<sub>2</sub>S u uvjetima solnog stresa. Kod obje biljne vrste je utvrđeno da primjenjeni donori H<sub>2</sub>S, NaHS i GYY4137, inhibiraju zatvaranje puči smanjujući akumulaciju NO, za koju je dokazano da se javlja pri tretmanu puči s donatorom SNP ili s ABA. Djelovanje NO i H<sub>2</sub>S je bilo suprotno i u reakciji biljaka paprike na solni stres, pri čemu je povećana antioksidativna aktivnost u listu utvrđena nakon tretmana s H<sub>2</sub>S, naročito s NaHS. Također, GYY4137 se može smatrati prikladnim donatorom H<sub>2</sub>S za istraživanje funkcija H<sub>2</sub>S u biljkama. Rezultati istraživanja ukazuju na interakcije H<sub>2</sub>S i NO u staničnom prijenosu signala u biljkama, kako u normalnim uvjetima tako i kod solnog stresa. Daljnja istraživanja ovakvog tipa bi trebala još preciznije definirati funkcije H<sub>2</sub>S u biljnom metabolizmu, zbog potencijalne praktične vrijednosti tih spoznaja za povećanje otpornosti biljaka na stres i poboljšanje njihove produktivnosti.

Broj stranica: 120  
Broj slika: 6  
Broj tablica: 32  
Broj grafikona: 10  
Broj literaturnih navoda: 127  
Jezik izvornika: hrvatski

**Ključne riječi:** H<sub>2</sub>S, NO, ABA, stanični prijenos signala, puči, solni stres, antioksidativni odgovor, uročnjak, paprika.

**Datum obrane:** 20. ožujka 2012.

**Stručno povjerenstvo za obranu:**

1. Dr.sc. Hrvoje Fulgosi, viši znanstveni suradnik
2. Dr.sc. Tihana Teklić, red.prof.
3. Dr.sc. John T. Hancock, izv.prof.
4. Dr.sc. Nada Parađiković, red.prof.

Rad je pohranjen u Gradskoj i sveučilišnoj knjižnici Osijek, Europske avenije 24

## BASIC DOCUMENTATION CARD

---

University Josip Juraj Strossmayer Osijek  
Institute Ruder Bošković, Zagreb  
University of Dubrovnik  
PhD Study of Molecular Biosciences

PhD thesis

Scientific Area: Biotechnical sciences  
Scientific Field: Biotechnology

### **H<sub>2</sub>S AND NO SIGNALING INTERACTIONS IN THALE CRESS (*Arabidopsis thaliana* L.) AND PEPPER (*Capsicum annuum* L.) LEAVES**

*Miroslav Lisjak*, BSc

Thesis performed at Faculty of agriculture Osijek, University of Josip Juraj Strossmayer in Osijek and  
Faculty of Health and Life Sciences, University of the West of England, Bristol,  
UK

Supervisors: PhD *Tihana Teklić*, Full Professor  
PhD *John T. Hancock*, Reader in Molecular Biology

This research comprehends a set of experiments with several thale cress (*Arabidopsis thaliana* L.) and pepper (*Capsicum annuum* L.) genotypes in controlled conditions using growth chambers, with the aim of determining the physiological role of hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) in plants, as well as its potential effect as a signaling compound, in particular in potential interaction with nitric oxide (NO) signaling pathways. Special emphasis was focused on stomatal mechanisms and signaling in their opening and closing. Moreover, the effect of treatment of pepper plants with H<sub>2</sub>S was investigated in salt stress conditions. It was established that the applied H<sub>2</sub>S donors, NaHS and GYY4137, inhibit stomata closing in both plant species through the reduction of NO accumulation in stomata, which was proven to occur in SNP or ABA treatment. The effects of NO and H<sub>2</sub>S were opposite in pepper plants response to salt stress as well, with increased antioxidative activity in leaf obtained after H<sub>2</sub>S treatments, and with NaHS in particular. In addition, GYY4137 could be considered as a convenient H<sub>2</sub>S donor for research into H<sub>2</sub>S functions in plants. The results point out the interactions of H<sub>2</sub>S and NO in plant cell signaling, in normal as well as in salt stress conditions. Further research of this type should uncover H<sub>2</sub>S functions in plant metabolism more precisely, especially considering the potential practical value of this knowledge for plant stress resistance improvement and their productivity enhancement.

Number of pages: 120

Number of figures: 6

Number of tables: 32

Number of graphs: 10

Number of references: 127

Original in: Croatian

**Key words:** H<sub>2</sub>S, NO, ABA, cell signaling, stomata, salt stress, antioxidative response, thale cress, pepper.

**Date of the thesis defence:** 20. march 2012.

**Reviewers:**

1. PhD *Hrvoje Fulgosi*, Associate Research Scientist
2. PhD *Tihana Teklić*, Full Professor
3. PhD *John T. Hancock*, Reader in Molecular Biology
4. PhD *Nada Parađiković*, Full Professor

Thesis deposited in Osijek City and University Library, Europske avenije 24

Doktorski rad je izrađen u sklopu znanstvenog projekta Ministarstva znanosti obrazovanja i športa Republike Hrvatske „*Fiziološki mehanizmi otpornosti biljaka na abiotski stres*“ (079-0790494-0559) kojega je voditelj prof.dr.sc. Tihana Teklić.

## Zahvala

Najiskrenije se zahvaljujem svojoj mentorici prof.dr.sc. Tihani Teklić na ukazanom povjerenju i strpljenju koje mi je posvetila tijekom mog znanstveno istraživačkog rada, kao i na velikoj pomoći pri izradi i pisanju ove dizertacije. Hvala na podršci, prenesenom znanju, na dugim satima truda i rada te pomoći kad mi je bila najpotrebnija. Najveća hvala na bezuvjetnom prijateljstvu, razumijevanju i svim datim savjetima, kako u znanosti tako i u privatnom životu.

Veliko hvala prof.dr.sc. Johnu T. Hancocku sa University of the West of England, na uloženom trudu, prenesenom znanju, savjetima, idejama te ustupljenom laboratoriju i laboratorijskoj opremi.

Veliko hvala dr.sc. Ianu D. Wilsonu sa istoimene institucije, na ustupljenim mutantima te prenešenom praktičnom i laboratorijskom iskustvu, znanju i svim idejama koje je nesebično podijelio sa mnom.

Obojici veliko hvala na trudu i angažmanu koji su uložili pri prijavi našeg zajedničkog patenta. Hvala Vam što ste me tretirali kao punopravnog člana Vašeg istraživačkog tima ali i kao Vašeg prijatelja. Stoga se iskreno zahvaljujem na nesebičnoj prijateljskoj pomoći, u svim trenucima tijekom mog boravka u Engleskoj.

Hvala dr.sc. Mattu Whittemanu za ustupljanje kemikalije GYY4137, korištene u pokusima, kao i za sve korisne znanstvene savjete.

Hvala dr.sc. Hrvoju Fulgosiju na pregledu doktorskog rada i korisnim savjetima. Zahvaljujem prof.dr.sc. Nadi Parađiković za pomoć i korisne savjete u eksperimentalnom radu.

Hvala cijenjenoj kolegici Mariji Špoljarević na svim konstruktivnim prijedlozima, idejama i savjetima te angažmanu i nesebičnoj pomoći tijekom mog cjelokupnog znanstveno istraživačkog rada.

Hvala doc.dr. Ivni Štolfi s Odjela za biologiju, na pomoći u laboratorijskim analizama i ustupljenim analitičkim protokolima.

Hvala predstojniku prof.dr.sc. Zdenku Lončariću i svim članovima Zavoda za agroekologiju na razumijevanju, prijateljstvu, pomoći i neprestanoj podršci još od doba mojih studentskih dana. Zahvaljujem Vladi Zebecu na pomoći prilikom mikroskopiranja.

Hvala dr.sc. Tomislavu Vinkoviću na pomoći pri sjetvi kao i prof. Dejanu Agiću na pomoći pri laboratorijskim analizama. Hvala Sari Teklić Ward na lekturama engleskog jezika. Hvala djelatnicima katedre za fitopatologiju na ustupljanju klime komore, laboratorija i opreme koju smo koristili za jedan dio istraživanja.

Veliko hvala bratu Damiru, ali i svim prijateljima iz privatne sfere mog života na podršci, ohrabriranju, razumijevanju i terapijskim vožnjama na motoru. Posebno hvala roditeljima na svim odricanjima i razumijevanju te na cjelokupnom trudu koji su nesebično uložili u moje školovanje.

Najveća i najdublja zahvalnost mojoj ženi Moniki, kojoj bih i posvetio ovu dizertaciju. Hvala na odricanju i bezuvjetnoj ljubavi iskazanoj kroz razumijevanje i podršku koju mi pruža već punih petnest godina.

## SADRŽAJ

<b>1. Uvod.....</b>	<b>1</b>
<b>2. Hipoteza i ciljevi istraživanja.....</b>	<b>3</b>
2.1. Hipoteza.....	3
2.2. Ciljevi istraživanja.....	3
<b>3. Pregled literature.....</b>	<b>4</b>
<b>4. Materijal i metode.....</b>	<b>19</b>
4.1. Fluorometrijsko ispitivanje međusobnih interakcija GYY4137, NaHS, ABA, SNP u MES-KCl puferu uz dodatak DAF-2.....	19
4.2. Preliminarni pokusi: mjerenje otvora puči kod uročnjaka, nakon tretmana donorima H <sub>2</sub> S i ABA-om.....	19
4.2.1. Uzgoj biljaka uročnjaka.....	19
4.2.2. Tretiranje listova donorima H <sub>2</sub> S.....	20
4.2.3. Analiza otvora puči.....	20
4.3. Ispitivanje utjecaja solnog stresa i tretmana donorima H <sub>2</sub> S, na promjer puči kod uročnjaka.....	21
4.3.1. Uzgoj biljaka uročnjaka i priprema uzorka za analizu otvora puči.....	21
4.3.2. Nitrat reduktazni (NR) mutanti Nia1 i Nia2.....	21
4.4. Ispitivanje utjecaja osvjetljenja i tretmana lista donorima NO i H <sub>2</sub> S na promjer puči kod paprike Century RZ (F1).....	22
4.4.1. Uzgoj biljaka paprike.....	22
4.4.2. Analiza otvora puči.....	22
4.5. Ispitivanje utjecaja osvjetljenja i tretmana lista donorima H <sub>2</sub> S i NO, na promjer puči kod paprike Century RZ (F1) u uvjetima solnog stresa.....	23
4.5.1. Uzgoj biljaka paprike i priprema uzorka za analizu otvora puči.....	23
4.6. Ispitivanje utjecaja osvjetljenja i tretmana lista donorima H <sub>2</sub> S i NO, ABA, cPTIO, na reakciju puči kod paprike Quadrato d'Asti Rosso.....	24
4.6.1. Uzgoj biljaka paprike za analizu otvora puči i vizualizaciju akumuliranog NO.....	24
4.6.2. Analiza otvora puči.....	24
4.6.3. Priprema uzorka i mjerenje intenziteta fluorescencije pomoću CLMS.....	25
4.7. Antioksidativna aktivnost u listu paprike Quadrato d'Asti Rosso nakon tretmana s donorima H <sub>2</sub> S i NO te izlaganja solnom stresu.....	26
4.7.1. Uzgoj biljaka paprike za analize antioksidativne aktivnosti u tkivu lista.....	26
4.7.2. Određivanje intenziteta lipidne peroksidacije.....	26
4.7.3. Određivanje sadržaja vodikovog peroksida.....	27
4.7.4. Određivanje sadržaja slobodnog prolina.....	27
4.7.5. Ekstrakcija topljivih proteina.....	28
4.7.6. Određivanje koncentracije proteina.....	29

4.7.7. Spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti katalaze.....	29
4.7.8. Spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti gvajakol-peroksidaze.....	29
4.7.9. Spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti glutation-reduktaze.....	30
4.8. Statističke analize podataka.....	31
<b>5. Rezultati.....</b>	<b>32</b>
5.1. Utjecaj solnog stresa, osvjetljenja i tretmana donorima H <sub>2</sub> S na promjer puči kod različitih genotipova uročnjaka.....	32
5.1.1. Detekcija i kvantifikacija NO u pučima uročnjaka pomoću CLMS.....	40
5.2. Utjecaj osvjetljenja i tretmana lista donorima NO i H <sub>2</sub> S na promjer puči kod paprike Century RZ (F1).....	42
5.2.1. Antioksidativna aktivnost u listu paprike u uvjetima solnog stresa.....	46
5.3. Utjecaj tretmana lista paprike Quadrato d'Asti Rosso s donorima H <sub>2</sub> S i ABA, na promjer puči.....	48
5.3.1. Utjecaj tretmana lista paprike s donorima NO i H <sub>2</sub> S te cPTIO na otvor puči.....	51
5.3.2. Detekcija i kvantifikacija NO u pučima paprike pomoću CLMS.....	51
5.4. Antioksidativna aktivnost u listu paprike Quadrato d'Asti Rosso, u uvjetima solnog stresa, pod utjecajem tretmana biljke s donorima H <sub>2</sub> S i NO.....	53
5.4.1. Korelacije između pokazatelja antioksidativne aktivnosti u listu paprike u uvjetima solnog stresa pod utjecajem donora NO i H <sub>2</sub> S.....	79
<b>6. Rasprava.....</b>	<b>84</b>
6.1. Interakcije H <sub>2</sub> S i NO u mehanizmu rada puči i odgovoru na solni stres kod uročnjaka i paprike.....	84
6.2. Antioksidativna aktivnost u listu paprike uslijed solnog stresa i uz primjenu donora NO i H <sub>2</sub> S.....	95
<b>7. Zaključak.....</b>	<b>101</b>
<b>8. Literatura.....</b>	<b>104</b>
<b>9. Sažetak.....</b>	<b>118</b>
<b>10. Abstract.....</b>	<b>119</b>
<b>11. Životopis.....</b>	<b>120</b>



## 1. UVOD

Stanični prijenos signala je postao nezaobilazni dio istraživanja u biologiji, koja proučavaju kontrolu unutarnjeg funkcioniranja svakog živog organizma, kako u normalnim životnim uvjetima tako i u uvjetima stresa. Znanje i razumijevanje signalnog sustava u jednoj vrsti tkiva ili organizma često nalazi primjenu u otkrivanju analognih sustava u potpuno drugačijim tkivima i/ili organizmima. Tako su npr. neki signalni mehanizmi početno otkriveni u sisavcima, u posljednje vrijeme definirani u biljkama.

Poznato je da su mnogi aktivni kemijski spojevi uključeni u kontrolu staničnih fizioloških procesa. U takve spojeve spadaju reaktivne kisikove jedinice (ROS), vodikov peroksid kao i reaktivne dušikove jedinice (RNS), poput NO. Ti spojevi mogu ulaziti u stanicu izvana, iz drugih stanica ili mogu biti producirani endogeno, kao produkt različitih staničnih procesa.

ROS i NO mogu dovesti do aktivacije ili inhibicije drugih staničnih signalnih komponenti, poput fosfataza. Taj efekt može biti posredovan kemijskom izmjenom proteina ali i oksidacijom ili nitrozilacijom. Nastajanje NO radikala u biljkama je poznato duže vrijeme ali je tek 1998. uočeno da je oslobađanje NO• uključeno u reakciju obrane od patogena, što je otvorilo cijelo novo područje istraživanja.

Također, do nedavno, sumporovodik ( $H_2S$ ) se obično smatrao fitotoksinom, ali sve veći broj dokaza ukazuje na činjenicu da  $H_2S$  također može imati i ulogu prijenosa staničnog signala te da bi trebao biti rangiran kao važna signalna molekula uz NO i ROS. Pri visokim koncentracijama,  $H_2S$  inhibira enzime kao što su citokrom-oksidge. Međutim, u nižim koncentracijama može djelovati u puno pozitivnijem smjeru. Nove spoznaje proizašle iz rezultata istraživanja staničnog prijenosa signala kod životinja i biljaka, obnovile su interes znanstvenika za razjašnjavanje uloge  $H_2S$  u biološkim sustavima. Primjerice, dokazano je da  $H_2S$  ima utjecaj na mehanizme otvaranja i zatvaranja puči kao i na otpornost biljaka pri toksičnom djelovanju teških metala, poput aluminija i bakra. Tretiranje biljnih stanica s  $H_2S$  pokazalo je da utječe na metabolizam cisteina i glutaciona, a postoji sve veći broj dokaza koji potvrđuju da prisutnost  $H_2S$  može utjecati

i na metabolizam kod oksidativnog stresa te NO signalne puteve. Novi donori H<sub>2</sub>S, poput molekule GYY4137, vrlo su značajan alat koji će u budućim istraživanjima omogućiti rasvjetljavanje uloge H<sub>2</sub>S u kontroli prijenosa staničnog signala. Stoga se ovo istraživanje temelji na pokušaju objašnjenja uloge H<sub>2</sub>S-a u staničnom signalingu kod biljaka, s posebnim naglaskom na utjecaj ovog spoja na NO-signalne puteve te djelovanje ova dva spoja na metabolizam biljke u uvjetima solnog stresa.

## **2. HIPOTEZA I CILJEVI ISTRAŽIVANJA**

### **2.1. Hipoteza**

Osnovna hipoteza je da sumporovodik ( $H_2S$ ) sudjeluje u prijenosu staničnih signala putem dušik oksida (NO) kod biljaka, kao što je to dokazano kod humanih tkiva. Analizom epidermalnog staničja listova biljaka paprike (*Capsicum annuum* L.), uzgajanih u normalnim uvjetima i uvjetima solnoga stresa, trebalo bi utvrditi postoje li interakcije  $H_2S$ -a s NO signalnim putevima i da li te molekule utječu na mehanizme rada puči regulirane abscisinskom kiselinom. Biti će primjenjeni različiti donori  $H_2S$  da bi se ispitalo da li se javlja isti učinak na promjenu otvora puči kod listova paprike kao i kod model biljke uročnjaka (*Arabidopsis thaliana* L.). Pretpostavlja se da postoje interakcije  $H_2S$  i NO kao signalnih molekula koje djeluju na mehanizme otvaranja i zatvaranja puči.

Analize aktivnosti stresnih enzima: katalaze, gvajakol-peroksidaze, glutation-reduktaze te mjerenje sadržaja peroksida, prolina i razine lipidne peroksidacije u lisnom tkivu bi trebale pokazati da li  $H_2S$  i NO imaju utjecaja i na fiziološku reakciju biljke na solni stres.

### **2.2. Ciljevi istraživanja**

1. Utvrditi da li u mehanizmima otvaranja i zatvaranja puči,  $H_2S$  interferira sa NO signalnim putevima, te da li postoji jednak odgovor na  $H_2S$  i NO tretmane kod paprike kao i kod uročnjaka.

2. Utvrditi da li tretmani sa  $H_2S$  i NO utječu na aktivnosti katalaze, glutation-reduktaze i gvajakol-peroksidaze, na akumulaciju vodik peroksida, prolina, te na razinu lipidne peroksidacije, u tkivu lista paprike uzgajane u normalnim uvjetima, te nakon kratkotrajnog izlaganja solnom stresu.

### 3. PREGLED LITERATURE

Generički putevi provođenja signala započinju s percepcijom signala, nakon čega slijedi stvaranje sekundarnih glasnika (npr. inozitol fosfati i reaktivne kisikove jedinice - ROS). Sekundarni glasnici mogu modulirati unutarstaničnu razinu  $Ca^{2+}$ , često inicirati kaskadu fosforilacije proteina koji su direktno uključeni u staničnu zaštitu ili transkripcijske faktore koji kontroliraju specifične setove gena reguliranih stresom (Xiong i sur., 2002.). Produkti tih gena mogu sudjelovati u stvaranju regulatornih molekula poput biljnih hormona abscisinske kiseline (ABA), etilena ili salicilne kiseline. Te regulatorne molekule mogu povratno inicirati sekundarni prijenos signala, koji se mogu razlikovati u specifičnosti od primarnog stimulansa, mogu ih koristiti različiti stresni metabolički putevi i mogu biti podložni interakcijama signalnih puteva za različite vrste stresa i zaštitu od višestrukog stresa. Autori naglašavaju da bi raspoloživost genoma Arabidopsisa i različite reverzne genetske strategije za stvaranje knock-out mutanata trebali dovesti do otkrivanja mnogih novih signalnih komponenti i jasnije slike umreženosti signala pri abiotskom stresu.

Adaptacija biljaka na abiotski stres, kako abiotski (npr. suša, solni stres i ekstremne temperature) tako i biotski (npr. bakterijska, gljivična i virusna oboljenja, insekti i drugi štetnici), kontrolirana je kaskadama gena i molekularnih mreža (Altman i Hasegawa, 2011.). Pri tome se strategije oplemenjivanja biljaka za toleranciju okolišnog stresa oslanjaju na ekspresiju gena uključenih u prijenos signala i regulatorne puteve, gene koji kodiraju proteine koji doprinose toleranciji stresa ili enzime prisutne u putevima sinteze funkcionalnih i strukturnih metabolita. Smith i sur. (2010.) također ističu da se integracija i koordinacija metaboličkih procesa u stanici te njihova modulacija kao odgovor okolišnim i razvojnim promjenama, temelji na regulaciji enzimatske aktivnosti.

Prema Hancock i sur. (2011.), da bi se neka molekula mogla ubrojiti u signalne komponente, potrebno je da ispunjava nekoliko kriterija, po kojima su već vrednovani ROS i RNS (reactive nitrogen species). Signalne molekule se trebaju proizvoditi kad je to potrebno i premješati se na mjesto djelovanja, gdje trebaju biti prepoznate da bi, posljedično, inducirale stanične odgovore. Takve komponente se trebaju odmah

uklanjati kad više nisu potrebne i često se može primjetiti da stupaju u interakcije s brojnim drugim signalnim molekulama, čime sudjeluju u kompleksnim signalnim putevima.

Dobro je poznato da su mnoge reaktivne tvari uključene u kontrolu staničnih događanja i kod životinja i kod biljaka, poput reaktivnih kisikovih i dušikovih jedinki. Reaktivni kisikovi međuprodukti su djelomično reducirani oblici atmosferskog kisika ( $O_2$ ). Oni su rezultat ekscitacije  $O_2$  čime nastaje singletni kisik ( $^1O_2$ ) ili prijenosa jednog dva ili tri elektrona na molekularni kisik, čime nastaje superoksid radikal ( $\bullet O_2^-$ ), vodikov peroksid ( $H_2O_2$ ) odnosno hidroksilni radikal ( $\bullet OH$ ) (Žarković i sur., 2001.; Mittler, 2002.; Halliwell, 2006.). ROS su centralne komponente reakcije na stres i njihova razina određuje tip odgovora na stres (Vranová i sur., 2002.). Te komponente komuniciraju s drugim signalnim molekulama i putevima i sastavni su dio mreže staničnih signala koja kontrolira posljedične reakcije („downstream responses“) u odnosu na ROS. Da bi imali potpuni učinak na biljni metabolizam, ROS moraju koristiti ili uključivati se u druge signalne puteve (Bhattacharjee, 2005.). Jedan od tih signalnih puteva je tzv. ABA signaling, a povezanost ABA i ROS je dobro poznata, premda kako autor ističe, međusobnim se odnosima između tih signalnih molekula i njihovih puteva posvećuje malo pozornosti. Prema Xiong i sur. (2002.), ABA je nedvojbeno biljni hormon koji je najviše uključen u prijenos stresnih signala. Jedan od fizioloških odgovora vezanih za ABA je zatvaranje puči kojim se smanjuje prekomjerna transpiracija, odnosno dehidracija u uvjetima suše, solnog stresa i niske odnosno visoke temperature. Kao posljedica zatvaranja puči, raspoloživost  $CO_2$  za fiksaciju u  $C_3$  ciklusu je ograničena, što povratno pojačava sintezu ROS u kloroplastima (Bhattacharjee, 2005.).

Najviše proučavani među ROS su vodikov peroksid i superoksidni anion, dok istraživane RNS uključuju dušikov oksid (NO) i peroksinitrit (Hancock, 2009.; Wilson i sur., 2008.). Dušik oksid je zapravo slobodni radikal, uobičajeno se prikazuje kao  $NO\bullet$ , što znači da ima nespareni elektron u vanjskoj elektronskoj orbitali te može primiti ili izgubiti elektron, čime nastaju  $NO^+$  odnosno  $NO^-$ , ili se može prevesti u nitrate i nitrite (Hancock, 2010.). Kako je vrlo reaktivan, uz poluvrijeme postojanja reda veličine tek 5-10 s, njegovi efekti su uglavnom lokalni. Međutim, lako difundira kroz membrane pa

mu djelovanje nije ograničeno na neko određeno tkivo, nego može imati funkcije na brojnim i različitim mjestima. Malen, jednostavan i vrlo toksičan, NO je plin sa širokim kemizmom koji uključuje velik broj međusobno povezanih redoks oblika s različitom kemijskom reaktivnošću. Otkrivanje njegovih bioloških funkcija u 80-tim godinama XX stoljeća je bilo iznenađujuće. Časopis Science ga je 1992. proglasio molekulom godine, osnovano je Nitric Oxide Society i časopis Nitric Oxide, potpuno posvećen NO (Delledonne, 2005.). Mittler i sur. (2004.) postavljaju pitanje kako je NO uključen u prijenos signala u biljkama pri abiotskom stresu, što ostaje za razjasniti u istraživanjima biologije biljaka.

Prema Neill i sur (2008.), NO je topljiv i u vodi i u lipidima, ali je i relativno reaktivan i lako se oksidira u druge dušikove okside. U reakciji sa superoksidnim radikalom stvara peroksinitrit, reagira s drugim staničnim komponentama poput tranzicijskih metala i proteinima koji sadrže hem, a s tiolnim grupama stvara S-nitrozotiole. Stoga, difuzija NO unutar biljke može biti relativno ograničena i mogu postojati „NO hot-spots“ ovisno o mjestu nastanka NO i lokalnoj biokemijskoj mikrookolini. Alternativno, moguće je da se transportira u obliku kemijskih prekursora poput nitrita ili nitrozotiola, koji mogu služiti kao rezervoari NO. Stanična percepcija NO se može dogoditi kroz njegovu reakciju s biološki aktivnim molekulama koje bi mogle funkcionirati kao senzori NO. U njih bi se mogli svrstati proteini s hemom poput gvanilil-ciklaze koja generira sekundarnog glasnika cGMP, ili drugi proteini koji sadrže izložene reaktivne tiolne grupe.

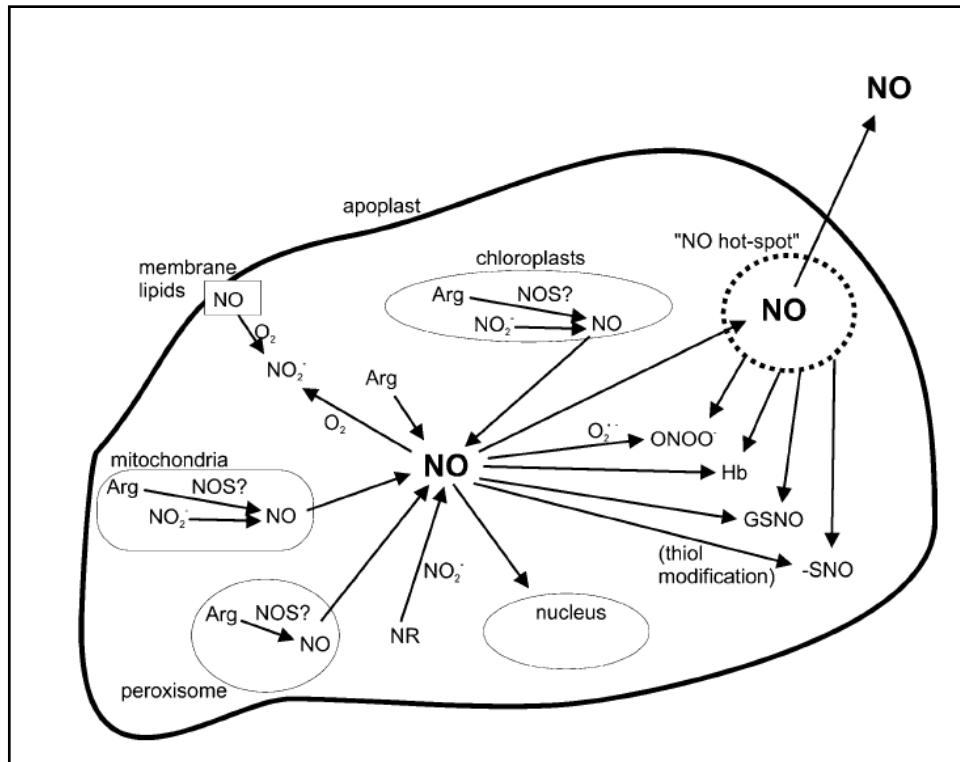
Neki od fizioloških i toksičnih učinaka NO proizlaze iz djelovanja tog radikala u mitohondrijima (Wulff i sur., 2009.). Autori objašnjavaju da se NO veže u nanomolarnim koncentracijama na citokrom c-oksidadu (kompleks IV ili COX) u kompeticiji s kisikom, čime reverzibilno inhibira taj terminalni enzim respiratornog lanca.

Prema Gas i sur. (2009.), NO se pojavljuje kao centralna signalna molekula u biljkama i životinjama. Kod sisavaca ga proizvodi enzim NO sintaza, koji kodiraju tri gena: *eNOS*, *nNOS* i *iNOS* (Pengelly i sur., 2010.). Wilson i sur. (2008.) spominju tri enzima NO

sintaza, koji su kod sisavaca dimerni proteini sastavljeni od podjedinica veličine 130-160 kDa. Koristeći kratki redoks put, prevode L-arginin preko intermedijera hidroksil arginina u L-citrulin uz istovremeno otpuštanje NO. Međutim, dugo traženje enzima NO sintaze (NOS) u biljkama je do sada rezultiralo samo pogrešnim tragovima. Pregled baze podataka za genom Arabidopsisa ne ukazuje na prisustvo konkretnog gena za NOS enzim (Hancock, 2010.), stoga je jasno da u biljkama mora postojati više od jednog izvora NO•. NOS - slična aktivnost je potvrđena u biljkama, na temelju mjerenja konverzije L-arginina u L-citrulin, ali gen ili protein koji bi bio homolog NOS u sisavaca još nije detektiran, potvrđuju i Wulff i sur. (2009.). Moreau i sur. (2008.) navode da je AtNOS1 ranije identificiran kao potencijalna NO sintaza u *A. thaliana* L., unatoč nedostatku sekvencijalne sličnosti sa životinjskim NOS (Crawford, 2006.). Na temelju dokaza da AtNOS1 ne može vezati i oksidirati arginin do NO već hidrolizira GTP u GDP, smatraju da taj enzim (AtNOS1/AtNOA1) nije NO sintaza u biljkama, već cGTPaza. Gotovo u isto vrijeme, Li i sur. (2009.) objavljuju rezultate istraživanja na temelju kojih zaključuju da zatvaranje puči inducirano s H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ovisi o AtNOA1-generiranom NO.

Koristeći mutante kao što je dvostruki mutant Arabidopsisa *nia1, nia2* Desikan i sur. (2002.) su utvrdili da je nitrat-reduktaza uključena u ABA-induciranu pojavu NO u stanicama zapornicama. Wilson i sur. (2008.) smatraju da, bar kad su u pitanju stanice zapornice, izoforma nitrat-reduktaze NIA1 ima definitivnu ulogu u produkciji NO u reakciji na stimulans koji inicira zatvaranje puči. Međutim, informacije o ulozi NO u zatvaranju puči koje se događa u turgescentnim, za razliku od dehidriranih biljaka, su ograničene (Wilson i sur. 2009.). Dok je za zatvaranje puči kod turgescentnih listova inducirano s ABA potreban NO, takva potreba ne postoji pri zatvaranju puči stimuliranom s ABA koje se javlja u uvjetima brze dehidracije. Ribeiro (2007.) je u svojoj disertaciji utvrdio da ABA pokreće stvaranje NO a njegov scavenger c-PTIO inhibira zatvaranje puči u turgescentnim listovima, za razliku od dehidriranih listova. Sintaza NO putem nitrat-reduktaze je potrebna za ABA-inducirano zatvaranje puči u turgescentnim listovima. Autor zaključuje da kod Arabidopsisa NO nije neophodan za zatvaranje puči pokrenuto s ABA tijekom vodnog stresa, odnosno da je NO-ovisan prijenos signala vjerojatno samo jedan ogranak ABA signalne mreže.

Svojevrsnu staničnu „mapu“ NO su prikazali Neill i sur. (2008.b), prema kojoj se NO stvara i uklanja pomoću nekoliko potencijalnih mehanizama, na nekoliko intracelularnih lokacija (*Slika 1*).

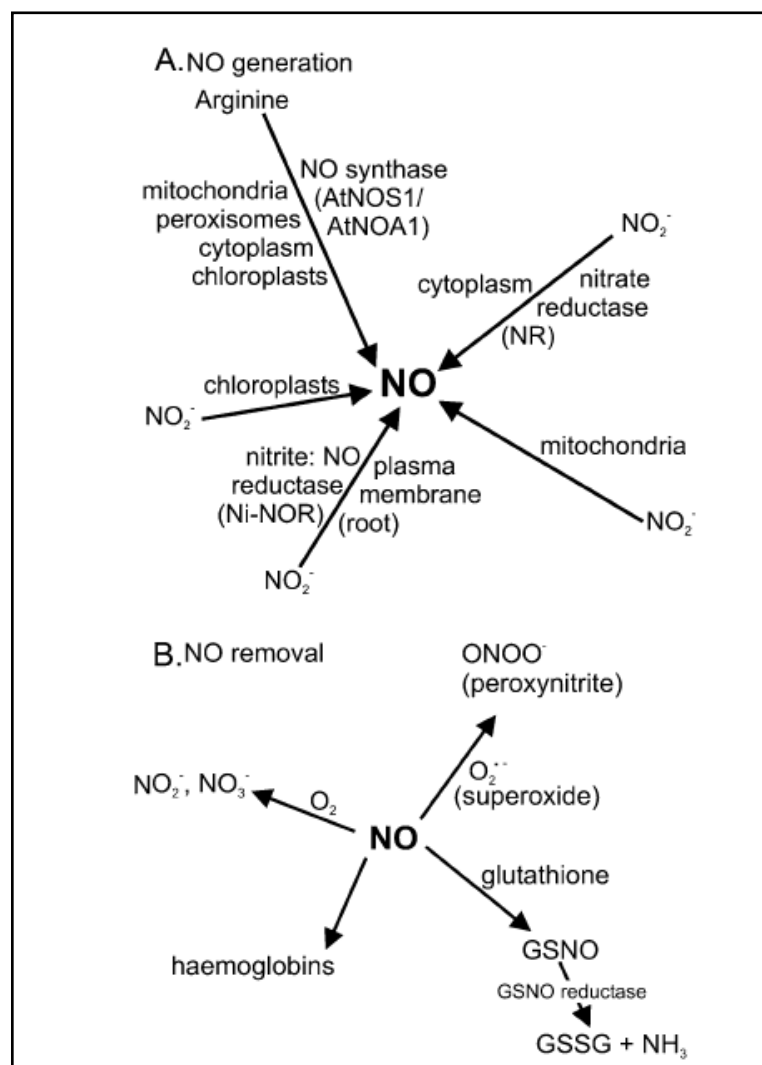


*Slika 1.* Stanična mapa NO prema Neill i sur. (2008.b).

Autori daju i pregled osnovnih potencijalnih mehanizama nastanka i uklanjanja NO u biljnim stanicama (*Slika 2*).

Pored već dobro poznatih načina djelovanja u životinjskim organizmima, kao i opisanog djelovanja na zatvaranje puči kod biljaka (García-Mata i Lamattina, 2001., 2002., 2007.; Neill i sur., 2002.a; Desikan i sur., 2002.; Bartels i Sunkar, 2005.; Wilson i sur., 2008.), NO utječe na dormantnost sjemena (Bethke i sur., 2006.), razvoj cvijeta (Simpson, 2005.), gravitropizam korijena (Hu i sur., 2005.), ekspresiju gena (Grun i sur., 2006.), obrambene reakcije biljaka pri napadu patogena (Hancock i sur., 2001.; Mur i sur., 2006.), fotomorfogenezu (Lozano-Juste i León, 2011.), toleranciji na višak Zn (Xu i sur., 2010.), antioksidativnoj zaštiti od UV-B zračenja (Zhang i sur., 2009.) i dr.



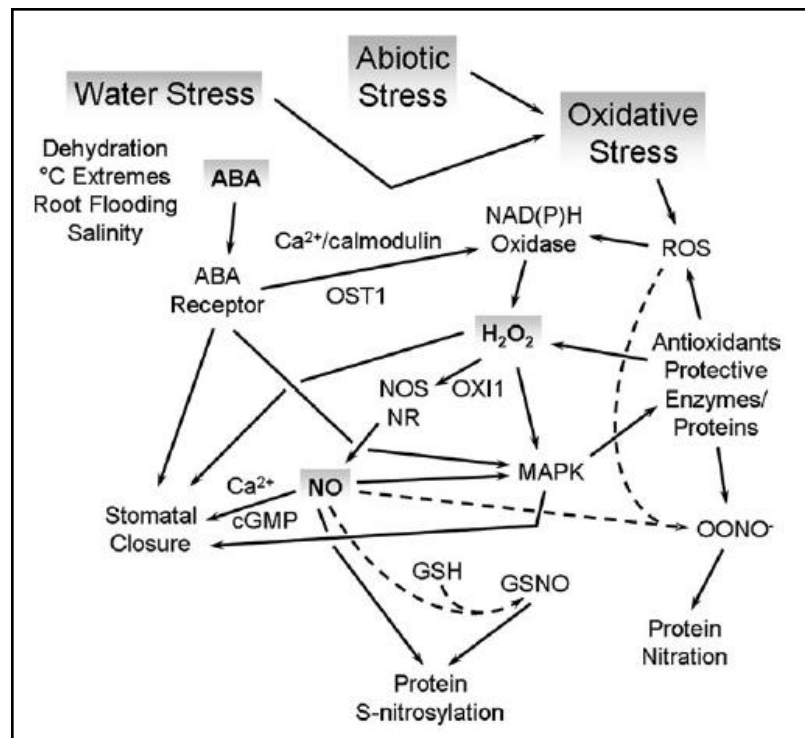


**Slika 2.** Nastanak (A) u uklanjanje (B) NO u stanici prema Neill i sur. (2008.b).

Rezultati istraživanja She i sur. (2010.) pokazuju da poput NO scavengera c-PTIO (2-(4-karboksifenil)-4,4,5,5-tetrametilimidazolin-1-oksil-3-oksidi) i inhibitora dušik oksid sintaze L-NAME ( $\text{N}^G$ -nitro-L-arginin-metil ester), fuzikokcin u listovima boba inhibira zatvaranje puči uslijed tame te smanjuje razinu NO u stanicama puči u tami. Slično kao c-PTIO, fuzikokcin i maslačna kiselina ne samo da sprječavaju zatvaranje puči izazvano donorom NO (SNP), kao i fluorescenciju NO putem tretmana s DAF-2DA, nego i otvaraju prethodno tamom zatvorene puči te uklanjaju NO koji je nastao uslijed tame.

Kako je NO identificiran kao komponenta ABA signalnog puta u stanicama zapornicama puči i na temelju poznavanja povezanosti  $\text{H}_2\text{O}_2$  i ABA u mehanizmu rada puči, Neill i sur. (2002.b) zaključuju da se čini da se  $\text{H}_2\text{O}_2$  i NO proizvode i djeluju u

tandemu. Detaljni pregled mehanizma djelovanja NO u zatvaranju puči te signalnih interakcija između ABA, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i NO su dali Neill i sur. (2008.a). Zatvaranje puči koje stimulira ABA, pod utjecajem je kompleksne simfonije staničnih signala u kojima, čini se, jedna od komponenti je NO. Dosadašnja istraživanja sugeriraju da suša i solni stres induciraju stvaranje NO koji aktivira stanične procese koji pružaju određenu zaštitu od oksidacijskog stresa u takvim uvjetima (Slika 3).



**Slika 3.** Vodni, abiotski, oksidacijski stres i signalne interakcije između ABA, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i NO prema Neill i sur. (2008.a).

NO pojačava aktivnost antioksidativnih gena i enzima putem MAPK i drugih neidentificiranih signalnih puteva. Na primjer, aktivnost superoksid-dismutaze se može povećati zajedno s aktivnosti katalaze i askorbat-peroksidaze da bi se spriječio porast ROS, mogu se stvarati proteini poput dehidrina radi sprječavanja dehidracije stanice. Također, druge vrste abiotskog stresa induciraju oksidacijski stress, stvaranje H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i NO te pojačanu antioksidacijsku obranu. Međutim, autori ističu da točnu ulogu tih procesa u zatvaranju puči i prevladavanju stresa tek treba razjasniti. Prema Desikan i sur. (2004.), stanice zapornice puči su jedinstveni model za istraživanje staničnog prijenosa signala odnosno elegantni sustav za raščlanjivanje mreže signalnih puteva.

Jasno je da H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i NO imaju centralnu ulogu u mreži signala u stanicama zapornicama kontroliranoj s ABA. Obje molekule se sintetiziraju kao odgovor na ABA, vjerojatno paralelno, i obje kontroliraju jedinstveni odgovor - smanjenje otvora puči. Međutim, autori naglašavaju da egzaktne interakcije između različitih signalnih komponenti u odgovoru na H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i NO u stanicama zapornicama tek treba utvrditi.

MacRobbie (1992.), kao univerzalni princip reakcije na ABA, pretpostavlja povećanje koncentracije Ca<sup>2+</sup> i povećanje pH u citoplazmi. Kasnije je utvrđeno da NO selektivno regulira Ca<sup>2+</sup> osjetljive K<sup>+</sup> i Cl<sup>-</sup> kanale u plazmalemi stanica zapornica u *Vicia faba* L., stimulirajući oslobađanje Ca<sup>2+</sup> iz intracelularnih rezervi, što dovodi u vezu djelovanje NO i Ca signalne puteve koje aktivira ABA (Garcia-Mata i sur., 2003.).

Neill i sur. (2002.c) ističu da je jasno da NO i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> djeluju kao stresni signali u biljkama, upravljajući širokim rasponom odgovora na okolišni stres. Kako taj stres stvara značajne poteškoće u biljnoj proizvodnji, autori smatraju daljnja istraživanja u tom području stvarnom potrebom. Jin i sur. (2010.) zaključuju da arsenom uzrokovan stres u *Festuca arundinacea* Schreb. povećava razinu endogenog NO i da NO može djelovati kao signalna molekula u povećanju aktivnosti antioksidativnih enzima.

Iako ROS mogu direktno utjecati na sintezu i akumulaciju NO, također mogu i konkurirati za potencijalna mjesta vezanja NO, ali specifični receptor NO u biljkama do sada nije identificiran (Wilson i sur., 2008.). NO reagira s tiolnim skupinama pa je to vjerojatno osnovni put kojim modificira proteine i djeluje kao signal.

Kod životinja je H<sub>2</sub>S početno smatran signalnom komponentom (Kimura, 2000.; Wang, 2003.) i poistovjećivan s "trećim gasotransmitterom" (Mancardi i sur., 2009.; Wang, 2010.), pored NO i CO. H<sub>2</sub>S je bezbojan, zapaljivi plin, stoga se ne bi mogao smatrati idealnim u ulozi signalne molekule (Hancock i sur. 2011.). Sigurno, zbog tih svojstava ga se teško proučava. U biološkim sustavima se može mjeriti, npr. na principu sinteze metilen plavog iz sulfida i N,N-dimetil-p-phenilenediamina u prisustvu Fe<sup>3+</sup> te spektrofotometrijske detekcije na 675 nm (Siegel, 1965.).

Kao endogeno sintetiziran plin sa signalnim potencijalom, izazvao je velik broj istraživanja u području humane fiziologije, gdje se otkrivaju njegovi efekti u kardiovaskularnom, imunološkom, probavnom, endokrinom, genitourinarnom i centralnom živčanom sustavu (Banerjee, 2011.). Sumporovodik pripada grupi malih ponekad plinovitih komponenata koje i biljke koriste za kontrolu svojih fizioloških i biokemijskih aktivnosti. U vodenoj sredini H<sub>2</sub>S je slab reducens (Wang, 2002.), stoga može modulirati intracelularni redoks status. U životinjskim stanicama produkcija H<sub>2</sub>S je rezultat djelovanja dva enzima uključena u metabolizam cisteina, tj. cistationin gama-liaze i cistationin beta-sintaze (Mancardi i sur., 2009.; Whiteman i Moore, 2009.). Čini se da su u biljkama za sintezu H<sub>2</sub>S odgovorni enzimi desulfhidraze. Léon i sur. (2002.) su izvjestili o cistein-desulfhidrazama lociranim u plastidima, dok su Riemenschneider i sur. (2005.) izolirali i opisali sličan enzim u mitohondrijima Arabidopsisa.

Dosadašnjim istraživanjima je dokazano da H<sub>2</sub>S utječe na biljni metabolizam. Općenito, H<sub>2</sub>S je poznat kao fitotoksin pri većim koncentracijama (Koch i sur., 1990.; 2001., Dorman i sur., 2002.) i smatran je štetnim za biljke. Biljke mogu biti izložene djelovanju H<sub>2</sub>S prisutnog u okolišu. Tla u kojima se javlja anoksija (Morse i sur., 1987.), poput močvarnih tala, mogu producirati H<sub>2</sub>S kojemu je izloženo korijenje biljaka u tim područjima. Nadzemni dijelovi biljaka mogu biti izloženi H<sub>2</sub>S-u u atmosferi. H<sub>2</sub>S se često emitira iz mnogih izvora, poput postrojenja za prečišćavanje vode (Zhang i sur., 2008.), poljoprivredne industrije (Aneja i sur., 2008.) i geotermalnih elektrana (Bacci i sur., 2000.). Kourtidis i sur. (2008.) navode da se H<sub>2</sub>S može naći u iznenađujuće visokim koncentracijama u nekim urbanim sredinama, gdje se kao njegov potencijalni izvor smatraju katalizatori u vozilima. H<sub>2</sub>S se može producirati i akumulirati izvan biljke, ali i dalje ima utjecaj na biljni rast i preživljavanje. Bakterije pronađene u plavnim tlima i močvarama, koje reduciraju SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, poput *Desulfovibrio*, mogu producirati sulfid (Postgate, 1959.), dok razina sulfida u nekim morskim tlima može biti i veća od 1 mM (King i sur., 1982.).

Koristeći plameni fotometar, Wilson i sur. (1978.) su dokazali da krastavac, tikvica, bundeva, soja i pamuk, između ostalih biljaka, imaju sposobnost produkcije hlapljivih sumpornih spojeva poput H<sub>2</sub>S, ali da je takva aktivnost ovisna o svjetlu. Intenzitet

emisije je bio različit, sve do  $10 \text{ nmol min}^{-1}$  kod listova veličine  $50 \text{ cm}^2$ . Ako je korijen tretiran sulfatom i ako je biljka osvjetljena, emisija traje do nekoliko sati. Nadalje, ako listovi preko peteljki usvajaju sulfat, ili je korijen biljaka mehanički oštećen, količina emitiranog  $\text{H}_2\text{S}$ -a značajno se povećava. Sekiya i sur. (1982.a) su također mjerili emisiju  $\text{H}_2\text{S}$  iz diskova lista krastavca, tretiranih sa sulfatom na svjetlu te utvrdili intenzitet emisije od  $50\text{--}100 \text{ pmol min}^{-1} \text{ cm}^{-2}$  lista. Također, utvrđeno je da mladi listovi krastavca pokazuju jaču emisiju od zrelih listova (Sekiya i sur., 1982.b). Hällgren i Fredriksson (1982.) su dokazali mjerljivu emisiju  $\text{H}_2\text{S}$  u iglicama *Pinus silvestris* L., izloženim niskim koncentracijama  $\text{SO}_2$ , uz povećanu toleranciju na  $\text{SO}_2$ . Emisija  $\text{H}_2\text{S}$  je ovisila o svjetlu, trajala značajno dugo nakon uklanjanja  $\text{SO}_2$ , a autori pretpostavljaju da je za sintezu  $\text{H}_2\text{S}$  odgovoran metabolizam sumpora u kloroplastima. Otpuštanje  $\text{H}_2\text{S}$ -a iz biljaka je potvrdio i Rennenberg (1983.). Otkriveno je da listovi bundeve tretirani sulfatom, sulfitom, cisteinom ili sa  $\text{SO}_2$ , emitiraju  $\text{H}_2\text{S}$ , ali su uključeni drugačiji metabolitički putevi obzirom na različite oblike dodanih sumpornih spojeva. Takemoto i sur. (1986.) su uočili povećanu emisiju  $\text{H}_2\text{S}$  i akumulaciju tiola u vodenoj leći (*Lemnaceae*) u uvjetima jakog osvjetljenja i pretpostavili da je to značajno za toleranciju na toksičnost sulfita. U istraživanju Westerman i sur. (2001.), sadržaj tiola je povećan tri puta u listovima *Brassica oleracea* L. pri fumigaciji listova s  $\text{H}_2\text{S}$  u rasponu koncentracije  $0,2\text{--}0,8 \text{ }\mu\text{L L}^{-1}$  zraka. Dakle, bilo da je  $\text{H}_2\text{S}$  produciran od strane biljke ili potječe iz njezinog okoliša, način na koji biljke odgovaraju na prisustvo ovog spoja do sada nije potpuno razjašnjen.

Thompson i Kats (1978.) su tretirali različite vrste biljaka kontinuiranom fumigacijom  $\text{H}_2\text{S}$ -om. Kod lucerne, grožđa, salate, šećerne repe, bora i jele,  $3000 \text{ ppb}$   $\text{H}_2\text{S}$  je uzrokovalo pojavu lezija i otpadanje listova te reducirani rast biljaka. Međutim, tretman  $\text{H}_2\text{S}$ -om ne mora uvijek biti štetan. Interesantno je, da je fumigacija nižim koncentracijama od  $100 \text{ ppb}$ , uzrokovala značajno povećanje rasta kod *Medicago*, salate i šećerne repe (Thompson i Kats, 1978.). Na šećernoj repi su također utvrdili značajno manji napad patogenih gljiva na tretiranim biljkama, te zaključili da  $\text{H}_2\text{S}$  ima inhibitorni učinak na njihov rast. Međutim, tretman s  $\text{H}_2\text{S}$  je smanjio sadržaj šećera u korijenu. Povezanost sinteze  $\text{H}_2\text{S}$  s biotskim stresom potvrđuju i rezultati Bloem i sur. (2004.), u

kojima je infekcija *Brassica napus* L. s gljivom *Pyrenopeziza brassica* povećala aktivnost enzima sposobnih za sintezu H<sub>2</sub>S (L-cistein-desulfhidraza).

Nedavno je dokazano da NaHS kao donor H<sub>2</sub>S ublažava osmotski inducirani pad koncentracije klorofila u batatu (Zhang i sur., 2009.a), povećana je antioksidativna aktivnost a ujedno se smanjila koncentracija vodik peroksida i aktivnost lipoksigenaze, čime je utvrđeno da H<sub>2</sub>S ima značajnu ulogu u zaštiti biljaka od oksidativnog stresa. U istraživanju uloge H<sub>2</sub>S u reakciji pšenice na toksičnost aluminija, Zhang i sur. (2010.a) su uz predtretman sjemena s otopinom NaHS utvrdili povećanu aktivnost antioksidativnih enzima (superoksid-dismutaze, katalaze, askorbat-peroksidaze, gvajakol-peroksidaze), što dokazuje povezanost H<sub>2</sub>S i staničnog odgovora na oksidativni stres. Inhibicija klijanja pšenice uslijed toksičnosti bakra je smanjena pri tretmanu s NaHS (Zhang i sur., 2008.), uslijed povećanja aktivnosti superoksid-dismutaze, katalaze, esteraze i amilaze te smanjene aktivnosti lipoksigenaze, uz nižu razinu peroksida i malondialdehida. Povećana aktivnost β-amilaze utvrđena je u sjemenu pšenice tretiranom 12 h s NaHS u istraživanju Zhang i sur. (2010.b). Također, vezano za promjene metabolizma uslijed oksidativnog stresa, utvrđena je reakcija i drugih biljaka, poput pšenice na fumigaciju H<sub>2</sub>S-om, u smislu tolerancije na smrzavanje, u istraživanju Stuiver i sur. (1992.).

Također su istraživani i neki drugi intracelularni odgovori na H<sub>2</sub>S. Na primjer, fumigacijom špinata utvrđen je porast koncentracije glutaciona (De Kok i sur. 1985.), kao i u listovima, korijenu te soku ksilema i eksudatu floema kod jablana (Herschbach i sur., 2000.) te značajno povećanje sadržaja cisteina i glutaciona u listovima *Arabidopsis* u istraživanju Riemenschneider i sur. (2005.). Istraživanja Zhang i sur. (2009.b), pokazala su da niže koncentracije H<sub>2</sub>S (0,5%), mogu pozitivno utjecati na indukciju rasta korijena batata. Utvrđeno je da se približno 40% H<sub>2</sub>S-a u listovima veže u glutation. 48 sati nakon prestanka fumigacije H<sub>2</sub>S-om, razina glutaciona ponovo je pala, na razine vrijednosti slične kontrolnim biljkama. Otkriće askorbat - glutation ciklusa u gotovo svim staničnim kompartmentima, kao i visok afinitet askorbat-peroksidaze prema H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, sugerira da taj ciklus ima ključnu ulogu u kontroli razine ROS u tim kompartmentima (Mittler, 2002.). Glutacion štiti tiolne grupe enzima, regenerira

askorbat i reagira sa singletnim kisikom i hidroksilnim radikalom (Arora i sur., 2002.). Pri regeneraciji askorbata, glutation (GSH) se oksidira u glutation disulfid (GSSG), iz kojeg se regenerira GSH pomoću enzima glutation-reduktaze u reakciji ovisnoj o NADPH.

Biljke duhana transformirane s genom za O-acetilserin liazu pokazale su manju osjetljivost na tretmane H<sub>2</sub>S-om, ukazujući da navedeni enzim sudjeluje u njegovom uklanjanju i detoksifikaciji (Youssefian i sur., 1993.). Također je utvrđeno da H<sub>2</sub>S inhibira djelovanje alkohol-dehidrogenaze (Koch i sur., 1990.). To je bilo popraćeno smanjenjem ukupnih adenin nukleotida u korijenu, smanjenjem usvajanja nitratnog dušika kao i slabijim porastom listova. Alkohol-dehidrogenaza je enzim koji reagira na ROS (Men i Wang, 2007.) kao i na NO (Gergel i Cederbaum, 1996.), što ukazuje na interakcije H<sub>2</sub>S, ROS i NO metabolizma (Hancock i sur., 2011.).

Interakcije NO i H<sub>2</sub>S su već uočene u animalnim sustavima (Wang i sur., 2008.; Whiteman i sur., 2006.; Ali i sur., 2006.), dok se spoznaje o njihovim međusobnim odnosima i značaju za biljku tek razvijaju. Prema rezultatima istraživanja Zhang i sur. (2009.b), H<sub>2</sub>S donor NaHS je izazvao povećanje endogenog H<sub>2</sub>S, NO i indol octene kiseline (IAA) u vrhu korijena klijanaca batata.

García-Mata i Lamattina (2010.) u istraživanju s *Vicia faba* L., *Arabidopsis thaliana* L. i *Impatiens Walleriana* Hook. f. su utvrdili da egzogeni H<sub>2</sub>S izaziva zatvaranje puči i smatraju da su potrebna daljnja istraživanja usmjerena na produkciju H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ovisnu o ABA, uz dodatak egzogenog H<sub>2</sub>S. Prema Desikan (2010.), neophodno je pažljivo raščlanjivanje interakcija između H<sub>2</sub>S, NO i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u stanicama zapornicama.

Iako je emisija H<sub>2</sub>S uočena u mnogim biljnim vrstama i poznato je da ima ulogu u različitim odgovorima na stres, njegova uloga kao signalne molekule u biljkama još nije dovoljno jasno definirana (Zhang i sur., 2010.a).

U svim biljkama postoje načini aklimatizacije na stres kroz fiziološke odgovore kojima se prilagođava njihov rast, razvoj i metabolizam (Smith i sur., 2010.). Prevladavajući

tipovi okolišnog stresa su oni koji ograničavaju opskrbu biljke vodom, a uključuju sušu, zaslanjenost i nisku temperaturu. Odgovori biljaka na te stresove podrazumijevaju slične signalne mehanizme i metaboličke odgovore. Reakcija na nedostatak vode uključuje regulaciju rada puči i sintezu osmolita, smanjeni vodni potencijal stanice, stabilizaciju proteina i strukture membrana te zaštitu od oksidacijskog oštećenja. Kao najčešće oblike abiotskog stresa Bhatnagar-Mathur i sur. (2008.) ističu sušu, ekstremne temperature i zaslanjenost tla. Altman i Hasegawa (2011.) također navode sušu i zaslanjenost kao najvažnije vrste abiotskog stresa vezanog za vodu, koji ograničavaju produktivnost usjeva. Autori ističu da se strategije biljnog genetskog inženjerstva za toleranciju okolišnog stresa zasnivaju na ekspresiji gena uključenih u signalne i regulatorne puteve koji kodiraju proteine odgovorne za toleranciju stresa, ili enzime uključene u puteve kojima dolazi do sinteze funkcionalnih i strukturnih metabolita.

Suvremena poljoprivredna praksa, krčenje zemljišta, nedovoljno ili slabo navodnjavanje i nedostatak drenaže, prema Smith i sur. (2010.), često povećavaju zaslanjenost tla, stoga autori predviđaju da će do 2050. godine na globalnoj razini problemom zaslanjenosti biti obuhvaćeno oko 50% svih obradivih površina. Prema Szabadosz i sur. (2011.), otprilike 40% obradivih površina je aridno, semiaridno ili izloženo zaslanjivanju tla, što sve smanjuje prinos usjeva s povećanim ekološkim, agroekonomskim i ekonomskim značajem. Türkan i Demiral (2009.) također smatraju da solni stres predstavlja najveću ekološku prijetnju poljoprivredi, naročito u područjima gdje se zaslanjena voda koristi za navodnjavanje. Abiotski stres a naročito zaslanjenost i suša, primarni su uzrok gubitka prinosa širom svijeta i najznačajnije vrste abiotskog stresa vezane za vodni stres (Vinocur i Altman, 2005.; Altman i Hasegawa, 2011.). Jiang i sur. (2007.) također ističu zaslanjenost tla kao prevladavajući abiotski stres koji ograničava produktivnost i geografsku rasprostranjenost biljaka. Autori su proveli analizu proteoma u korijenu Arabidopsisa pri solnom stresu od 150 mM NaCl i identificirali prisustvo mnogih proteina za koje je od prije poznato da se javljaju u uvjetima stresa, kao i proteine uključene u neutralizaciju slobodnih radikala, prijenos signala, translaciju, biosintezu stanične stijenke, metabolizam energije, aminokiselina, proteina i hormona. Arabidopsis je odličan model za proučavanje reakcija na abiotski stres i primjenu biotehnologije (Zhang i sur., 2004.). Autori smatraju da tek nakon što



potpuno shvatimo kako biljke reagiraju na stres - često prvo s *Arabidopsisom* a zatim primjenjujući utvrđeni model na kulturne biljke - biti ćemo u stanju regulirati toleranciju na stres. Prema Vinocur i Altman (2005.), u većini objavljenih molekularnih studija tolerancije abiotskog stresa je korišten *Arabidopsis* (pored ograničenog broja kulturnih vrsta), tipičan glikofit koji nije adaptiran na solni ili sušni stres. Autori konstatiraju da sve vrste abiotskog stresa izazivaju kaskadu fizioloških i molekularnih događanja od kojih neka mogu rezultirati sličnim odgovorima, npr. suša, visoka zaslanjenost i smrzavanje se na staničnoj razini mogu manifestirati fiziološkom dehidracijom.

Važna fiziološka prilagodba na solni stres uključuje modulaciju funkcije stanica zapornica puči. Kod glikofita  $\text{Na}^+$  ioni stimuliraju otvaranje puči, dok je kod halofita suprotno. Otvorenost puči, prema Brewer (1992.), daje puno informacija o tome kako listovi „osjećaju“ i reagiraju na okolišne uvjete. Jako svjetlo, temperatura ispod  $30^\circ\text{C}$ , mala brzina vjetra i vlažno tlo dovode do otvaranja puči. Iznenadno i produljeno zasjenjivanje, temperatura lista iznad  $30^\circ\text{C}$ , velika brzina vjetra i suho tlo skoro uvijek rezultiraju zatvaranjem puči.

Prema Robinson i sur. (1997.), kod ne-halofita je funkcija puči u uvjetima solnog stresa oštećena natrijevim ionima a poremećaj normalne regulacije transpiracije vjerojatno doprinosi njihovoj nesposobnosti preživljavanja u zaslanjenim tlima. Autori smatraju da zbog vjerojatnosti da toleranciju na solni stres kontrolira više gena, treba istražiti svaki proces koji u njoj sudjeluje, pri čemu je regulacija transpiracije nesumnjivo od velikog značaja. Pored toga, poznavanje reakcije puči povećava naše razumijevanje asimilacije ugljičnog dioksida i intenziteta transpiracije, kao i prirode ekofizioloških prilagodbi biljaka njihovom okolišu (Brewer, 1992.).

Prema Smith i sur. (2010.), između 5000 i 6000 biljnih vrsta u svijetu su halofiti, biljke prilagođene rastu u uvjetima zaslanjenog tla. Većina ostalih biljnih vrsta su glikofiti, kojima nedostaje genetska osnova za toleranciju zaslanjenosti. Prema Gémes i sur. (2011.), interakcije signalnih puteva induciranih salicilnom kiselinom i visokim salinitetom u biljkama rajčice se javljaju na razini proizvodnje ROS i NO. Paprika je

jednogodišnja biljka iz porodice *Solanaceae*, koja se u Hrvatskoj uzgaja na oko 3700 ha godišnje (Parađiković, 2009.). Plod paprike sadrži najviše vitamina C od svih povrćarskih kultura, a također je i značajan izvor karotena te je zreli crveni plod paprike karotenom bogatiji od mrkve. Aktas i sur. (2006.) ističu da je među povrtnim vrstama paprika vrlo osjetljiva na solni stres, pri čemu su u svom istraživanju genetske varijabilnosti paprike prema otpornosti na solni stres uključili 102 genotipa. Paprika je jedna od najvažnijih vrsta u porodici *Solanaceae*, uz rajčicu, krumpir, patlidžan, petuniju i duhan (Ince i sur., 2010.). Proizvodnja paprike za začine, kao povrće i za druge namjene se povećava svake godine. Chookhampaeng (2011.) smatra papriku dobrim modelom za proučavanje mehanizama adaptacije biljke na zaslanjenost te ističe povećanu aktivnost katalaze i akumulaciju prolina kao mehanizme obrane od solnog stresa u listovima paprike.

## 4. MATERIJAL I METODE

### 4.1. Fluorometrijsko ispitivanje međusobnih interakcija GYY4137, NaHS, ABA, SNP u MES-KCl puferu uz dodatak DAF-2

Testiranje fluorescencije kemikalija: GYY4137 (morfolin-4-ium 4 metoksifenil (morfolino) fosfinoditioat), NaHS (natrij hidrogen sulfid), SNP (natrij nitroprusid) i ABA (abscisinska kiselina) uz dodatak DAF-2 (4,5 diaminofluorescein, Calbiochem, Nottingham, UK) u MES-KCl puferu (10 mM 2-morfolino etan sulfonilna kiselina (MES), 5 mM KCl, 50  $\mu$ M CaCl<sub>2</sub>, pH 6.15), *in vitro*, je izvršeno pomoću fluorometra Hitachi digilab F-2500 (Hitachi High-Technologies Corporation). Ukupni volumen uzorka u kojem je mjerena fluorescencija je iznosio 1 mL, s time da su konačne koncentracije kemikalija bile jednake korištenima pri tretiranju fragmenata epiderme prilikom mjerenja fluorescencije puči pomoću CLSM. Konačna koncentracija za GYY4137 i NaHS: 100  $\mu$ M, ABA: 50  $\mu$ M, DAF-2: 15  $\mu$ M. Kao pozitivna kontrola na fluorescenciju *in vitro*, u kombinaciji sa DAF-2, korištene su 50, 100 i 200  $\mu$ M otopine SNP (donora NO). Za sve ispitivane kemikalije su korištene radne otopine od 5 mM. Fluorescencija je mjerena koristeći programsku podršku FL Solutions (Hitachi High-Technologies Corporation), besprekidno, tijekom 1 minute, uz postavke ekscitacije na 500,0 nm i emisije na 515,0 nm valne duljine. Prvih 30 sekundi je mjerena fluorescencija čistih kemikalija ili njihovih kombinacija, u MES-KCl puferu, a nakon toga je dodan DAF-2 te je mjeran daljnji porast fluorescencije, sljedećih 30 sekundi. Za svaku pojedinu kemikaliju kao i njihove kombinacije, mjerenja su vršena u tri ponavljanja.

### 4.2. Preliminarni pokusi: mjerenje otvora puči kod uročnjaka, nakon tretmana donorima H<sub>2</sub>S i ABA-om

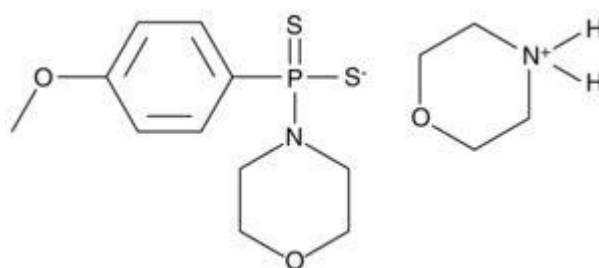
#### 4.2.1. Uzgoj biljaka uročnjaka

Divlji tipovi uročnjaka, ekotipovi Landsberg erecta i Columbia su zasijani u supstrat Levington's F2 compost (Avoncrop, Bristol, UK) i uzgajani u potpuno kontroliranim uvjetima u klima komori Sanyo (Sanyo Gallenkamp, Loughborough, UK) na

temperaturi od 21°C, sa 12-satnim foto periodom, uz prosječan intenzitet svjetlosti od 90-100  $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  na sve tri razine polica navedene klima komore. Za analize otvora puči su korišteni svježiji, potpuno razvijeni listovi, u fazi od 4-5 tjedana starosti.

#### 4.2.2. Tretiranje listova donorima H<sub>2</sub>S

Listovi su bili tretirani H<sub>2</sub>S-om koristeći 5 mM radne, vodene otopine NaHS, odnosno GYY4137. Naime dodatkom NaHS u vodenu otopinu, H<sub>2</sub>S se oslobađa vrlo brzo i u relativno kratkom vremenskom periodu, dok vodotopivi GYY4137 (*Slika 4*), oslobađa H<sub>2</sub>S puno sporije i ravnomjernije, što je prema Li i sur. (2008.), puno sličnije enzimatskim mehanizmima produkcije H<sub>2</sub>S, *in vivo*.



*Slika 4.* Strukturni prikaz molekule GYY4137, (CAS 106740-09-4)

#### 4.2.3. Analiza otvora puči

Priprema uzorka za analizu otvora puči, rađena je po Desikan i sur. (2002.). Cijeli listovi su bili inkubirani u MES-KCl puferu (10 mM 2-morpholino etan sulfonilna kiselina (MES), 5 mM KCl, 50  $\mu\text{M CaCl}_2$ , pH 6,15), 2,5 h pod direktnim osvjetljenjem ( $\sim 20 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), u plastičnim petrijevim posudicama, okrenuti naličjem prema dolje. Nakon toga je u inkubacijski pufer dodan GYY4137, NaHS, odnosno ABA te je poklopac petrijevke obmotan parafilmom. Uzorak je pod djelovanjem navedenih tretmana ostavljen u uvjetima dnevnog osvjetljenja 2,5 sata odnosno u tami na 2 odnosno 4 sata, gdje je cijela petrijevka s uzorcima lista bila obmotana alu-folijom. Nakon navedenog trajanja inkubacije, po 6 listova unutar svakog tretmana je prenešeno u 100 mL destilirane vode i usitnjeno laboratorijskom sjeckalicom Waring 7010G (Waring laboratory science) te je pripremljen prosječni uzorak. Suspenzija fragmenata lista u vodi je profiltrirana kroz plastičnu membranu Spectra Mesh, (BDH, Merck), s

veličinom pora od 100  $\mu\text{m}$  te su fragmenti prenešeni na predmetno stakalce i poklopljeni pokrovnicom, uz dodatak kapi destilirane vode kako se uzorak ne bi osušio. Promjer otvora puči je mjereno korištenjem Leica DMLS, svjetlosnog mikroskopa s kamerom, na povećanju od 40X, pomoću Leica Qwin programske analitičke podrške (Leica Microsystems and Imaging Solutions, Cambridge, UK). Mjerenje puči je obavljeno u triplikatu te su izmjereni promjeri 40 puči po svakom prosječnom uzorku.

### **4.3. Ispitivanje utjecaja solnog stresa i tretmana donorima $\text{H}_2\text{S}$ , na promjer puči kod uročnjaka**

#### **4.3.1. Uzgoj biljaka uročnjaka i priprema uzorka za analizu otvora puči**

Divlji tipovi uročnjaka, ekotipovi Landsberg erecta i Columbia te dva nitrat-reduktazna mutanta Nia1 i Nia2, zasijani su u supstrat Levington's F2 compost (Avoncrop, Bristol, UK) i uzgajani u potpuno kontroliranim uvjetima u klima komori Sanyo (Sanyo Gallenkamp, Loughborough, UK) u potpuno identičnim uvjetima kao što je opisano u poglavlju 4.2.1. Pokus je postavljen u 3 ponavljanja s 4 biljke u svakoj repeticiji. U petom tjednu starosti, svaka biljka je u 72 sata tretirana sa ukupno 90 mL 50 mM otopine NaCl, zalijevanjem supstrata s 30 mL otopine soli, u pravilnim vremenskim razmacima od 24 sata. Nakon toga, svježi, potpuno razvijeni listovi su korišteni za analize otvora puči.

Priprema uzorka za analizu otvora puči je obavljena po metodi opisanoj u poglavlju 4.2.3., s time da je za svaku repeticiju napravljen prosječni uzorak koji se sastojao od 8 listova skinutih sa 4 biljke (po 2 lista sa svake biljke) te je izmjeren promjer 40 puči po uzorku.

#### **4.3.2. Nitrat reduktazni (NR) mutanti Nia1 i Nia2**

U pokusima su uz divlje tipove korištena i dva NR mutanta: Nia1 i Nia2. Naime, uročnjak posjeduje 2 NR gena, Nia1 i Nia2. Nia2 je odgovoran za 90% ukupne aktivnosti enzima nitrat reduktaze kod klijanaca uročnjaka, dok se genu Nia1 pripisuje ostalih 10%. Mutacija na jednom ili oba navedena gena, ako se radi o dvostrukom mutantu, dovode do nepravilnosti i poremećaja u staničnom metabolizmu dušika.

#### **4.4. Ispitivanje utjecaja osvjetljenja i tretmana lista donorima NO i H<sub>2</sub>S na promjer puči kod paprike Century RZ (F1)**

##### **4.4.1. Uzgoj biljaka paprike**

Hibridno sjeme paprike Century RZ (F1), (Rijk Zwaan Distribution B. V., The Netherlands), je bilo zasijano u supstrat TypICAL, Typ 5 (Gebr. Brill substrate GmbH & Co., Germany), u perlitnim posudama za uzgoj presadnica. Biljke su bile uzgajane u potpuno kontroliranim uvjetima u klima komori Kambič, RK-900 CH (Kambič laboratorijska oprema d.o.o., Slovenija) do starosti od šest tjedana, odnosno faze od 6-8 listova. Svjetlosni režim je u početku bio podešen na 12-satno dnevno osvjetljenje, uz prosječan intenzitet svjetlosti 11950-12150 lux, na sve tri razine polica navedene klima komore, s konstatnom temperaturom od 27°C te vlagom od 80%, sve do faze nicanja. Nakon nicanja temperatura klima komore je spuštana na 25°C uz jednaki fotoperiod i vlažnost kao i prije, sve do faze potpunog formiranja prva 2 prava lista. Nakon toga svjetlosni režim je postavljen na 14 sati punog dnevnog osvjetljenja uz temperaturu od 22°C i 10 sati potpunog mraka uz temperaturu od 18°C. Do faze formiranja prva dva prava lista, zbog visoke temperature u klima komori, biljke su zalijevane do zasićenja supstrata vodom, a nakon toga s 20 mL vode po biljci dnevno. Pokus je postavljen u tri repeticije sa po četiri biljke za svaku repeticiju. U šestom tjednu starosti sakupljeni su svježi, potpuno razvijeni listovi i korišteni za analize otvora puči.

##### **4.4.2. Analiza otvora puči**

Priprema uzorka za analizu otvora puči je obavljena po Desikan i sur. (2002.). Cijeli listovi su bili inkubirani u MES-KCl puferu (10 mM 2-morpholino etan sulfonilna kiselina (MES), 5 mM KCl, 50 μM CaCl<sub>2</sub>, pH 6.15), 2,5 h pod direktnim osvjetljenjem (~4800 lux), u plastičnim petrijevim posudicama, okrenuti naličjem prema dolje. Nakon toga je u inkubacijski pufer dodan GYY4137, NaHS, odnosno SNP te je poklopac petrijevke obmotan parafilmom. Uzorak je, pod djelovanjem navedenih tretmana, ostavljen u uvjetima dnevnog osvjetljenja odnosno u tame (gdje je cijela petrijevka s uzorcima lista bila obmotana alu-folijom) tijekom 2,5 sata. Nakon navedenog trajanja inkubacije, po 4 lista (jedan list po biljci) za svaku repeticiju je prenešeno u 100 mL destilirane vode i izmacerirano laboratorijskom sjeckalicom te je pripremljen prosječni

uzorak. Suspenzija fragmenta lista u vodi je profiltrirana kroz plastičnu membranu Spectra Mesh, BDH, Merck, s veličinom pora od 100  $\mu\text{m}$  te su fragmenti prenešeni na predmetno stakalce i poklopljeni pokrovnicom, uz dodatak kapi destilirane vode kako se uzorak ne bi osušio. Uzorci su vizualizirani pomoću Olympus, svjetlosnog mikroskopa s kamerom DP-50, na povećanju od 40X, a promjer puči je mjeran koristeći analitičku programsku podršku, Olympus DP Soft (Olympus Optical Co. (Europa) GmbH, Germany). Izmjereni su promjeri 40 puči po svakom prosječnom uzorku.

#### **4.5. Ispitivanje utjecaja osvjetljenja i tretmana lista donorima H<sub>2</sub>S i NO, na promjer puči kod paprike Century RZ (F1) u uvjetima solnog stresa**

##### **4.5.1. Uzgoj biljaka paprike i priprema uzorka za analizu otvora puči**

Za analize utjecaja osvjetljenja i tretmana lista donorima NO i H<sub>2</sub>S na promjer puči paprike, u uvjetima solnog stresa, biljke paprike prethodno navedenog hibrida, bile su uzgajane pod jednakim uvjetima kao što je opisano i u poglavlju 4.4.1., do šestog tjedna starosti. Tijekom šestog tjedna, perlitna posuda sa po osam biljaka je bila postavljena u plastičnu kadu te je dodano 1000 mL, 150 mM otopine NaCl. Biljke su bez zalijevanja ostavljene tri dana pod djelovanjem ovog tretmana, kako bi supstrat kapilarno usvojio NaCl. Supstrat u koji su bile zasađene biljke paprike u varijanti tretmana NaCl oporavak, bio je naredna tri dana ispiran sa 100 mL destilirane vode po biljci. Kontrolnim biljkama bio je dodan jednak volumen destilirane vode. Pokus je bio postavljen u tri repeticije sa po četiri biljke u svakoj repeticiji. Biljke paprike zasijavane su u pravilnim vremenskim razmacima kako bi se, zbog obujma analiza, izbjegao vremenski odmak u starosnoj dobi biljaka.

Nakon primjenjenih tretmana sakupljani su svježi, potpuno razvijeni listovi i korišteni za analize otvora puči te analize antioksidativne aktivnosti u listu po metodama opisanim u poglavlju 4.6.2, ali je za spektrofotometrijske analize antioksidativne aktivnosti korišten aparat Varian Cary 50, UV-VIS spectrophotometer, uz programsku podršku, Cary WinUV software, (Varian Inc.).

Priprema uzorka za analizu otvora puči je rađena po Desikan i sur. (2002.), kao što je opisano u poglavlju 4.4.2.

#### **4.6. Ispitivanje utjecaja osvjetljenja i tretmana lista donorima H<sub>2</sub>S i NO, ABA, cPTIO, na reakciju puči kod paprike Quadrato d'Asti Rosso**

##### **4.6.1. Uzgoj biljaka paprike za analizu otvora puči i vizualizaciju akumuliranog NO**

Sortno sjeme crvene paprike Quadrato d'Asti Rosso (proizvođač FRANCHI SEMENTI S.P.A., Bergamo, Italija) je bilo potopljeno na 3 sata u 2%-tnu otopinu KNO<sub>3</sub> i zasijano u supstrat Levington's F2 compost (Avoncrop, Bristol, UK). Prva 2 dana supstrat je zalijevan 0,2%-tnom otopinom KNO<sub>3</sub>. Biljke su uzgajane u potpuno kontroliranim uvjetima u klima komori Sanyo (Sanyo Gallenkamp, Loughborough, UK) do šestog tjedna starosti, odnosno faze od 6-7 listova. Svjetlosni režim je bio podešen na 12-satno dnevno osvjetljenje uz prosječan intenzitet svjetlosti od 100-120  $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , na sve tri razine polica navedene klima komore, s konstatnom temperaturom od 27°C, sve do faze nicanja. Nakon toga temperatura je spuštena na 25°C, do potpunog formiranja prva 2 prava lista. Nakon toga svjetlosni režim je postavljen na 14 sati punog dnevnog osvjetljenja i 9 sati potpunog mraka uz 2 puta po 30 minuta postupnog pojačavanja, odnosno smanjivanja osvjetljenja. Temperaturni režim je bio postavljen na 22°C dnevne temperature i 18°C noćne temperature, s postupnim rastom, odnosno padom, prilikom prijelaza iz noćnog u dnevni režim i obrnuto. Pokus je postavljen u tri repeticije sa po 4 biljke paprike za svaku repeticiju. Tijekom petog tjedna obavljene su analize promjera otvora puči listova i intenziteta fluorescencije po metodama opisanim u 4.6.2. i 4.6.3. Promjer puči i intenzitet fluorescencije je analiziran na svježim i potpuno formiranim listovima.

##### **4.6.2. Analiza otvora puči**

Priprema uzorka za analizu otvora puči, obavljena je po Desikan i sur. (2002.), kao što je to opisano u poglavlju 4.4.2., uz male preinake. Naime, zbog velike površine listova i racionalnijeg korištenja kemikalija, tretirani su samo fragmenti epiderme, skinute s naličja lista, koja je odvojena korištenjem skalpela i pincete. Epidermalni fragmenti su bili inkubirani u MES-KCl puferu (10 mM 2-morpholino etan sulfonilna kiselina (MES), 5 mM KCl, 50  $\mu\text{M}$  CaCl<sub>2</sub>, pH 6.15), 2,5 h pod direktnim osvjetljenjem ( $\sim 20 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ), u plastičnim petrijevim posudicama. Nakon toga je u inkubacijski pufer dodan



GY4137, NaHS, ABA, SNP odnosno cPTIO (karboksi-PTIO (kalijeva sol)) te je poklopac petrijevke obmotan parafilmom. Takav uzorak, pod djelovanjem navedenih tretmana, ostavljen je u uvjetima dnevnog osvjetljenja odnosno tame sljedeća 2,5 sata. Epidermalni fragmenti su direktno, bez prethodnog usitnjavanja prenešeni na predmetno stakalce te uz dodatak kapi vode poklopljeni pokrovnicom i analizirani pomoću svjetlosnog mikroskopa, Leica DLMS. Prosječan uzorak za svaku repeticiju se sastojao od epidermalnih fragmenata lista, odvojenih sa 8 potpuno razvijenih listova (po 2 lista sa svake biljke) te je izmjerena površina 40 puči po svakom prosječnom uzorku.

#### **4.6.3. Priprema uzorka i mjerenje intenziteta fluorescencije pomoću CLMS**

Akumulacija NO je dokazana po metodi Desikan i sur. (2002.), korištenjem specifičnog NO senzitivnog spoja DAF-2 DA (4,5-diaminofluorescein diacetat, Calbiochem, Nottingham, UK), koji u reakciji s NO daje kompleks sa svojstvom fluorescencije te je za razliku od DAF-2 (4,5-diaminofluorescein), membranski permeabilan i time omogućava detekciju NO *in vivo*. U inkubacijski MES-KCl pufer (10 mM 2-morpholino etan sulfonilna kiselina (MES), 5 mM KCl, 50  $\mu$ M CaCl<sub>2</sub>, pH 6.15) u kojem su se nalazili epidermalni fragmenti lista, dodan je DAF-2 DA u konačnoj koncentraciji od 15  $\mu$ M. Nakon 15 minuta uzorci su tri puta zaredom isprani svježim MES-KCl puferom i prenešeni u petrijeve posudice te su u inkubacijski pufer dodani GY4137, NaHS, ABA kao i kombinacije navedenih kemikalija te je poklopac petrijevke obmotan parafilmom. Pod djelovanjem navedenih tretmana, uzorak je ostavljen u uvjetima dnevnog osvjetljenja sljedećih 30 minuta te su epidermalni fragmenti direktno prenešeni na predmetno stakalce, uz dodatak kapi MES-KCl pufera i poklopljeni pokrovnicom. NO je vizualiziran pomoću konfokalnog mikroskopa CLSM (ekscitacija 488 nm, emisija 515 nm; Nikon PCM2000, Kingston-upon-Thames, UK). Kako bi rezultati snimljenih slika bili statistički obradivi i komparabilni, za kvantifikaciju fluorescencije je korištena programska podrška ImageJ 1.45s (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA). Nakon što je svaka slika očišćena od pozadinske fluorescencije te su obrisane puči koje su se nalazile na rubovima slike, izvršeno je prebrojavanje puči. Nakon toga slika je konvertirana u binarni oblik te je programski proračunata ukupna fluorescencija, izražena kao ukupan broj pixela zelene boje po slici. Dobivena vrijednost je podijeljena s brojem puči, te je tako dobivena prosječna fluorescencija po

jednoj puči. Prosječan uzorak unutar jedne repeticije se sastojao od epidermalnih fragmenata skinutih s 8 potpuno razvijenih listova (po 2 od svake biljke) te dobiveni rezultati predstavljaju prosječnu fluorescenciju nakon obrade triju slika, po svakom prosječnom uzorku.

Na potpuno isti način je pripremljen i analiziran uzorak za detekciju akumuliranog NO u pučima uročnjaka.

#### **4.7. Antioksidativna aktivnost u listu paprike Quadrato d'Asti Rosso nakon tretmana s donorima H<sub>2</sub>S i NO te izlaganja solnom stresu**

##### **4.7.1 Uzgoj biljaka paprike za analize antioksidativne aktivnosti u tkivu lista**

Biljke paprike su uzgajane na isti način i u potpuno istim uvjetima kao što je to opisano u poglavlju 4.6.1., do šestog tjedna starosti. U šestom tjednu biljke paprike su bile tretirane sa sljedećim otopinama: 200 μM SNP, 200 μM NaHS, 200 μM GYY4137, 200 μM SNP + 200 μM NaHS, 200 μM SNP + 100 μM GYY4137, tako da je zalijevanjem supstrata dodano 20 mL otopine po biljci i po 10 mL otopine sprejanjem listova. Kontrolne biljke su bile zalijevane i prskane istim volumenom destilirane vode. Biljke su tretirane 3 dana u pravilnim razmacima od 24 sata. Nakon toga svaka navedena varijanta pokusa je tretirana s 3 različite koncentracije otopine NaCl: 50 mM, 100 mM i 200 mM zalijevanjem supstrata sa po 20 mL otopine NaCl po biljci, u 3 dana sa pravilnim razmacima od 24 sata. Kontrolne biljke su u također u jednakim vremenskim razmacima, primile jednak volumen destilirane vode. Pokus je postavljen u tri repeticije sa po 4 biljke paprike za svaku repeticiju. Nakon navedenih tretmana, u istom danu su sakupljeni svi uzorci lista paprike (skinuti su svi potpuno razvijeni i zdravi listovi sa sve 4 biljke unutar repeticije), izmacerirani u tekućem dušiku, uz dodatak PVP-a dijelu uzorka koji će se koristiti za enzimske analize te spremljeni na -80°C.

##### **4.7.2. Određivanje intenziteta lipidne peroksidacije**

Koncentracija produkata lipidne peroksidacije je određena kao količina supstanci koje reagiraju s tiobarbiturnom kiselinom (engl. *Thiobarbituric acid reactive substances* - TBARS) (Heath i Packer, 1968.) uz određene modifikacije. Određivanje je izvršeno spektrofotometrijski pomoću PerkinElmer, Lambda XLS, UV/VIS spectrophotometer,

(PerkinElmer Inc., USA), očitavanjem apsorbancije pri valnim duljinama od 532 i 600 nm, koristeći integriranu programsku podršku. Ovaj je spektrofotometar korišten u svim kasnije opisanim analizama antioksidativne aktivnosti. Listovi paprike su usitnjeni u porculanskom tarioniku u tekućem dušiku do finog praha. Oko 0,2 g usitnjenog biljnog tkiva ekstrahirano je s 1 mL 0,1% trikloroetene kiseline (TCA). Nakon centrifugiranja na 4°C pri 6000g tijekom 5 minuta, na 0,5 mL supernatanta dodano je 1 mL 0,5%-tne tiobarbiturne kiseline (TBA) u 20% trikloroetenoj kiselini (TCA). Tako dobivena smjesa je zagrijavana 30 minuta u vodenoj kupelji na 95°C, ohlađena na ledu te pri 18000g centrifugirana tijekom 15 minuta na 4°C. Dobiveni supernatant korišten je za spektrofotometrijsko mjerenje. Kao slijepa proba korištena je 0,5% tiobarbiturna kiselina u 20% trikloroetenoj kiselini. Koncentracija produkata lipidne peroksidacije (TBARS) izračunata je koristeći ekstinkcijski faktor  $155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  i izražena kao  $\text{nM g}^{-1} \text{ sv.t.}$

#### **4.7.3. Određivanje sadržaja vodikovog peroksida**

Koncentracija vodikovog peroksida (HP) određena je posredno, mjerenjem količine kompleksa titanovog peroksida koji se taloži kada se biljnom ekstraktu doda titanov oksisulfat u sulfatnoj kiselini i otopina amonijevog hidroksida (Mukherjee i Choudhouri, 1983.). 0,2 g macerata lista paprike, je ekstrahirano s 1 mL hladnog acetona i centrifugirano 5 minuta pri 6000g na 4°C. Supernatant je odvojen u mikroepruvete od 2 mL te je dodano 400  $\mu\text{L}$  titanovog reagensa i 500  $\mu\text{L}$   $\text{NH}_4\text{OH}$  (25%). Zbog ekstremno egzotermne reakcije, navedene se kemikalije dodaju uz prethodno stavljanje uzorka na led. Nakon centrifugiranja supernatant je bačen, a talog otopljen u 1 mL 2 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Nakon ponovljenog centrifugiranja, 10 minuta pri 15000g na 4°C, zbog površinskog taloga, dobiveni supernatant je vakuumski profiltriran kroz miliporator (Minisart, 0,20  $\mu\text{m}$ , Sartorius). Dobivena bistra otopina je korištena za mjerenje apsorbancije na 415 nm. Koncentracija HP je izračunata koristeći ekstinkcijski koeficijent  $1,878 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  te su konačni rezultati izraženi kao  $\text{nM HP g}^{-1} \text{ sv.t.}$

#### **4.7.4. Određivanje sadržaja slobodnog prolina**

Koncentracija prolina (PRO) u listovima paprike određena je prema Bates i sur. (1973.), uz određene prilagodbe. Naime, tkivo lista je prethodno izmacerirano u tekućem dušiku

i čuvano na  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  te je u plastične epruvete od 15 mL odvagano 0,5 g macerata na koji je dodana hladna 3%-tna otopina sulfosalicilne kiseline (10 mL). Uzorak je homogeniziran uz pomoć vrtložne tresilice, 3 puta po 10 sekundi, s razmakom od 1 minute između dva homogeniziranja i profiltriran kroz Whatman 2, filter papir koji spada u kategoriju srednje propusnosti. Dobiveni filtrat je centrifugiran u trajanju od 15 minuta pri  $3500g$  na  $4^{\circ}\text{C}$  te su u supernatant (2 mL) dodani ninhidrin reagens (2 mL po uzorku) i ledena octena kiselina (2 mL po uzorku). Kiseli ninhidrinski reagens je pripremljen otapanjem 1,25 g ninhidrina u 20 mL 6 M fosforne kiseline te je uz postepeno zagrijavanje uzorka dodano 30 mL ledene octene kiseline. Nakon dodavanja ledene octene kiseline, uzorci su promiješani 10 sekundi na vrtložnoj tresilici. Nakon zatvaranja epruveta poklopcima, pripremljeni uzorci su zagrijavani 1 h u vodenoj kupelji na  $95\text{-}98^{\circ}\text{C}$ . Nakon hlađenja na ledu, svakom uzorku dodano je 4 mL toluena. Uzorci su promiješani 15 sekundi i ostavljeni na sobnoj temperaturi dok se gornji toluenski sloj s prolinom nije odvojio od donjeg, vodenog sloja. Koncentracija prolina u toluenskoj frakciji je određena mjerenjem apsorbancije na 520 nm i izračunata iz standardne krivulje s poznatim koncentracijama prolina ( $0\text{-}5,0\text{ }\mu\text{g prolina mL}^{-1}$ ), koje su tretirane na isti način kao i uzorci. Konačni rezultati su izraženi kao  $\mu\text{M PRO g}^{-1}$  sv.t.

#### **4.7.5. Ekstrakcija topljivih proteina**

Listovi paprike su škarama narezani u porculanski tarionik, posipani polivinilpirolidonom i usitnjeni u tekućem dušiku u fini prah. Oko 0,5 g tako usitnjenog tkiva prebačeno je u prethodno izvaganu kivetu te zatim izvavano i ekstrahirano na ledu s 1 mL ekstrakcijskog pufera (0,1 M Tris/HCl, pH 8,0) u trajanju od 15 minuta. Homogenat je centrifugiran 15 minuta pri  $18000g$  na  $4^{\circ}\text{C}$ . Supernatant je zatim prebačen u čistu kivetu, a preostali talog je ponovo ekstrahiran s 1 mL istog pufera. Supernatanti obje ekstrakcije su spojeni i korišteni kao sirovi ekstrakt za spektrofotometrijsko određivanje ukupne aktivnosti enzima gvajakol-peroksidaze i koncentracije proteina.

Sirovi ekstrakt za određivanje aktivnosti ostalih enzima pripremljen je na isti način kao i za gvajakol-peroksidazu, ali je pufer za ekstrakciju proteina bio različit. Ekstrakcijski pufer za katalazu je sadržavao 0,1 M  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0,1 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  i 1 mM EDTA (pH 7,0). Ekstrakcijski pufer za glutation-reduktazu, sadržavao je 0,1 M  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0,1 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,

5 mM natrijev askorbat i 1 mM EDTA (pH 7,0). Za pripremu svih otopina je korištena autoklavirana, miliporirana voda.

#### **4.7.6. Određivanje koncentracije proteina**

Koncentracija proteina određena je prema Bradford (1976.). Ovaj postupak temelji se na brzom pomaku maksimuma apsorpcije, od 465 nm na 595 nm do kojeg dolazi zbog vezivanja boje Coomassie briljant plavo (engl. *Coomassie brilliant blue* - CBB) na proteine. Za vezanje CBB boje na proteine važne su elektrostatske sile između sulfatnih skupina same boje i bazičnih aminokiselinskih ostataka u proteinima te hidrofobne interakcije s ostacima aromatskih aminokiselina. Koncentracija proteina ekstrapolira se iz baždarne krivulje napravljene s poznatim koncentracijama albumina govedeg seruma (engl. *bovine serum albumine* - BSA). Koncentracija proteina je izražena u  $\text{mg g}^{-1}$  svježe tvari i korištena je za izračun specifičnih aktivnosti antioksidativnih enzima.

#### **4.7.7. Spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti katalaze**

Ukupna aktivnost enzima katalaze (CATu) određena je prema Aebi (1984.). Reakcijska smjesa (pH 7,0) sadržavala je 0,05 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,05 mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  te 0,01 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Za pripremu svih otopina je korištena autoklavirana, miliporirana voda. Na 1950  $\mu\text{L}$  reakcijske smjese dodano je 50  $\mu\text{L}$  sirovog ekstrakta proteina u kvarenu kivetu (Hellma 282, Hellma GmbH & Co. KG, Germany) te je pri valnoj duljini od 240 nm, mjereno smanjenje apsorpcije svakih deset sekundi tijekom dvije minute, uz termostatiranu reakciju na 25°C. Svaki uzorak je mjereno u triplicatu. CATu izražena je kao promjena apsorpcije po minuti po gramu svježeg tkiva. Specifična aktivnost katalaze (CATs) određena je kao kvocijent CATu i koncentracije proteina i izražena u  $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  proteina.

#### **4.7.8. Spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti gvajakol-peroksidaze**

Ukupna aktivnost enzima gvajakol-peroksidaze (GPODu) određena je prema Siegel i Galston (1967.). Reakcijska smjesa (pH 5,8) sadržavala je 5 mM gvajakola, 0,2 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,2 mM  $\text{Na}_2\text{PO}_4 \times 12 \text{H}_2\text{O}$  te 5 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  koji je dodan neposredno prije mjerenja. Na 800  $\mu\text{L}$  reakcijske smjese dodano je 200  $\mu\text{L}$  ekstrakta proteina lista te je

povećanje apsorbancije mjereno pri valnoj duljini od 470 nm svake sekunde tijekom dvije minute. Svaki uzorak mjereno je u u triplikatu.

Aktivnost GPOD izražena je kao ukupna aktivnost (GPODu):

$$\text{GPODu} = X \cdot Y \cdot V_u / m \cdot V_a [\Delta A_{470} \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ sv.t.}]$$

pri čemu je:

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

Y – faktor potreban za izražavanje promjene apsorbancije po minuti

V<sub>u</sub> – ukupni volumen proteinskog ekstrakta

m – masa svježe tvari (izražena u gramima)

V<sub>a</sub> – volumen mjerenog alikvota

Specifična aktivnost gvajakol-peroksidaze (GPODs) određena je kao kvocijent GPODu i koncentracije proteina i izražena u min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> prot.

#### 4.7.9. Spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti glutation-reduktaze

Ukupna aktivnost enzima glutation-reduktaze (GRu) određena je prema protokolu za GR assay kit (Sigma-Aldrich, Inc.). Reakcijska smjesa (pH 7,5) je sadržavala 0,1 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,1 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1 mM EDTA, 2 mM NADPH i 2 mM GSSG. U kivetu od kvarcnog stakla dodano je 500 μL 2 mM GSSG, 400 μL 100 mM kalij-fosfatnog pufera (pH 7,5) koji je sadržavao 1 mM EDTA te 50 μL sirovog ekstrakta proteina i 50 μL 2 mM NADPH. Smanjenje apsorbancije praćeno je pri valnoj duljini od 340 nm svake sekunde tijekom jedne minute. Za podešavanje nule korištena je destilirana voda, a slijepa proba je analizirana mjerenjem apsorbancije čistog reakcijskog pufera, bez dodatka proteinskog ekstrakta. Kao pozitivna kontrola korištena je glutation-reduktaza ekstrahirana iz kvasca, koja je također bila dio korištenog GR analitičkog seta. GRu izražena je kao promjena apsorbancije u minuti po gramu svježeg tkiva, preko molarnog ekstinkcijskog koeficijenta za NADPH, 6,22 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>. Specifična aktivnost glutation-reduktaze (GRs) određena je kao kvocijent GRu i koncentracije proteina i izražena u min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> prot.

#### **4.8. Statističke analize podataka**

Kod paprike je pokus postavljen u 3 ponavljanja s 4 biljke po repeticiji, uz solni stres kao glavni faktor i tretmane različitim kemijskim supstancama, kao podfaktor. Pokus s uročnjakom uključivao je 3 ponavljanja s 4 biljke po repeticiji uz genotip uročnjaka kao glavni faktor te solni stres i osvjetljenje uz tretmane donorima H<sub>2</sub>S, kao podfaktore. Prilikom uzgoja u klima komori, redovito je mijenjan položaj posuda s biljkama, kako bi se što više ujednačili uzgojni uvjeti: vlaga, osvjetljenje, cirkulacija zraka i temperatura.

Svi utvrđeni rezultati su analizirani uobičajenim metodama statističke obrade podataka pomoću SAS Software 9.1.3, programske podrške (2002.-2003., SAS Institute Inc., Cary, USA) i Microsoft Office Excell 2007. Korištene su sljedeće statističke metode: analiza varijance (eng. analysis of variance – ANOVA), statistički testovi značajnosti utjecaja primjenjenih tretmana – F test i Fisher's LSD test (eng. least significant difference – LSD) te pojedinačna i multipla linearna korelacijska analiza. Kod preliminarnih pokusa s uročnjakom, izračunata je aritmetička sredina i standardna pogreška za dobivene podatke promjera puči.

## 5. REZULTATI

### 5.1. Utjecaj solnog stresa, osvjetljenja i tretmana donorima H<sub>2</sub>S na promjer puči kod različitih genotipova uročnjaka

**Tablica 1.** Značajnost utjecaja solnog stresa (kontrola i 50 mM NaCl), tretmana lista donorima H<sub>2</sub>S (100 μM GYY4137, 100 μM NaHS), genotipa i njihovih interakcija na promjer puči (μm), kod uročnjaka.

FAKTOR	VARIJANTA	Promjer puči
Stres	Kontrola	2,618
	NaCl	2,610
	F test	0,03
	<i>P</i>	0,8563
Tretmani lista	Svjetlo	3,083 <sup>A</sup>
	Tama	2,148 <sup>C</sup>
	Tama + GYY4137	2,630 <sup>B</sup>
	Tama + NaHS	2,595 <sup>B</sup>
	F test	74,48
	<i>P</i>	≤0,0001
Genotip	Ler	3,105 <sup>A</sup>
	Nia1	2,722 <sup>B</sup>
	Col	2,466 <sup>C</sup>
	Nia2	2,163 <sup>D</sup>
	F test	81,39
	<i>P</i>	≤0,0001
Interakcije	<b>(Stres x Tretman lista) F test</b>	6,40
	<i>P</i>	0,0038
	<b>(Stres x Genotip) F test</b>	1,98
	<i>P</i>	0,1533
	<b>(Tretman lista x Genotip) F test</b>	2,68
	<i>P</i>	0,0356
	<b>(Stres x Tretman lista x Genotip) F test</b>	1,68
	<i>P</i>	0,1673

Podaci su prosjek tri ponavljanja; ANOVA, F test; prosjeci označeni različitim slovom se razlikuju prema LSD testu (<sup>a,b,c</sup> *P*=0,05; <sup>A,B,C</sup> *P*=0,01).

Prema vrijednostima F testa, stres, te interakcije stres x genotip i stres x tretman lista x genotip, nisu imali značajan utjecaj na promjer puči uročnjaka (*Tablica 1*).

Očekivano najveći promjer utvrđen je kod puči listova izloženih direktnom osvjetljenju (3,083 μm), dok je najmanji promjer izmjeren kod listova biljaka analiziranih nakon



držanja u mraku (2,148  $\mu\text{m}$ ). Nakon tretmana listova  $\text{H}_2\text{S}$ -om (GY4137 i NaHS) u uvjetima tame, nisu utvrđene značajne razlike u promjeru puči. Srednje vrijednosti promjera puči nakon ova dva tretmana značajno su se razlikovale od promjera puči kod listova koji nisu tretirani donorima  $\text{H}_2\text{S}$ , bez obzira da li su bili izloženi svjetlu, ili držani u tami. Genotip je vrlo značajno utjecao na promjer puči na svim tretmanima i na obje varijante stresa ( $P \leq 0,0001$ ). Utvrđene su statistički značajne razlike u promjeru puči ispitivanih genotipova te je najveći promjer izmjeren je kod listova genotipa Ler (3,105  $\mu\text{m}$ ), a najmanji kod mutanta Nia2 (2,163  $\mu\text{m}$ ). Značajan utjecaj na promjer puči pokazale su interakcije stres x tretman lista ( $P=0,0038$ ) kao i interakcija tretman lista x genotip ( $P=0,0356$ ).

**Tablica 2.** Značajnost utjecaja tretmana lista donorima  $\text{H}_2\text{S}$  (100  $\mu\text{M}$  GYY4137, 100  $\mu\text{M}$  NaHS), genotipa i njihove interakcije na promjer puči ( $\mu\text{m}$ ), kod uročnjaka, po varijantama solnog stresa (kontrola i 50 mM NaCl).

TRETMANI LISTA	STRES	
	Kontrola	NaCl
Svjetlo	2,953 <sup>a,A</sup>	3,214 <sup>A</sup>
Tama	2,105 <sup>c,B</sup>	2,192 <sup>C</sup>
Tama + GYY4137	2,743 <sup>b,A</sup>	2,518 <sup>B</sup>
Tama + NaHS	2,673 <sup>b,A</sup>	2,517 <sup>B</sup>
F test	22,02	42,46
P	$\leq 0,0001$	$\leq 0,0001$
<b>GENOTIP</b>		
Ler	3,101 <sup>A</sup>	3,110 <sup>A</sup>
Nia1	2,746 <sup>B</sup>	2,699 <sup>B</sup>
Col	2,390 <sup>C</sup>	2,542 <sup>B</sup>
Nia2	2,237 <sup>C</sup>	2,090 <sup>C</sup>
F test	24,75	40,63
P	$\leq 0,0001$	$\leq 0,0001$
<b>INTERAKCIJA</b>		
<b>(Genotip x Tretman lista) F test</b>	1,66	2,52
P	0,1732	0,0452

Podaci su prosjek tri ponavljanja; ANOVA, F test; prosjeci označeni različitim slovom se razlikuju prema LSD testu (<sup>a,b,c</sup>  $P=0,05$ ; <sup>A,B,C</sup>  $P=0,01$ ).

Tretman lista i genotip su vrlo značajno utjecali na promjer puči uročnjaka i kod kontrolnih biljaka i kod tretmana s NaCl ( $P \leq 0,0001$ ; Tablica 2).

Kod obje varijante pokusa (kontrola i solni stres), LSD testom su utvrđene značajne razlike u promjeru puči između pojedinih tretmana lista s donorima H<sub>2</sub>S, u prosjeku za sve genotipove. Očekivano, najveći promjer puči na obje varijante stresa (2,953 μm u kontroli i 3,214 μm pri tretmanu s NaCl), izmjerene su na svjetlu. Najmanji promjer je izmjeren kod listova držanih u mraku (2,105 μm kontrola i 2,192 μm NaCl). Između tretmana lista donorima H<sub>2</sub>S u tami, nisu utvrđene statistički značajne razlike u promjeru puči ni za jednu varijantu stresa, ali je evidentno smanjenje otvora puči tretiranih listova u odnosu na netretirane listove izložene svjetlu, odnosno, veći promjer puči u odnosu na netretirane listove izložene tami, kod obje varijante pokusa. U prosjeku za sve tretmane lista, kod kontrolnih biljaka i kod tretmana s NaCl, genotip Ler je imao najveći promjer (3,101 μm kontrola i 3,110 μm NaCl), a genotip Nia2 najmanji promjer puči (2,237 μm kontrola i 2,090 μm NaCl). Između genotipova Col i Nia2 na kontroli te genotipova Col i Nia1 na tretmanu NaCl-om, nisu utvrđene statistički značajne razlike. Interakcija genotip x tretman lista je značajno utjecala na promjer puči kod biljaka pod stresom ( $P=0,0452$ ), dok kod kontrole nije utvrđen statistički značajan utjecaj.

**Tablica 3.** Značajnost utjecaja solnog stresa (kontrola i 50 mM NaCl), tretmana lista donorima H<sub>2</sub>S (100 μM GYY4137, 100 μM NaHS) i njihove interakcije na promjer puči (μm), kod četiri genotipa uročnjaka.

STRES	GENOTIP			
	Ler	Nia1	Col	Nia2
Kontrola	3,101	2,746	2,390	2,237
NaCl	3,110	2,699	2,542	2,090
F test	0,01	0,23	3,27	2,85
<i>P</i>	0,9101	0,6469	0,1204	0,1426
<b>TRETMANI LISTA</b>				
Svjetlo	3,637 <sup>A</sup>	3,302 <sup>a</sup>	2,810 <sup>a,A</sup>	2,585 <sup>a,A</sup>
Tama	2,432 <sup>C</sup>	2,442 <sup>b</sup>	1,972 <sup>c,B</sup>	1,748 <sup>c,B</sup>
Tama + GYY4137	3,205 <sup>B</sup>	2,537 <sup>b</sup>	2,593 <sup>ab,A</sup>	2,187 <sup>b,AB</sup>
Tama + NaHS	3,148 <sup>B</sup>	2,610 <sup>b</sup>	2,488 <sup>b,A</sup>	2,133 <sup>b,AB</sup>
F test	41,12	16,40	17,99	15,50
<i>P</i>	0,0002	0,0027	0,0021	0,0031
<b>INTERAKCIJA</b>				
(Stres x Tretman lista) F test	5,55	2,36	1,20	3,36
<i>P</i>	0,0363	0,1711	0,3861	0,0964

Podaci su prosjek tri ponavljanja; ANOVA, F test; prosjeci označeni različitim slovom se razlikuju prema LSD testu (<sup>a,b,c</sup>  $P=0,05$ ; <sup>A,B,C</sup>  $P=0,01$ ).

Prema F testu, prosječno za sve varijante tretmana listova, stres nije značajno utjecao na promjer puči kod nijednog genotipa (*Tablica 3*). Tretman lista značajno je utjecao na promjer puči kod sva četiri analizirana genotipa (Ler  $P=0,0002$ , Nia1  $P=0,0027$ , Col  $P=0,0021$  i Nia2  $P=0,0031$ ), u prosjeku za obje varijante stresa.

Najveći promjer puči kod sva četiri genotipa, utvrđen je očekivano, na svjetlu (3,637  $\mu\text{m}$  Ler, 3,302  $\mu\text{m}$  Nia1, 2,810  $\mu\text{m}$  Col i 2,585  $\mu\text{m}$  Nia2). Kod svih genotipova, najmanji promjer puči izmjeren je kod listova držanih u tami (2,432  $\mu\text{m}$  Ler, 2,442  $\mu\text{m}$  Nia1, 1,972  $\mu\text{m}$  Col i 1,748  $\mu\text{m}$  Nia2). Nakon tretmana donorima  $\text{H}_2\text{S}$  u uvjetima tame, puči kod Ler i Nia2, imale su značajno veći promjer od netretiranih, dok između primjenjenih donora  $\text{H}_2\text{S}$  nisu utvrđene značajne razlike u promjeru. Kod genotipa Nia1 nakon tretmana donorima  $\text{H}_2\text{S}$  i izlaganja tami, nisu utvrđene značajne razlike u promjeru puči. Kod genotipa Col nije utvrđena statistički značajna razlika u promjeru puči nakon tretmana donorima  $\text{H}_2\text{S}$ , kao ni između tretmana sa GYY4137 i svjetla. Značajnost utjecaja interakcije stresa x tretman lista na promjer puči, utvrđena je samo kod genotipa Ler ( $P=0,0363$ ).

**Tablica 4.** Značajnost utjecaja solnog stresa (kontrola i 50 mM NaCl), genotipa i njihove interakcije na promjer puči ( $\mu\text{m}$ ), kod uročnjaka, po varijantama tretmana listova (100  $\mu\text{M}$  GYY4137, 100  $\mu\text{M}$  NaHS).

STRES	TRETMANI LISTA			
	Svjetlo	Tama	Tama + GYY4137	Tama + NaHS
Kontrola	2,953	2,105	2,743 <sup>a</sup>	2,673 <sup>a</sup>
NaCl	3,214	2,192	2,518 <sup>b</sup>	2,517 <sup>b</sup>
F test	3,77	1,19	12,51	7,33
<i>P</i>	0,1001	0,3169	0,0123	0,0352
GENOTIP				
Ler	3,637 <sup>a,A</sup>	2,432 <sup>A</sup>	3,205 <sup>A</sup>	3,148 <sup>A</sup>
Nia1	3,302 <sup>a,AB</sup>	2,442 <sup>A</sup>	2,537 <sup>B</sup>	2,610 <sup>B</sup>
Col	2,810 <sup>b,BC</sup>	1,972 <sup>B</sup>	2,593 <sup>B</sup>	2,488 <sup>B</sup>
Nia2	2,585 <sup>b,C</sup>	1,748 <sup>B</sup>	2,187 <sup>C</sup>	2,133 <sup>C</sup>
F test	12,43	18,91	44,58	52,87
<i>P</i>	0,0055	0,0018	0,0002	$\leq 0,0001$
INTERAKCIJA				
(Stres x Genotip) F test	0,28	0,85	5,32	6,94
<i>P</i>	0,8413	0,5162	0,0398	0,0223

Podaci su prosjek tri ponavljanja; ANOVA, F test; prosjeci označeni različitim slovom se razlikuju prema LSD testu (<sup>a,b,c</sup>  $P=0,05$ ; <sup>A,B,C</sup>  $P=0,01$ ).

Prema F testu, solni stres je značajno smanjio promjer puči nakon tretmana listova donorima H<sub>2</sub>S u uvjetima tame, u prosjeku za sve genotipove (GY4137  $P=0,0123$  i NaHS  $P=0,0352$ ; *Tablica 4*), dok u listovima koji nisu tretirani s H<sub>2</sub>S donorima solni stres nije značajno utjecao na promjer puči niti na svjetlu niti u tami.

U oba primjenjena tretmana H<sub>2</sub>S donorima utvrđen je značajno veći promjer puči kod kontrolnih biljaka (2,743  $\mu\text{m}$  GY4137 i 2,673  $\mu\text{m}$  NaHS). Utvrđen je značajan utjecaj genotipa na promjer puči kod sve četiri varijante tretmana listova, u prosjeku za obje varijante stresa (svjetlo  $P=0,0055$ , tama  $P=0,0018$ , GY4137  $P=0,0002$  i NaHS  $P=0,0223$ ). Genotip Ler je imao najveći promjer puči u svim varijantama tretmana listova (svjetlo: 3,637  $\mu\text{m}$ , tama: 2,432  $\mu\text{m}$ , tama + GY4137: 3,205  $\mu\text{m}$  i tama + NaHS: 3,148  $\mu\text{m}$ ). Između Ler i Nia1, te između Col i Nia2 nije bilo statistički značajne razlike u promjeru puči na svjetlu odnosno tami. Promjer puči kod genotipova Col i Nia1 nakon tretmana H<sub>2</sub>S donorima u uvjetima tame, nije se značajno razlikovao. Genotip Nia2 je imao najmanji promjer puči u sve četiri varijante tretmana listova, s time da je kod primjene donora H<sub>2</sub>S izmjereni promjer bio statistički značajno manji nego kod ostala tri genotipa. Interakcija stres x genotip, značajno je utjecala na tretmane donorima H<sub>2</sub>S u uvjetima tame (GY4137  $P=0,0398$  i NaHS  $P=0,0223$ ).

**Tablica 5.** Značajnost utjecaja genotipa i tretmana listova donorima H<sub>2</sub>S (100  $\mu\text{M}$  GY4137, 100  $\mu\text{M}$  NaHS), na promjer puči ( $\mu\text{m}$ ), kontrolnih biljaka uročnjaka.

GENOTIP	TRETMANI LISTA				F test <i>P</i>
	Svjetlo	Tama	Tama + GY4137	Tama + NaHS	
Ler	3,428 <sup>a,A(X)</sup>	2,323 <sup>ab,A(Y)</sup>	3,343 <sup>a,A(X)</sup>	3,310 <sup>a,A(X)</sup>	16,92 0,0008
Nia1	3,147 <sup>ab,AB(x,X)</sup>	2,402 <sup>a,A(z,Y)</sup>	2,700 <sup>b,AB(yz,XY)</sup>	2,739 <sup>b,B(y,XY)</sup>	9,49 0,0052
Col	2,693 <sup>bc,AB(x,X)</sup>	2,032 <sup>b,AB(y,Y)</sup>	2,496 <sup>b,B(x,XY)</sup>	2,341 <sup>c,B(xy,XY)</sup>	4,31 0,0438
Nia2	2,544 <sup>c,B(x,X)</sup>	1,667 <sup>c,B(y,Y)</sup>	2,430 <sup>b,B(x,XY)</sup>	2,307 <sup>c,B(x,XY)</sup>	5,89 0,0201
F test <i>P</i>	5,78 0,0211	10,32 0,0040	9,06 0,0059	18,64 0,0006	

Podaci su prosjek tri ponavljanja; ANOVA, F test; razlike između genotipova u istom tretmanu lista označene različitim slovom su značajne prema LSD testu (<sup>a,b,c</sup>  $P=0,05$ ; <sup>A,B,C</sup>  $P=0,01$ ); razlike između tretmana lista kod istog genotipa označene različitim slovom su značajne prema LSD testu (<sup>x,y,z</sup>  $P=0,05$ ; <sup>X,Y,Z</sup>  $P=0,01$ ).

Prema F testu, genotip je značajno utjecao na promjer puči na svim varijantama tretmana lista (svjetlo  $P=0,0211$ , tama  $P=0,0040$ , tama + GYY4137  $P=0,0059$  i tama + NaHS  $P=0,0006$ ; *Tablica 5*).

LSD testom su utvrđene značajne razlike u promjeru puči između genotipova nakon izlaganja direktnom osvjetljenju. Tako je genotip Ler na navedenom tretmanu imao značajno veći promjer puči (3,428  $\mu\text{m}$ ) od divljeg tipa Col (2,693  $\mu\text{m}$ ) i mutanta Nia2 (2,544  $\mu\text{m}$ ). Između mutanta Nia1 (3,147  $\mu\text{m}$ ) te divljih tipova Ler i Col, te mutanta Nia2 i divljeg tipa Col, nisu utvrđene statistički značajne razlike.

Najmanji promjer puči kod listova kontrolnih biljaka držanih u mraku, izmjeren je kod mutanta Nia2 (1,667  $\mu\text{m}$ ). Između genotipova Ler (2,323  $\mu\text{m}$ ) i Nia1 (2,402  $\mu\text{m}$ ), kao ni između Ler (2,323  $\mu\text{m}$ ) i Col (2,032  $\mu\text{m}$ ), nije utvrđena statistički značajna razlika na spomenutom tretmanu lista kontrolnih biljaka.

Promjer puči kod Ler (3,343  $\mu\text{m}$ ) nakon tretmana s GYY4137 u uvjetima tame, bio je značajno veći u odnosu na genotipove Nia1 (2,700  $\mu\text{m}$ ), Col (2,496  $\mu\text{m}$ ) i Nia2 (2,430  $\mu\text{m}$ ), koji se međusobno nisu značajno razlikovali.

Najveći promjer puči (3,310  $\mu\text{m}$ ) nakon tretmana NaHS-om u uvjetima tame, imao je genotip Ler te se značajno razlikovao od ostala tri genotipa. Između divljeg tipa Col i mutanta Nia2 nije utvrđena značajna razlika u promjeru puči. Izmjereni promjer puči kod mutanta Nia1 (2,739  $\mu\text{m}$ ), u spomenutom tretmanu, značajno se razlikovao od divljih tipova Ler (3,310  $\mu\text{m}$ ) i Col (2,341  $\mu\text{m}$ ) te mutanta Nia2 (2,307  $\mu\text{m}$ ).

F testom je utvrđen značajan utjecaj primjenjenih tretmana lista na promjer puči kod sva četiri genotipa uročnjaka (Ler  $P=0,0008$ , Nia1  $P=0,0052$ , Col  $P=0,0438$  i Nia2  $P=0,0201$ ).

Izlaganje listova uvjetima tame rezultiralo je značajno manjim promjerom puči kod Ler (2,323  $\mu\text{m}$ ) i Nia2 (1,667  $\mu\text{m}$ ), dok se izmjereni promjer na svjetlu te u uvjetima tame uz dodatak donora  $\text{H}_2\text{S}$ , nije značajno razlikovao kod navedena dva genotipa.

Najveći promjer puči kod mutanta Nia1 (3,147  $\mu\text{m}$ ) je utvrđen očekivano na svjetlu te je bio statistički značajno veći od promjera utvrđenih u ostale tri varijante tretmana lista. Izmjereni promjer kod Nia1 (2,739  $\mu\text{m}$ ), nakon tretmana NaHS-om u uvjetima tame, bio je statistički značajno veći od promjera puči nakon izlaganja lista tami bez tretmana s

NaHS (2,402  $\mu\text{m}$ ). Između tretmana donorima H<sub>2</sub>S te između tretmana s GYY4137 i tame bez aplikacije H<sub>2</sub>S donora, nisu utvrđene značajne razlike u promjeru puči.

Promjer puči kod genotipa Col nakon tretmana s donorima H<sub>2</sub>S u tami (2,496  $\mu\text{m}$  GYY4137 i 2,341  $\mu\text{m}$  NaHS), nije se značajno razlikovao od promjera utvrđenog na svjetlu bez donora H<sub>2</sub>S (2,693  $\mu\text{m}$ ). Izlaganje listova Col tami, očekivano je rezultiralo najmanjim promjerom puči (2,032  $\mu\text{m}$ ), koji se nije statistički značajno razlikovao od promjera puči nakon tretmana s NaHS u uvjetima tame.

**Tablica 6.** Značajnost utjecaja genotipa i tretmana listova donorima H<sub>2</sub>S, (100  $\mu\text{M}$  GYY4137, 100  $\mu\text{M}$  NaHS), na promjer puči ( $\mu\text{m}$ ), kod uročnjaka, izloženih solnom stresu (50 mM NaCl).

GENOTIP	TRETMANI LISTA				F test <i>P</i>
	Svjetlo	Tama	Tama + GYY4137	Tama + NaHS	
Ler	3,846 <sup>a,A(x,X)</sup>	2,540 <sup>A(y,Y)</sup>	3,067 <sup>a,A(y,XY)</sup>	2,989 <sup>a,A(y,Y)</sup>	9,51 0,0051
Nia1	3,457 <sup>ab,AB(x)</sup>	2,482 <sup>A(y)</sup>	2,374 <sup>b,BC(y)</sup>	2,483 <sup>b,AB(y)</sup>	10,84 0,0034
Col	2,926 <sup>bc,B(x)</sup>	1,913 <sup>B(y)</sup>	2,691 <sup>ab,AB(x)</sup>	2,637 <sup>ab,A(x)</sup>	14,82 0,0012
Nia2	2,628 <sup>c,B(x)</sup>	1,830 <sup>B(y)</sup>	1,943 <sup>c,C(y)</sup>	1,961 <sup>c,B(y)</sup>	15,67 0,0010
F test	8,27	18,50	13,82	11,08	
<i>P</i>	0,0078	0,0006	0,0016	0,0032	

Podaci su prosjek tri ponavljanja; ANOVA, F test; razlike između genotipova u istom tretmanu lista označene različitim slovom su značajne prema LSD testu (<sup>a,b,c</sup>  $P=0,05$ ; <sup>A,B,C</sup>  $P=0,01$ ); razlike između tretmana lista kod istog genotipa, označene različitim slovom su značajne prema LSD testu (<sup>x,y,z</sup>  $P=0,05$ ; <sup>X,Y,Z</sup>  $P=0,01$ ).

F testom je utvrđen značajan utjecaj genotipa uročnjaka na promjer puči, kod biljaka izloženih solnom stresu, na svim varijantama tretmana lista (svjetlo  $P=0,0078$ , tama  $P=0,0006$ , tama + GYY4137  $P=0,0016$  i tama + NaHS  $P=0,0032$ ), (Tablica 6).

Prema LSD testu, kod listova izloženih direktnom osvjetljenju, nisu utvrđene značajne razlike između genotipova Ler (3,846  $\mu\text{m}$ ) i Nia1 (3,457  $\mu\text{m}$ ), kao ni između genotipova Nia1 i Col (2,926  $\mu\text{m}$ ). Kod genotipa Nia2 u navedenom tretmanu je izmjerena najmanji otvor puči (2,628  $\mu\text{m}$ ), koji se nije značajno razlikovao od promjera puči utvrđenog kod Col.

Nakon držanja listova u mraku, divlji tip Ler imao je najveći promjer puči (2,540  $\mu\text{m}$ ) te se kao i mutant Nia1 (2,482  $\mu\text{m}$ ), značajno razlikovao od promjera utvrđenih kod Col (1,913  $\mu\text{m}$ ) i Nia2 (1,830  $\mu\text{m}$ ). Utvrđeni promjeri puči kod genotipova Ler i Nia1 te kod Col i Nia2, nisu se značajno razlikovali.

Puči kod sva četiri genotipa uročnjaka, izloženih prethodnom djelovanju solnog stresa, su isto reagirale na tretmane listova donorima H<sub>2</sub>S u uvjetima tame. Izmjereni promjeri puči kod Ler i Col nakon navedenih tretmana, nisu se značajno razlikovali. Kod genotipova Col i Nia1, također nije utvrđena statistički značajna razlika u promjeru puči. Najmanji promjer puči nakon tretmana donorima H<sub>2</sub>S, koji se statistički značajno razlikovao od promjera puči utvrđenih kod ostala 3 genotipa, je utvrđen kod mutanta Nia2 (1,943  $\mu\text{m}$  GYY4137 i 1,961  $\mu\text{m}$  NaHS).

Primjenjeni tretmani lista značajno su utjecali na promjer puči kod sva četiri ispitivana genotipa uročnjaka u uvjetima solnog stresa (Ler  $P=0,0051$ , Nia1  $P=0,0034$ , Col  $P=0,0012$  i Nia2  $P=0,0010$ ). Nakon izlaganja direktnom osvjetljenju, genotipovi Ler (3,846  $\mu\text{m}$ ), Nia1 (3,457  $\mu\text{m}$ ) i Nia2 (2,628  $\mu\text{m}$ ) su imali značajno veći promjer puči nego u preostale tri varijante tretmana lista. Utvrđene vrijednosti promjera puči kod navedena tri genotipa, nakon izlaganja tami te uz dodatak H<sub>2</sub>S donora, nisu se značajno razlikovale.

Značajno manji promjer puči kod Col je utvrđen, očekivano, nakon držanja listova u mraku, u odnosu na listove držane na svjetlu. Između tretmana H<sub>2</sub>S donorima u uvjetima bez svjetla, te na svjetlu, nije bilo značajnih razlika u promjeru puči kod spomenutog genotipa.

F testom je utvrđen značajan utjecaj stresa na promjer puči kod mutanta Nia2 nakon tretmana H<sub>2</sub>S donorima u uvjetima tame (GYY4137  $P=0,0184$  i NaHS  $P=0,0112$ ; *Tablica 7*). Kod ostalih genotipova, stres nije značajno utjecao na promjer puči ni u jednoj varijanti tretmana listova.

Nakon tretmana H<sub>2</sub>S donorima u uvjetima tame, samo kod mutanta Nia2 je utvrđen značajno veći promjer puči u kontroli (2,430  $\mu\text{m}$  GYY4137 i 2,307  $\mu\text{m}$  NaHS) nego pri solnom stresu (1,943  $\mu\text{m}$  GYY4137 i 1,961  $\mu\text{m}$  NaHS).

**Tablica 7.** Značajnost utjecaja solnog stresa (kontrola i 50 mM NaCl) na promjer puči ( $\mu\text{m}$ ), kod uročnjaka, po varijantama tretmana lista i ispitivanim genotipovima (100  $\mu\text{M}$  GYY4137, 100  $\mu\text{M}$  NaHS).

GENOTIP	STRES	TRETMANI LISTA			
		Svjetlo	Tama	Tama + GYY4137	Tama + NaHS
Ler	Kontrola	3,428	2,323	3,343	3,310
	NaCl	3,846	2,540	3,067	2,989
	F test	1,86	2,07	5,91	1,81
	P	0,2443	0,2239	0,0719	0,2493
Nia1	Kontrola	3,147	2,402	2,700	2,739
	NaCl	3,457	2,482	2,374	2,483
	F test	2,07	0,29	2,59	2,77
	P	0,2239	0,6190	0,1827	0,1713
Col	Kontrola	2,693	2,032	2,496	2,341
	NaCl	2,926	1,913	2,691	2,637
	F test	3,53	1,22	0,52	3,41
	P	0,1335	0,3305	0,5117	0,1383
Nia2	Kontrola	2,544	1,667	2,430 <sup>a</sup>	2,307 <sup>a</sup>
	NaCl	2,628	1,830	1,943 <sup>b</sup>	1,961 <sup>b</sup>
	F test	0,07	1,77	14,76	19,88
	P	0,8059	0,2538	0,0184	0,0112

Podaci su prosjek tri ponavljanja; ANOVA, F test; prosjeci označeni različitim slovom se razlikuju prema LSD testu (<sup>a,b,c</sup>  $P=0,05$ ).

### 5.1.1. Detekcija i kvantifikacija NO u pučima uročnjaka pomoću CLMS

Prema F testu, primjenjeni tretmani epidermalnih fragmenata lista značajno su utjecali na intenzitet fluorescencije kod uročnjaka ( $P \leq 0,0001$ ; *Tablica 8*; *Slika 5*).

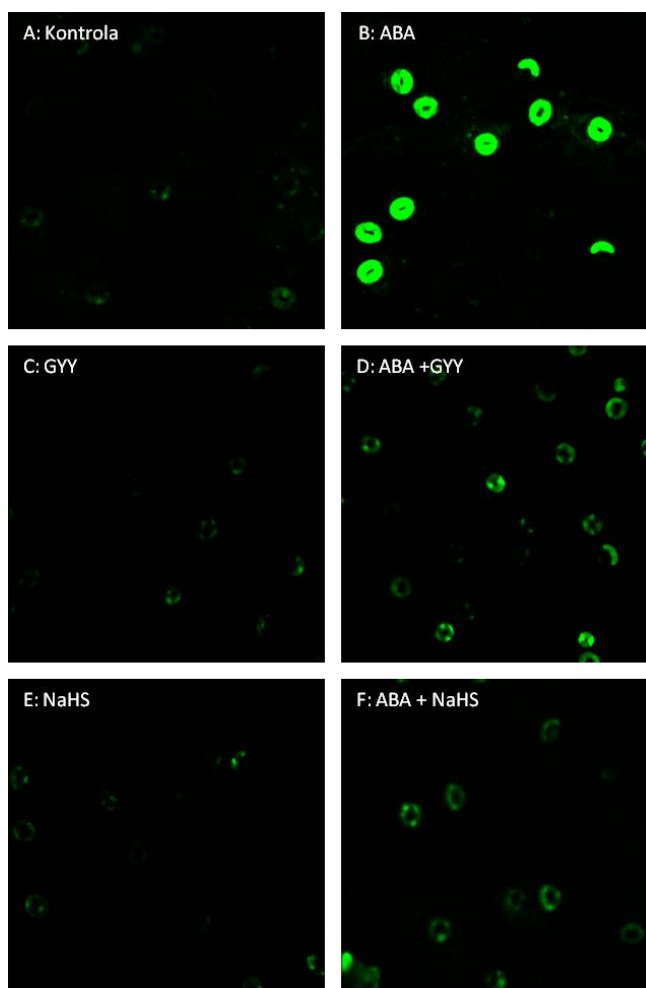
Tako je prema LSD testu, statistički značajno najjači intenzitet fluorescencije utvrđen nakon tretmana s ABA (1462,26), dok je najmanji intenzitet fluorescencije utvrđen nakon tretmana s NaHS (294,37) te se nije značajno razlikovao od kontrole (248,75) i tretmana s GYY4137 (306,89). Između kombinacije oba donora s ABA-om, nisu utvrđene značajne razlike u fluorescenciji puči (NaHS + ABA: 558,12 i GYY4137 + ABA: 664,28).



**Tablica 8.** Značajnost utjecaja tretmana lista donorima H<sub>2</sub>S i ABA-om (μM), na fluorescenciju puči (prosječan broj zelenih piksela po puči), kod uročnjaka.

TRETMANI EPIDERMALNIH FRAGMENTATA	Prosječna fluorescencija
Kontrola	248,75 <sup>C</sup>
100 NaHS	294,37 <sup>C</sup>
100 GYY4137	306,89 <sup>C</sup>
50 ABA	1462,26 <sup>A</sup>
100 NaHS + 50 ABA	558,12 <sup>B</sup>
100 GYY4137 + 50 ABA	664,28 <sup>B</sup>
F test	153,26
P	≤0,0001

Podaci su prosjek tri ponavljanja; ANOVA, F test; prosjeci označeni različitim slovom se razlikuju prema LSD testu (<sup>A,B,C</sup> P=0,01).



**Slika 5.** Detekcija NO uz pomoć CLMS, korištenjem specifičnog, NO senzitivnog spoja DAF-2 DA. Učinak tretmana s donorima H<sub>2</sub>S (100 μM NaHS i 100 μM GYY4137) i ABA (50 μM), na produkciju NO, u stanicama puči kod uročnjaka, ekotip Columbia.

## 5.2. Utjecaj osvjetljenja i tretmana lista donorima NO i H<sub>2</sub>S na promjer puči kod paprike Century RZ (F1)

**Tablica 9.** Značajnost utjecaja osvjetljenja i tretmana lista donorima H<sub>2</sub>S i NO (50 μM SNP, 100 μM GYY4137, 100 μM NaHS) te njihove interakcije na promjer puči (μm), kod paprike.

VARIJANTE OSVJETLJENJA	Promjer puči
Svjetlo	4,000 <sup>A</sup>
Tama	3,398 <sup>B</sup>
F test	46,43
<i>P</i>	≤0,0001
<b>TRETMANI LISTA</b>	
Kontrola	3,379 <sup>c,CD</sup>
SNP	2,968 <sup>d,D</sup>
GYY4137	3,737 <sup>b,BC</sup>
NaHS	4,293 <sup>a,A</sup>
SNP + GYY4137	3,902 <sup>b,AB</sup>
SNP + NaHS	3,917 <sup>b,AB</sup>
F test	18,56
<i>P</i>	≤0,0001
<b>INTERAKCIJA</b>	
<b>(Uvjet x Tretman lista) F test</b>	10,81
<i>P</i>	0,0009

Podaci su prosjek tri ponavljanja; ANOVA, F test; prosjeci označeni različitim slovom se razlikuju prema LSD testu (<sup>a,b,c</sup> *P*=0,05; <sup>A,B,C</sup> *P*=0,01).

Prema F testu, osvjetljenje, tretman lista i njihova međusobna interakcija su značajno utjecali na promjer puči paprike (uvjet *P*≤0,0001, tretman lista *P*≤0,0001, interakcija *P*=0,0009; *Tablica 9*).

LSD testom je utvrđeno da su listovi držani u uvjetima tame, očekivano, imali značajno manji promjer puči (3,398 μm) od listova koji su bili izloženi direktnom osvjetljenju (4,000 μm), u prosjeku za sve varijante tretmana listova.

Utvrđene vrijednosti promjera puči kod kontrole te nakon tretmana sa SNP i NaHS, međusobno su se značajno razlikovale. Nakon tretmana NaHS-om utvrđen je najveći promjer puči (4,293 μm), dok je nakon tretmana SNP-om utvrđen najmanji promjer puči (2,968 μm). Vrijednosti promjera puči u tretmanima s GYY4137 te u kombinacijama NO donora s oba donora H<sub>2</sub>S, nisu se međusobno statistički značajno razlikovale.

**Tablica 10.** Značajnost utjecaja tretmana lista donorima H<sub>2</sub>S i NO (50 μM SNP, 100 μM GYY4137, 100 μM NaHS) te osvjetljenja na promjer puči (μm), kod paprike.

TRETMANI LISTA	VARIJANTE OSVJETLJENJA		F test <i>P</i>
	Svjetlo	Tama	
Kontrola	3,721 <sup>b,B(X)</sup>	3,036 <sup>b,C(Y)</sup>	37,21 0,0037
SNP	3,706 <sup>b,B(X)</sup>	2,229 <sup>c,D(Y)</sup>	22,65 0,0089
GYY4137	4,140 <sup>b,AB</sup>	3,333 <sup>b,BC</sup>	5,27 0,0834
NaHS	4,854 <sup>a,A(X)</sup>	3,732 <sup>a,AB(Y)</sup>	44,76 0,0026
SNP + GYY4137	3,795 <sup>b,B</sup>	4,009 <sup>a,A</sup>	0,74 0,4394
SNP + NaHS	3,780 <sup>b,B</sup>	4,054 <sup>a,A</sup>	2,31 0,2034
F test	4,70	29,26	
<i>P</i>	0,0131	≤0,0001	

Podaci su prosjek tri ponavljanja; ANOVA, F test; razlike između tretmana lista u istoj varijanti osvjetljenja, označene različitim slovom, značajne su prema LSD testu (<sup>a,b,c</sup>*P*=0,05; <sup>A,B,C</sup>*P*=0,01); razlike između varijanti osvjetljenja u istom tretmanu lista označene različitim slovom su značajne prema LSD testu (<sup>x,y,z</sup>*P*=0,05; <sup>X,Y,Z</sup>*P*=0,01).

F testom je utvrđen značajan utjecaj tretmana lista na promjer puči kod paprike, za obje varijante osvjetljenja (svjetlo *P*=0,0131, tama *P*≤0,0001) na promjer puči kod paprike, nakon tretmana sa donorima H<sub>2</sub>S i NO (Tablica 10).

Kod listova izloženih direktnom osvjetljenju, najveći promjer puči utvrđen je nakon tretmana NaHS-om (4,854 μm) te se prema LSD testu, statistički značajno razlikovao od promjera utvrđenih nakon ostalih tretmana lista.

Listovi tretirani sa NaHS te donorima H<sub>2</sub>S u kombinaciji sa SNP u uvjetima tame, su imali značajno veći promjer puči u odnosu na kontrolu te nakon tretmana sa SNP i GYY4137. Najmanji promjer puči (2,229 μm) je utvrđen nakon tretmana sa SNP-om u uvjetima tame te se statistički značajno razlikovao od vrijednosti utvrđenih kod ostalih tretmana lista. Između kontrole (3,036 μm) i nakon tretmana sa GYY4137 (3,333 μm) u uvjetima tame, nije utvrđena statistički značajna razlika u promjeru puči.

Prema F testu, varijante osvjetljenja su imale značajan utjecaj na promjer puči kod kontrole (*P*=0,0037) te nakon tretmana sa NaHS (*P*=0,0026) i SNP (*P*=0,0089).

U sva tri navedena tretmana, promjer puči je bio značajno manji u uvjetima tame te se prema LSD testu značajno razlikovao od vrijednosti izmjerenih nakon izlaganja listova direktnom osvjetljenju.

**Tablica 11.** Značajnost utjecaja solnog stresa (150 mM NaCl), tretmana lista donorima H<sub>2</sub>S i NO (50 μM SNP, 100 μM GYY4137, 100 μM NaHS) i njihove interakcije na promjer puči (μm), kod paprike.

VARIJANTA STRESA	Promjer puči
Kontrola	4,127 <sup>B</sup>
NaCl	5,064 <sup>A</sup>
NaCl oporavak	5,477 <sup>A</sup>
F test	14,16
P	≤0,0001
TRETMANI LISTA	
Kontrola	4,822 <sup>bc,BC</sup>
SNP	4,135 <sup>c,C</sup>
GYY4137	5,307 <sup>ab,AB</sup>
NaHS	5,879 <sup>a,A</sup>
SNP + GYY4137	4,703 <sup>bc,BC</sup>
SNP + NaHS	4,491 <sup>c,BC</sup>
F test	5,68
P	0,0020
INTERAKCIJA	
(Stres x Tretman lista) F test	0,64
P	0,7595

Podaci su prosjek tri ponavljanja; ANOVA, F test; prosjeci označeni različitim slovom se razlikuju prema LSD testu (<sup>a,b,c</sup>  $P=0,05$ ; <sup>A,B,C</sup>  $P=0,01$ ).

Solni stres i tretman lista s donorima NO i H<sub>2</sub>S su značajno utjecali na promjer puči listova paprike (stres  $P\leq 0,0001$ , tretman lista  $P=0,0020$ ), dok prema F testu, njihova interakcija nije imala značajan utjecaj na ispitivani pokazatelj (Tablica 11).

LSD testom je utvrđeno da su listovi kontrolnih biljaka imali značajno manji prosječni promjer puči (4,127 μm) nego na tretmanima NaCl (5,064 μm) i NaCl oporavak (5,477 μm), koji se međusobno nisu statistički značajno razlikovali.

Tretman H<sub>2</sub>S donorima povećao je prosječni promjer puči listova. Promjer puči utvrđen nakon tretmana s NaHS (5,879 μm), bio je značajno veći od promjera kod ostalih tretmana, dok se nije značajno razlikovao od promjera utvrđenog nakon tretmana sa GYY4137. Promjeri puči kod kontrole (4,822 μm) te nakon tretmana sa GYY4137

(5,307  $\mu\text{m}$ ) i u kombinaciji navedenog donora  $\text{H}_2\text{S}$  sa SNP-om (4,703  $\mu\text{m}$ ), nisu se statistički značajno razlikovali.

Prosječni promjer puči nakon tretmana donorima  $\text{H}_2\text{S}$  je bio značajno veći od promjera utvrđenih nakon tretmana SNP-om (4,135  $\mu\text{m}$ ) te kombinacijom SNP i NaHS (4,491  $\mu\text{m}$ ).

**Tablica 12.** Značajnost utjecaja tretmana lista donorima  $\text{H}_2\text{S}$  i NO (50  $\mu\text{M}$  SNP, 100  $\mu\text{M}$  GYY4137, 100  $\mu\text{M}$  NaHS) i solnog stresa (kontrola, 150 mM NaCl), na promjer puči ( $\mu\text{m}$ ), kod paprike.

TRETMANI LISTA	VARIJANTA STRESA			F test <i>P</i>
	Kontrola	NaCl	NaCl oporavak	
Kontrola	3,834 <sup>B</sup>	4,698 <sup>bc,B</sup>	5,936	1,52 0,2917
SNP	3,736 <sup>B</sup>	4,078 <sup>c,B</sup>	4,591	0,86 0,4696
GY4137	4,347 <sup>AB(y)</sup>	5,351 <sup>b,AB(xy)</sup>	6,222 <sup>(x)</sup>	5,17 0,0495
NaHS	5,048 <sup>A</sup>	6,513 <sup>a,A</sup>	6,076	3,02 0,1236
SNP + GYY4137	3,909 <sup>B</sup>	4,920 <sup>bc,B</sup>	5,280	3,89 0,0826
SNP + NaHS	3,889 <sup>B</sup>	4,825 <sup>bc,B</sup>	4,758	1,70 0,2603
F test <i>P</i>	4,75 0,0126	5,29 0,0085	0,80 0,5722	

Podaci su prosjek tri ponavljanja; ANOVA, F test; razlike između tretmana lista za istu varijantu stresa, označene različitim slovom, su značajne prema LSD testu (<sup>a,b,c</sup> $P=0,05$ ; <sup>A,B,C</sup> $P=0,01$ ); razlike između varijante stresa u istom tretmanu lista označene različitim slovom, su značajne prema LSD testu (<sup>x,y,z</sup> $P=0,05$ ; <sup>X,Y,Z</sup> $P=0,01$ ).

Značajan utjecaj tretmana lista na promjer puči paprike, utvrđen je kod kontrole ( $P=0,0126$ ) i na solnom stresu ( $P=0,0085$ ) dok, prema F testu, na varijanti NaCl oporavak nije utvrđen značajan utjecaj (Tablica 12).

Najveći promjer puči (5,048  $\mu\text{m}$ ), utvrđen je nakon tretmana kontrolnih biljaka NaHS-om, te se prema LSD testu, nije značajno razlikovao od promjera nakon tretmana sa GYY4137 (4,347  $\mu\text{m}$ ). Izmjerene vrijednosti promjera puči kod kontrole te nakon

tretmana donorima H<sub>2</sub>S i NO, kao i njihovim međusobnim kombinacijama, nisu bile značajno različite.

Kod biljaka tretiranih NaCl-om, najveći promjer je utvrđen nakon tretmana NaHS-om (6,513 μm) te se statistički značajno razlikovao od promjera izmjerenih nakon ostalih tretmana. Između kontrole te nakon tretmana SNP-om i kombinacijama H<sub>2</sub>S donora sa SNP-om, nisu utvrđene značajne međusobne razlike u promjeru puči. Promjer puči kod listova tretiranih NO donatorom bio je statistički značajno manji (4,078 μm) od promjera utvrđenih nakon tretmana sa donorima H<sub>2</sub>S (5,351 μm GYY4137 i 6,513 μm NaHS).

Kod listova paprike, koji su bili tretirani sa GYY4137, F testom je utvrđen značajan utjecaj varijante stresa na promjer puči ( $P=0,0495$ ), dok ostali tretmani listova nisu značajno utjecali na promjer puči.

Prema LSD testu, kod tretmana sa GYY4137, na varijanti stresa NaCl oporavak je utvrđen značajno veći promjer puči (6,222 μm) od kontrole (4,347 μm), dok se na solnom stresu (5,351 μm) nije značajno razlikovao niti od kontrole niti od varijante NaCl oporavak.

### **5.2.1. Antioksidativna aktivnost u listu paprike u uvjetima solnog stresa**

F testom je utvrđen značajan utjecaj stresa na sve analizirane parametre (*Tablica 13*). Prema LSD testu, intenzitet lipidne peroksidacije i sadržaj prolina su bili značajno veći u listovima biljaka nakon izlaganja solnom stresu (0,375 nM g<sup>-1</sup> sv.t. TBARS i 1,808 μM g<sup>-1</sup> sv.t. PRO), dok između kontrole i tretmana NaCl oporavak, nisu utvrđene statistički značajne razlike u ova dva ispitivana parametra.

Značajno manja koncentracija vodikovog peroksida i ukupna aktivnost enzima gvajakol-peroksidaze (6,667 nM g<sup>-1</sup> sv.t. HP i 6,568 ΔA min<sup>-1</sup>g<sup>-1</sup> sv.t. GPODu), je utvrđena na tretmanu NaCl oporavak, dok između kontrole i biljaka izloženih solnom stresu, nisu utvrđene statistički značajne razlike za navedena dva parametra.

Ukupna aktivnost enzima glutation-reduktaze je bila najveća kod kontrolnih biljaka (0,392 ΔA min<sup>-1</sup>g<sup>-1</sup> sv.t. GRu) te se statistički značajno razlikovala od vrijednosti utvrđenih kod tretmana NaCl i NaCl oporavak za koje nisu utvrđene značajne međusobne razlike.

**Tablica 13.** Značajnost utjecaja solnog stresa (150 mM NaCl) na intenzitet lipidne peroksidacije (TBARS), koncentraciju vodikovog peroksida (HP) i sadržaj prolina (PRO) te ukupnu i specifičnu aktivnost enzima katalaze (CATu, CATs), gvajakol-peroksidaze (GPODu, GPODs) i glutation-reduktaze (GRu, GRs) u listovima paprike.

	VARIJANTA STRESA			F test <i>P</i>
	Kontrola	NaCl	NaCl oporavak	
<b>TBARS</b>	0,256 <sup>B</sup>	0,375 <sup>A</sup>	0,277 <sup>B</sup>	13,03 0,0066
<b>HP</b>	9,243 <sup>a,AB</sup>	11,175 <sup>a,A</sup>	6,667 <sup>b,B</sup>	10,50 0,0110
<b>PRO</b>	1,078 <sup>B</sup>	1,808 <sup>A</sup>	1,277 <sup>B</sup>	21,71 0,0018
<b>CATu</b>	1,940 <sup>b</sup>	1,908 <sup>b</sup>	4,789 <sup>a</sup>	5,89 0,0385
<b>GPODu</b>	17,401 <sup>a</sup>	17,097 <sup>a</sup>	6,568 <sup>b</sup>	7,45 0,0237
<b>GRu</b>	2,347 <sup>A</sup>	1,370 <sup>B</sup>	1,038 <sup>B</sup>	33,67 0,0005
<b>CATs</b>	0,308 <sup>b</sup>	0,235 <sup>b</sup>	0,608 <sup>a</sup>	5,88 0,0385
<b>GPODs</b>	3,302 <sup>A</sup>	1,859 <sup>AB</sup>	0,775 <sup>B</sup>	8,06 0,0200
<b>GRs</b>	0,392 <sup>a</sup>	0,267 <sup>ab</sup>	0,136 <sup>b</sup>	5,47 0,0445

TBARS i HP (nM g<sup>-1</sup> sv.t.); PRO (μM g<sup>-1</sup> sv.t.); (CATu, GPODu, GRu (ΔA min<sup>-1</sup>g<sup>-1</sup> sv.t.); CATs, GPODs, GRs (ΔA min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> prot.), podaci su prosjek tri ponavljanja; ANOVA, F test; prosjeci označeni različitim slovom se razlikuju prema LSD testu (<sup>a,b,c</sup> *P*=0,05; <sup>A,B,C</sup> *P*=0,01).

Također je najviša specifična aktivnost enzima gvajakol-peroksidaze i glutation-reduktaze (3,302 ΔA min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> prot. GPODs i 0,392 ΔA min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> prot. GRs), utvrđena u tkivu listova kontrolnih biljaka te je bila značajno veća od utvrđene kod tretmana NaCl oporavak. Specifične aktivnosti navedenih enzima nakon solnog stresa, nisu se značajno razlikovale od vrijednosti utvrđenih kod kontrole i kod varijante NaCl oporavak.

### 5.3. Utjecaj tretmana lista paprike Quadrato d'Asti Rosso s donorima H<sub>2</sub>S i ABA, na promjer puči

**Tablica 14.** Značajnost utjecaja tretmana lista donorom H<sub>2</sub>S i ABA-om (μM), na promjer puči (μm), kod paprike.

TRETMANI LISTA	Promjer puči
Kontrola	12,027 <sup>B</sup>
50 ABA	4,343 <sup>D</sup>
50 ABA + 10 GYY4137	5,027 <sup>D</sup>
50 ABA + 50 GYY4137	6,690 <sup>C</sup>
50 ABA + 100 GYY4137	6,613 <sup>C</sup>
100 GYY4137	13,047 <sup>A</sup>
F test	244,19
P	≤0,0001

Podaci su prosjek tri ponavljanja; ANOVA, F test; prosjeci označeni različitim slovom se razlikuju prema LSD testu (<sup>A,B,C</sup>  $P=0,01$ ).

Prema F testu, tretman lista je vrlo značajno utjecao na promjer puči kod paprike ( $P\leq 0,0001$ ; *Tablica 14*). Najveći promjer puči (13,047 μm) utvrđen je nakon tretmanu sa 100 μM GYY4137 te se prema LSD testu, statistički značajno razlikovao od promjera utvrđenih nakon svih ostalih tretmana. Najniže vrijednosti promjera puči izmjerene su nakon tretmana s 50 μM ABA i 50 μM ABA u kombinaciji s 10 μM GYY4137 te se međusobno nisu statistički značajno razlikovale. Utvrđene vrijednosti promjera nakon tretmana s 50 i 100 μM GYY4137 u kombinaciji s ABA-om, također se međusobno nisu značajno razlikovale, ali su bile značajno više od onih nakon tretmana sa čistom ABA-om i u kombinaciji s 10 μM GYY4137. Promjeri puči nakon tretmana s čistom ABA-om i u kombinaciji s GYY4137, bili su statistički značajno manji od promjera utvrđenih kod kontrole i nakon tretmana s čistim GYY4137.

F testom je utvrđen vrlo značajan utjecaj primjenjenih tretmana, na promjer puči kod paprike ( $P\leq 0,0001$ ; *Tablica 15*).

Najveći promjer puči (11,107 μm) je utvrđen na tretmanu sa 100 μM NaHS te se prema LSD testu statistički značajno razlikovao od promjera utvrđenih nakon svih ostalih tretmana. Značajno najmanja vrijednost promjera puči (4,523 μm) je utvrđena, očekivano, kod listova tretiranih s čistom ABA-om. Vrijednosti promjera utvrđene nakon tretmana s 10, 50 i 100 μM NaHS u kombinaciji s 50 μM ABA, proporcionalno



su pratile porast koncentracije NaHS-a te su se utvrđene vrijednosti u ovim tretmanima međusobno značajno razlikovale. Promjer puči kod kontrole (8,960  $\mu\text{m}$ ), bio je značajno veći od promjera izmjerenih nakon tretmana čistom ABA-om i u kombinaciji ABA-e s NaHS-om, a ujedno i značajno manji od promjera izmjerenih nakon tretmana s čistim NaHS-om.

**Tablica 15.** Značajnost utjecaja tretmana lista donorom  $\text{H}_2\text{S}$  i ABA-om ( $\mu\text{M}$ ), na promjer puči ( $\mu\text{m}$ ), kod paprike.

TRETMANI LISTA	Promjer puči
Kontrola	8,960 <sup>B</sup>
50 ABA	4,523 <sup>F</sup>
50 ABA + 10 NaHS	5,690 <sup>E</sup>
50 ABA + 50 NaHS	6,923 <sup>D</sup>
50 ABA + 100 NaHS	8,313 <sup>C</sup>
100 NaHS	11,107 <sup>A</sup>
F test	393,49
P	$\leq 0,0001$

Podaci su prosjek tri ponavljanja; ANOVA, F test; prosjeci označeni različitim slovom se razlikuju prema LSD testu (<sup>A,B,C</sup>  $P=0,01$ ).

F testom je utvrđen značajan utjecaj primjenjenih tretmana lista na promjer puči kod paprike ( $P \leq 0,0001$ ; *Tablica 16*).

Prema LSD testu, značajno najniža vrijednost promjera (3,093  $\mu\text{m}$ ), utvrđena je očekivano, kod listova izloženih uvjetima tame, dok je najveći promjer (6,223  $\mu\text{m}$ ), utvrđen kod listova nakon tretmana s 200  $\mu\text{M}$  NaHS u uvjetima tame. Utvrđeni promjer nakon tretmana s najvišom koncentracijom NaHS se nije statistički značajno razlikovao od promjera izmjerenih kod kontrole, u uvjetima dnevnog osvjetljenja (5,950  $\mu\text{m}$ ) te nakon tretmana s 200  $\mu\text{M}$  GYY4137 u uvjetima tame (6,050  $\mu\text{m}$ ). Vrijednosti promjera puči nakon tretmana rastućim koncentracijama oba donora  $\text{H}_2\text{S}$  u uvjetima tame, proporcionalno su pratile porast njihove koncentracije. Između tretmana s 200  $\mu\text{M}$  NaHS i 200  $\mu\text{M}$  GYY4137, odnosno tretmana sa 100  $\mu\text{M}$  NaHS i 100  $\mu\text{M}$  GYY4137, nisu utvrđene statistički značajne razlike. Izmjerene vrijednosti promjera puči nakon tretmana sa 100  $\mu\text{M}$  GYY4137 odnosno 50 i 100  $\mu\text{M}$  NaHS u uvjetima tame, nisu se međusobno značajno razlikovale.

**Tablica 16.** Značajnost utjecaja tretmana lista donorima H<sub>2</sub>S (μM), na promjer puči (μm), kod paprike.

TRETMANI LISTA	Promjer puči
Svjetlo	5,950 <sup>A</sup>
Tama	3,093 <sup>E</sup>
Tama + 50 NaHS	4,410 <sup>C</sup>
Tama + 100 NaHS	5,033 <sup>B</sup>
Tama + 200 NaHS	6,223 <sup>A</sup>
Tama + 50 GYY4137	3,763 <sup>D</sup>
Tama + 100 GYY4137	4,840 <sup>BC</sup>
Tama + 200 GYY4137	6,050 <sup>A</sup>
F test	60,97
P	≤0,0001

Podaci su prosjek tri ponavljanja; ANOVA, F test; prosjeci označeni različitim slovom se razlikuju prema LSD testu (<sup>A,B,C</sup> P=0,01).

**Tablica 17.** Značajnost utjecaja tretmana lista donorima H<sub>2</sub>S i ABA-om (μM), na promjer puči (μm), kod paprike.

TRETMANI LISTA	Promjer puči
Kontrola	6,960 <sup>b,BC</sup>
100 ABA	5,000 <sup>c,C</sup>
100 NaHS	10,740 <sup>a,A</sup>
100 ABA + 100 NaHS	7,840 <sup>b,B</sup>
100 GYY4137	8,800 <sup>b,AB</sup>
100 ABA + 100 GYY4137	7,080 <sup>b,BC</sup>
F test	10,35
P	<0,0005

Podaci su prosjek tri ponavljanja; ANOVA, F test; prosjeci označeni različitim slovom se razlikuju prema LSD testu (<sup>a,b,c</sup> P=0,05; <sup>A,B,C</sup> P=0,01).

Prema F testu, primjenjeni tretmani lista paprike su značajno utjecali na promjer puči (P<0,0005; *Tablica 17*).

Značajno najniža vrijednost promjera puči (5,000 μm), utvrđena je kod listova tretiranih s čistom ABA-om, dok je značajno najveća vrijednost navedenog pokazatelja (10,740 μm), izmjerena u tretmanu s čistim NaHS-om. Između izmjerenih vrijednosti promjera puči kod kontrole te nakon tretmana sa GYY4137 i kombinacijama oba H<sub>2</sub>S donora s ABA-om, nisu utvrđene statistički značajne razlike.

### 5.3.1. Utjecaj tretmana lista paprike s donorima NO i H<sub>2</sub>S te cPTIO na otvor puči

Prema F testu, primjenjeni tretmani su značajno utjecali na promjer puči kod paprike ( $P \leq 0,0001$ ; *Tablica 18*).

Najmanji promjer utvrđen je kod puči nakon tretmana sa SNP-om (4,900  $\mu\text{m}$ ), dok je najveći promjer utvrđen nakon tretmana s čistim NaHS-om (9,840  $\mu\text{m}$ ). Prema LSD testu, obje navedene vrijednosti su se statistički značajno razlikovale od vrijednosti izmjerenih nakon svih ostalih tretmana. Kod kontrole (7,483  $\mu\text{m}$ ) te nakon tretmana sa SNP-om u kombinaciji s oba donora H<sub>2</sub>S (GY4137: 7,547  $\mu\text{m}$ ; NaHS: 8,117  $\mu\text{m}$ ) i cPTIO (7,630  $\mu\text{m}$ ), nisu utvrđene značajne razlike u promjeru puči. Vrijednost promjera nakon tretmana čistim cPTIO (7,087  $\mu\text{m}$ ), također se nije razlikovala od onih utvrđenih kod kontrole te na kombinacijama SNP-a sa “scavengerom” NO (7,630  $\mu\text{m}$ ) i SNP s GYY4137. Nakon tretmana s GYY4137 i SNP-om u kombinaciji s NaHS, također nisu utvrđene statistički značajne razlike u promjeru puči.

**Tablica 18.** Značajnost utjecaja tretmana lista donorima H<sub>2</sub>S i NO te specifičnim NO “scavengerom” ( $\mu\text{M}$ ), na promjer puči ( $\mu\text{m}$ ), kod paprike.

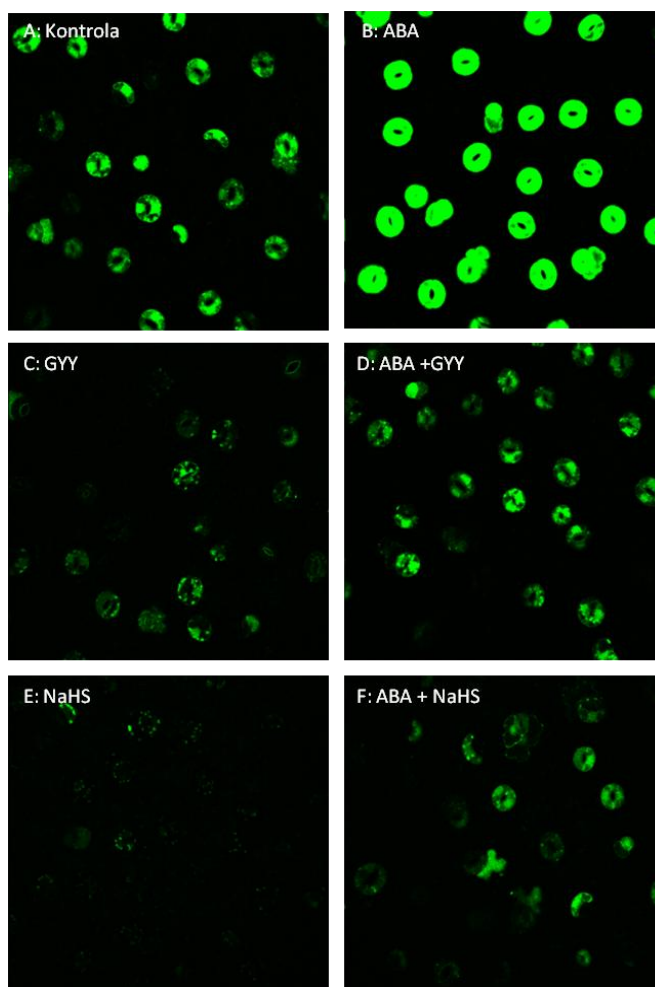
TRETMANI LISTA	Promjer puči
Kontrola	7,483 <sup>cd,BC</sup>
50 SNP	4,900 <sup>e,D</sup>
100 cPTIO	7,087 <sup>d,C</sup>
100 NaHS	9,840 <sup>a,A</sup>
100 GYY4137	8,330 <sup>b,B</sup>
50 SNP + 100 cPTIO	7,630 <sup>cd,BC</sup>
50 SNP + 100 NaHS	8,117 <sup>bc,B</sup>
50 SNP + 100 GYY4137	7,547 <sup>cd,BC</sup>
F test	41,81
P	$\leq 0,0001$

Podaci su prosjek tri ponavljanja; ANOVA, F test; prosjeci označeni različitim slovom se razlikuju prema LSD testu (<sup>a,b,c</sup>  $P=0,05$ ; <sup>A,B,C</sup>  $P=0,01$ ).

### 5.3.2. Detekcija i kvantifikacija NO u pučima paprike pomoću CLMS

F testom je utvrđen značajan utjecaj primjenjenih tretmana epidermalnih fragmenata lista paprike, na intenzitet fluorescencije puči ( $P \leq 0,0001$ ; *Tablica 19, Slika 6*).

Statistički značajno najjači intenzitet fluorescencije je utvrđen nakon tretmana s ABA (1435,24), dok je najmanji intenzitet utvrđen nakon tretmana s NaHS (107,65) te se nije značajno razlikovao od fluorescencije utvrđene pri tretmanu s GYY4137 + ABA (213,36). Između tretmana s čistim GYY4137 (337,30) i u kombinaciji navedenog spoja s ABA-om, nisu utvrđene značajne razlike u fluorescenciji puči. Također nisu utvrđene značajne međusobne razlike u fluorescenciji između kontrole (617,64) i varijante tretmana NaHS + ABA (527,39).



**Slika 6.** Učinak tretmana s donorima H<sub>2</sub>S (100 μM NaHS i 100 μM GYY4137) i ABA (50 μM) na produkciju NO, u stanicama puči kod paprike.

**Tablica 19.** Značajnost utjecaja tretmana lista donorima H<sub>2</sub>S i ABA-om (μM), na fluorescenciju puči, (prosječan broj zelenih piksela po puči), kod paprike.

TRETMANI EPIDERMALNIH FRAGMENTATA	Prosječna fluorescencija
Kontrola	617,64 <sup>B</sup>
100 NaHS	107,65 <sup>D</sup>
100 GYY4137	337,30 <sup>C</sup>
50 ABA	1435,24 <sup>A</sup>
100 NaHS + 50 ABA	213,36 <sup>CD</sup>
100 GYY4137 + 50 ABA	527,39 <sup>B</sup>
F test	139,18
P	≤0,0001

Podaci su prosjek tri ponavljanja; ANOVA, F test; prosjeci označeni različitim slovom se razlikuju prema LSD testu (<sup>A,B,C</sup> P=0,01).

#### 5.4. Antioksidativna aktivnost u listu paprike *Quadrato d'Asti Rosso*, u uvjetima solnog stresa, pod utjecajem tretmana biljke s donorima H<sub>2</sub>S i NO

**Tablica 20.** Značajnost utjecaja solnog stresa i tretmana biljke s donorima H<sub>2</sub>S i NO (200 μM SNP, 200 μM GYY4137, 200 μM NaHS), na intenzitet lipidne peroksidacije (TBARS), koncentraciju vodikovog peroksida (HP) i sadržaj prolina (PRO) u listovima paprike.

VARIJANTA NaCl STRESA	HP	TBARS	PRO
Kontrola	4,708 <sup>D</sup>	0,143 <sup>D</sup>	0,157 <sup>D</sup>
50 mM	6,827 <sup>C</sup>	0,174 <sup>C</sup>	0,175 <sup>C</sup>
100 mM	7,833 <sup>B</sup>	0,202 <sup>B</sup>	0,287 <sup>B</sup>
200 mM	9,915 <sup>A</sup>	0,241 <sup>A</sup>	0,434 <sup>A</sup>
F test	152,67	401,84	2672,26
<i>P</i>	≤0,0001	≤0,0001	≤0,0001
TRETMANI BILJKE			
Kontrola	8,488 <sup>A</sup>	0,188 <sup>C</sup>	0,324 <sup>B</sup>
NaHS	5,353 <sup>C</sup>	0,150 <sup>E</sup>	0,232 <sup>C</sup>
GYY4137	8,143 <sup>A</sup>	0,177 <sup>D</sup>	0,422 <sup>A</sup>
SNP	6,952 <sup>B</sup>	0,208 <sup>B</sup>	0,175 <sup>E</sup>
NaHS + SNP	8,375 <sup>A</sup>	0,223 <sup>A</sup>	0,229 <sup>C</sup>
GYY4137 + SNP	6,614 <sup>B</sup>	0,194 <sup>C</sup>	0,197 <sup>D</sup>
F test	33,24	100,01	953,84
<i>P</i>	≤0,0001	≤0,0001	≤0,0001
INTERAKCIJA			
(NaCl STRES x TRETMANI BILJKE) F test	18,22	17,24	482,84
<i>P</i>	≤0,0001	≤0,0001	≤0,0001

TBARS i HP (nM g<sup>-1</sup> sv.t.); PRO (μM g<sup>-1</sup> sv.t.), podaci su prosjek tri ponavljanja; ANOVA, F test; prosjeci označeni različitim slovom se razlikuju prema LSD testu (<sup>a,b,c</sup> *P*=0,05; <sup>A,B,C</sup> *P*=0,01).

Prema F testu, na koncentraciju peroksida u listu paprike je vrlo značajno utjecala razina solnog stresa (*P*≤0,0001), kao i tretman biljke donorima H<sub>2</sub>S i NO (*P*≤0,0001), odnosno interakcija oba faktora (*P*≤0,0001; *Tablica 20*).

Prema LSD testu, koncentracija peroksida se značajno povećavala u listu paprike s povećanjem intenziteta solnog stresa te je najveća vrijednost (9,915 nM g<sup>-1</sup> sv.t.), utvrđena na 200 mM NaCl. Uspoređujući utjecaj tretmana biljke s donorima H<sub>2</sub>S i NO, najveća koncentracija peroksida je utvrđena na kontroli (8,488 nM g<sup>-1</sup> sv.t.), zatim pri tretmanu s kombinacijom NaHS + SNP (8,37 nM g<sup>-1</sup> sv.t.) te s GYY4137 (8,143 nM g<sup>-1</sup> sv.t.). Između navedenih varijanata pokusa nije bilo značajne razlike u koncentraciji peroksida. Najniža koncentracija peroksida je utvrđena u varijanti tretmana biljke s

NaHS ( $5,353 \text{ nM g}^{-1} \text{ sv.t.}$ ). Varijante GYY4137 + SNP ( $6,614 \text{ nM g}^{-1} \text{ sv.t.}$ ) i SNP ( $6,952 \text{ nM g}^{-1} \text{ sv.t.}$ ) se nisu značajno razlikovale.

F testom je utvrđen značajan utjecaj razine solnog stresa ( $P \leq 0,0001$ ), primjenjenih donora  $\text{H}_2\text{S}$  i NO ( $P \leq 0,0001$ ), kao i njihove interakcije ( $P \leq 0,0001$ ), na razinu lipidne peroksidacije u tkivu lista paprike.

Prema LSD testu, razina lipidne peroksidacije se značajno povećavala s povećanjem intenziteta solnog stresa te je najveća vrijednost utvrđena na  $200 \text{ mM NaCl}$  ( $0,241 \text{ nM g}^{-1} \text{ sv.t.}$ ). S obzirom na primjenjene tretmane biljke, najviša značajna vrijednost razine lipidne peroksidacije je utvrđena pri tretmanu s kombinacijom NaHS + SNP ( $0,233 \text{ nM g}^{-1} \text{ sv.t.}$ ). Najniže vrijednosti navedenog parametra su utvrđene na tretmanima s donorima  $\text{H}_2\text{S}$  (NaHS:  $0,150 \text{ nM g}^{-1} \text{ sv.t.}$ , GYY4137:  $0,177 \text{ nM g}^{-1} \text{ sv.t.}$ ) te su se također međusobno značajno razlikovale. Kod tretmana biljke s kombinacijom GYY4137 + SNP, nije utvrđena značajna razlika u razini lipidne peroksidacije u odnosu na kontrolu.

Prema F, testu razina solnog stresa ( $P \leq 0,0001$ ), tretman biljke donorima  $\text{H}_2\text{S}$  i NO ( $P \leq 0,0001$ ) te njihova interakcija ( $P \leq 0,0001$ ), značajno su utjecali na koncentraciju prolina kod paprike.

Kao i kod prethodna dva ispitivana parametra, sadržaj prolina se proporcionalno povećavao s razinom solnog stresa te je najviša vrijednost ( $0,434 \text{ } \mu\text{M g}^{-1} \text{ sv.t.}$ ) utvrđena na  $200 \text{ mM NaCl}$ . Uspoređujući utjecaj tretmana biljke s donorima  $\text{H}_2\text{S}$  i NO, najveći sadržaj prolina ( $0,422 \text{ } \mu\text{M g}^{-1} \text{ sv.t.}$ ) je utvrđen u varijanti tretmana biljke s GYY4137. Značajno najniža vrijednost sadržaja prolina ( $0,175 \text{ } \mu\text{M g}^{-1} \text{ sv.t.}$ ) je utvrđena kod tretmana biljke s donatorom NO. Vrijednosti sadržaja prolina utvrđene na varijantama tretmana biljke s čistim NaHS ( $0,232 \text{ } \mu\text{M g}^{-1} \text{ sv.t.}$ ) i u kombinaciji s SNP ( $0,229 \text{ } \mu\text{M g}^{-1} \text{ sv.t.}$ ) se nisu međusobno značajno razlikovale.

Prema F testu, na ukupnu aktivnost katalaze u listu paprike je vrlo značajno utjecala razina solnog stresa ( $P=0,0004$ ), kao i njezina interakcija sa tretmanom biljke donorima  $\text{H}_2\text{S}$  i NO ( $P=0,0192$ ), dok tretmani biljke nisu značajno utjecali na aktivnost navedenog enzima (*Tablica 21*).

**Tablica 21.** Značajnost utjecaja solnog stresa i tretmana biljke s donorima H<sub>2</sub>S i NO (200 μM SNP, 200 μM GYY4137, 200 μM NaHS), na ukupnu aktivnost enzima katalaze (CATu), gvajakol-peroksidaze (GPODu) i glutation-reduktaze (GRu) u listovima paprike.

VARIJANTA NaCl STRESA	CATu	GPODu	GRu
Kontrola	20,146 <sup>c,B</sup>	3,649 <sup>C</sup>	3,187 <sup>B</sup>
50 mM	24,362 <sup>b,AB</sup>	3,277 <sup>D</sup>	3,797 <sup>A</sup>
100 mM	29,346 <sup>a,A</sup>	4,800 <sup>B</sup>	3,826 <sup>A</sup>
200 mM	23,400 <sup>bc,B</sup>	5,479 <sup>A</sup>	3,767 <sup>A</sup>
F test	8,21	718,71	18,94
P	0,0004	≤0,0001	≤0,0001
TRETMANI BILJKE			
Kontrola	25,333	5,100 <sup>b,B</sup>	3,847 <sup>A</sup>
NaHS	26,833	5,469 <sup>a,A</sup>	4,053 <sup>A</sup>
GYY4137	22,757	5,048 <sup>b,B</sup>	3,866 <sup>A</sup>
SNP	22,369	3,217 <sup>e,D</sup>	3,110 <sup>C</sup>
NaHS + SNP	23,615	3,396 <sup>d,D</sup>	3,478 <sup>B</sup>
GYY4137 + SNP	24,975	3,578 <sup>c,C</sup>	3,511 <sup>B</sup>
F test	1,10	469,23	15,87
P	0,3835	≤0,0001	≤0,0001
INTERAKCIJA			
(NaCl STRES x TRETMANI BILJKE) F test	2,42	100,62	19,77
P	0,0192	≤0,0001	≤0,0001

ΔA min<sup>-1</sup>g<sup>-1</sup> sv.t.; podaci su prosjek tri ponavljanja; ANOVA, F test; prosjeci označeni različitim slovom se razlikuju prema LSD testu (<sup>a,b,c</sup> P=0,05; <sup>A,B,C</sup> P=0,01).

Prema LSD testu, ukupna aktivnost katalaze je bila najveća na 100 mM NaCl (29,346 ΔA min<sup>-1</sup>g<sup>-1</sup> sv.t.) te se statistički značajno razlikovala od vrijednosti utvrđenih na ostalim razinama. Najniža aktivnost navedenog enzima je utvrđena kod kontrole (25,333 ΔA min<sup>-1</sup>g<sup>-1</sup> sv.t.) te se nije statistički značajno razlikovala od vrijednosti utvrđene na 200 mM NaCl (23,400 ΔA min<sup>-1</sup>g<sup>-1</sup> sv.t.). Također nisu utvrđene značajne razlike u ukupnoj aktivnosti katalaze između razina 50 mM (24,362 ΔA min<sup>-1</sup>g<sup>-1</sup> sv.t.) i 200 mM NaCl.

F testom je utvrđen značajan utjecaj razine solnog stresa (P≤0,0001), primjenjenih donora H<sub>2</sub>S i NO (P≤0,0001), kao i njihove interakcije (P≤0,0001), na ukupnu aktivnost enzima gvajakol-peroksidaze u tkivu lista paprike.

Prema LSD testu, ukupna aktivnost gvajakol-peroksidaze se statistički značajno razlikovala na svim razinama stresa te je tako najniža aktivnost utvrđena na 50 mM NaCl (3,277 ΔA min<sup>-1</sup>g<sup>-1</sup> sv.t.), a najviša na 200 mM NaCl (5,479 ΔA min<sup>-1</sup>g<sup>-1</sup> sv.t.).

S obzirom na primjenjene tretmane biljke, najviša aktivnost navedenog enzima je utvrđena pri tretmanu s NaHS ( $5,469 \Delta A \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ sv.t.}$ ). Najniža vrijednost aktivnosti gvajakol-peroksidaze je utvrđena pri tretmanu s donatorom NO ( $3,217 \Delta A \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ sv.t.}$ ). Kod tretmana biljke s GYY4137 ( $5,048 \Delta A \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ sv.t.}$ ), nije utvrđena značajna razlika u aktivnosti spomenutog enzima, u odnosu na kontrolu ( $5,100 \Delta A \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ sv.t.}$ ). Također je utvrđena statistički značajna razlika u aktivnosti gvajakol-peroksidaze između vrijednosti utvrđenih pri tretmanima biljaka kombinacijom oba donora H<sub>2</sub>S s donatorom NO (NaHS + SNP:  $3,396 \Delta A \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ sv.t.}$ , GYY4137 + SNP:  $3,578 \Delta A \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ sv.t.}$ ).

F testom je utvrđen značajan utjecaj razine solnog stresa ( $P \leq 0,0001$ ), tretmana biljke donatorima H<sub>2</sub>S i NO ( $P \leq 0,0001$ ) te njihove interakcije ( $P \leq 0,0001$ ), na ukupnu aktivnost enzima glutation-reduktaze u listu paprike.

Prema LSD testu, utvrđena vrijednost aktivnosti ovog enzima na kontroli ( $3,187 \Delta A \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ sv.t.}$ ), je bila značajno niža nego na svim ostalim razinama solnog stresa (50 mM NaCl:  $3,797 \Delta A \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ sv.t.}$ , 100 mM NaCl:  $3,826 \Delta A \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ sv.t.}$ , 200 mM NaCl:  $3,767 \Delta A \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ sv.t.}$ ), između kojih nisu utvrđene značajne međusobne razlike. Uspoređujući tretman biljke s donatorima H<sub>2</sub>S i NO, vrijednosti ukupne aktivnosti glutation-reduktaze pri tretmanima s oba donora H<sub>2</sub>S (NaHS:  $4,053 \Delta A \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ sv.t.}$  i GYY4137:  $3,866 \Delta A \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ sv.t.}$ ) se nisu značajno razlikovale od kontrole ( $3,847 \Delta A \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ sv.t.}$ ). Također nisu utvrđene značajne međusobne razlike u aktivnosti navedenog enzima ni pri tretmanima biljaka kombinacijom oba donora H<sub>2</sub>S s SNP-om. Značajno najmanja aktivnost navedenog enzima je utvrđena pri tretmanu s donatorom NO ( $3,110 \Delta A \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ sv.t.}$ ).

Prema F testu, razina solnog stresa ( $P \leq 0,0001$ ) i interakcija s tretmanima biljke donatorima H<sub>2</sub>S i NO ( $P = 0,0086$ ) su značajno utjecale na specifičnu aktivnost katalaze u listu paprike, dok tretmani biljke nisu imali statistički značajan utjecaj (*Tablica 22*).

Prema LSD testu, povećana specifična aktivnost katalaze je utvrđena na 100 mM NaCl ( $5,014 \Delta A \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ prot.}$ ) i 200 mM NaCl ( $4,508 \Delta A \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ prot.}$ ) te se utvrđene vrijednosti na navedene dvije razine solnog stresa nisu međusobno značajno razlikovale. Značajno niža specifična aktivnost enzima katalaze zabilježena je kod kontrole ( $3,140$



$\Delta A \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ prot.}$ ) i na 50 mM NaCl ( $3,149 \Delta A \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ prot.}$ ) te se ove dvije vrijednosti također nisu međusobno značajno razlikovale.

**Tablica 22.** Značajnost utjecaja solnog stresa i tretmana biljke s donorima H<sub>2</sub>S i NO (200  $\mu\text{M}$  SNP, 200  $\mu\text{M}$  GYY4137, 200  $\mu\text{M}$  NaHS), na specifičnu aktivnost enzima katalaze (CATs), gvajakol-peroksidaze (GPODs) i glutation-reduktaze (GRs) u listovima paprike.

<b>VARIJANTA NaCl STRESA</b>	CATs	GPODs	GRs
Kontrola	3,140 <sup>B</sup>	0,936 <sup>a,A</sup>	0,316 <sup>c,B</sup>
50 mM	3,149 <sup>B</sup>	0,621 <sup>c,B</sup>	0,362 <sup>b,A</sup>
100 mM	5,014 <sup>A</sup>	0,792 <sup>b,AB</sup>	0,398 <sup>a,A</sup>
200 mM	4,508 <sup>A</sup>	0,814 <sup>ab,A</sup>	0,369 <sup>ab,A</sup>
F test	16,39	8,59	10,32
P	$\leq 0,0001$	0,0003	$\leq 0,0001$
<b>TRETMANI BILJKE</b>			
Kontrola	4,122	0,859 <sup>b,B</sup>	0,368 <sup>bc,AB</sup>
NaHS	4,435	1,265 <sup>a,A</sup>	0,416 <sup>a,A</sup>
GYY4137	3,702	0,799 <sup>bc,BC</sup>	0,398 <sup>ab,A</sup>
SNP	3,431	0,604 <sup>d,CD</sup>	0,307 <sup>d,C</sup>
NaHS + SNP	3,907	0,567 <sup>d,D</sup>	0,335 <sup>cd,BC</sup>
GYY4137 + SNP	4,118	0,650 <sup>cd,BCD</sup>	0,343 <sup>cd,BC</sup>
F test	1,50	22,74	10,00
P	0,2200	$\leq 0,0001$	$\leq 0,0001$
<b>INTERAKCIJA</b>			
<b>(NaCl STRES x TRETMANI BILJKE) F test</b>	2,77	9,14	6,06
P	0,0086	$\leq 0,0001$	$\leq 0,0001$

$\Delta A \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ prot.}$ ; podaci su prosjek tri ponavljanja; ANOVA, F test; prosjeci označeni različitim slovom se razlikuju prema LSD testu (<sup>a,b,c</sup>  $P=0,05$ ; <sup>A,B,C</sup>  $P=0,01$ ).

F testom je utvrđen značajan utjecaj razine solnog stresa ( $P=0,0003$ ), primjenjenih donora H<sub>2</sub>S i NO ( $P\leq 0,0001$ ), kao i njihove interakcije ( $P\leq 0,0001$ ), na specifičnu aktivnost enzima gvajakol-peroksidaze u tkivu lista paprike.

Prema LSD testu, specifična aktivnost gvajakol-peroksidaze je bila najmanja na 50 mM NaCl ( $0,621 \Delta A \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ prot.}$ ) te se statistički značajno razlikovala od vrijednosti utvrđenih na ostalim razinama solnog stresa. Povećana aktivnost navedenog enzima je utvrđena kod kontrole ( $0,936 \Delta A \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ prot.}$ ) i na 200 mM NaCl ( $0,814 \Delta A \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ prot.}$ ) te se ove vrijednosti nisu statistički značajno razlikovale. Također nisu utvrđene značajne razlike u aktivnosti enzima gvajakol-peroksidaze između razina 100 mM NaCl ( $0,792 \Delta A \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ prot.}$ ) i 200 mM NaCl.

S obzirom na primjenjene tretmane biljke, najviša aktivnost navedenog enzima je utvrđena pri tretmanu s NaHS ( $1,265 \Delta A \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ prot.}$ ). Pad specifične aktivnosti gvajakol-peroksidaze je utvrđen pri tretmanima s čistim donatorom NO ( $0,604 \Delta A \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ prot.}$ ) te u kombinaciji s donatorima H<sub>2</sub>S (NaHS + SNP:  $0,567 \Delta A \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ prot.}$ , GYY4137 + SNP:  $0,650 \Delta A \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ prot.}$ ). Vrijednosti utvrđene pri navedenim tretmanima se nisu međusobno značajno razlikovale. Također nisu utvrđene značajne razlike u aktivnosti gvajakol-peroksidaze između kontrole ( $0,859 \Delta A \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ prot.}$ ) i tretmana s GYY4137 ( $0,799 \Delta A \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ prot.}$ ) kao ni između tretmana biljke s čistim GYY4137 i u kombinaciji sa donatorom NO.

F testom je utvrđen značajan utjecaj razine solnog stresa ( $P \leq 0,0001$ ), tretmana biljke s donatorima H<sub>2</sub>S i NO ( $P \leq 0,0001$ ) te njihove interakcije ( $P \leq 0,0001$ ), na specifičnu aktivnost enzima glutathion-reduktaze u listu paprike.

Prema LSD testu, specifična aktivnost ovog enzima je bila značajno viša na primjenjenim razinama solnog stresa (50 mM NaCl:  $0,362 \Delta A \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ prot.}$ , 100 mM NaCl:  $0,398 \Delta A \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ prot.}$ , 200 mM NaCl:  $0,369 \Delta A \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ prot.}$ ) u odnosu na aktivnost utvrđenu u kontrolnim biljkama ( $0,316 \Delta A \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ prot.}$ ). Specifična aktivnost glutathion-reduktaze na razini stresa 200 mM NaCl, nije se značajno razlikovala od vrijednosti utvrđenih na 50 mM i 100 mM NaCl. Uspoređujući tretmane biljke s donatorima H<sub>2</sub>S i NO, povećana specifična aktivnost navedenog enzima je utvrđena pri tretmanu s donatorima H<sub>2</sub>S (NaHS:  $0,416 \Delta A \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ prot.}$ , GYY4137:  $0,398 \Delta A \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ prot.}$ ) ali se ova dva tretmana nisu međusobno statistički značajno razlikovala. Specifična aktivnost glutathion-reduktaze utvrđena kod kontrole ( $0,368 \Delta A \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ prot.}$ ), nije se značajno razlikovala od utvrđene pri tretmanu s GYY4137 te pri kombinacijama oba donora H<sub>2</sub>S s donatorom NO, (NaHS + SNP:  $0,335 \Delta A \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ prot.}$ , GYY4137 + SNP:  $0,343 \Delta A \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ prot.}$ ). Pri tretmanima s čistim SNP-om ( $0,307 \Delta A \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ prot.}$ ), odnosno u kombinaciji ovog spoja s donatorima H<sub>2</sub>S, nisu utvrđene značajne međusobne razlike u specifičnoj aktivnosti navedenog enzima.

Prema F testu, tretman biljke je značajno utjecao na razinu lipidne peroksidacije u tkivu lista paprike na svim razinama solnog stresa (kontrola  $P=0,0032$ , 50 mM, 100 mM i 200 mM NaCl  $P \leq 0,0001$ ; *Tablica 23*).

**Tablica 23.** Značajnost utjecaja solnog stresa i tretmana biljke s donorima H<sub>2</sub>S i NO (200 μM SNP, 200 μM GYY4137, 200 μM NaHS), na intenzitet lipidne peroksidacije u listovima paprike.

TRETMANI BILJKE	VARIJANTA NaCl STRESA				F test
	Kontrola	50 mM	100 mM	200 mM	P
Kontrola	0,135 <sup>BC(Z)</sup>	0,178 <sup>b,A(Y)</sup>	0,228 <sup>a,AB(X)</sup>	0,212 <sup>C(X)</sup>	49,77 ≤0,0001
NaHS	0,126 <sup>C(z,z)</sup>	0,141 <sup>d,B(y,YZ)</sup>	0,151 <sup>c,D(y,Y)</sup>	0,181 <sup>D(x,X)</sup>	49,32 ≤0,0001
GYY4137	0,137 <sup>BC(w,Y)</sup>	0,157 <sup>c,B(z,Y)</sup>	0,195 <sup>b,BC(y,X)</sup>	0,220 <sup>C(x,X)</sup>	45,39 ≤0,0001
SNP	0,142 <sup>BC(w,Z)</sup>	0,194 <sup>a,A(z,Y)</sup>	0,234 <sup>a,A(y,X)</sup>	0,262 <sup>B(x,X)</sup>	45,60 ≤0,0001
NaHS + SNP	0,167 <sup>A(Z)</sup>	0,185 <sup>ab,A(Z)</sup>	0,234 <sup>a,A(Y)</sup>	0,304 <sup>A(X)</sup>	96,18 ≤0,0001
GYY4137 + SNP	0,152 <sup>AB(Z)</sup>	0,189 <sup>ab,A(Y)</sup>	0,172 <sup>bc,DC(YZ)</sup>	0,265 <sup>B(X)</sup>	64,35 ≤0,0001
F test	6,79	27,79	20,13	62,19	
P	0,0032	≤0,0001	≤0,0001	≤0,0001	

nM g<sup>-1</sup> sv.t.; podaci su prosjek tri ponavljanja; ANOVA, F test; razlike između tretmana biljke za istu varijantu stresa, označene različitim slovom, su značajne prema LSD testu (<sup>a,b,c</sup> P=0,05; <sup>A,B,C</sup> P=0,01); razlike između varijante stresa u istom tretmanu biljke označene različitim slovom, su značajne prema LSD testu (<sup>x,y,z</sup> P=0,05; <sup>X,Y,Z</sup> P=0,01).

Povećani intenzitet lipidne peroksidacije kod kontrole (biljke koje nisu izložene solnom stresu) je utvrđen pri tretmanima biljke s kombinacijom donora H<sub>2</sub>S i NO (NaHS + SNP: 0,167 nM g<sup>-1</sup> sv.t., GYY4137 + SNP: 0,152 nM g<sup>-1</sup> sv.t.) te se prema LSD testu, ove dvije vrijednosti nisu statistički značajno razlikovale. Razine lipidne peroksidacije kod kontrole (biljaka koje nisu tretirane donorima H<sub>2</sub>S i NO) (0,135 nM g<sup>-1</sup> sv.t.) te pri tretmanima s NaHS (0,126 nM g<sup>-1</sup> sv.t.), GYY4137 (0,137 nM g<sup>-1</sup> sv.t.) i SNP (0,142 nM g<sup>-1</sup> sv.t.), se nisu međusobno statistički značajno razlikovale.

Na razini solnog stresa 50 mM NaCl, prema LSD testu, tretmani donorima H<sub>2</sub>S su značajno smanjili intenzitet lipidne peroksidacije (0,141 nM g<sup>-1</sup> sv.t. NaHS, 0,157 nM g<sup>-1</sup> sv.t. GYY4137) te su se ove vrijednosti također međusobno značajno razlikovale. Povećani intenzitet peroksidacije lipida je utvrđen pri tretmanima biljaka s čistim SNP-om (0,194 nM g<sup>-1</sup> sv.t.) te pri kombinacijama navedenog spoja s donorima H<sub>2</sub>S (NaHS + SNP: 0,185 nM g<sup>-1</sup> sv.t., GYY4137 + SNP: 0,189 nM g<sup>-1</sup> sv.t.). Utvrđene vrijednosti pri navedenim tretmanima se nisu međusobno značajno razlikovale. Utvrđena vrijednost

lipidne peroksidacije netretiranih biljaka ( $0,178 \text{ nM g}^{-1} \text{ sv.t.}$ ), na razini solnog stresa  $50 \text{ mM NaCl}$ , također se nije značajno razlikovala od vrijednosti utvrđenih pri tretmanima s kombinacijom donora  $\text{H}_2\text{S}$  i  $\text{NO}$ .

Na razini solnog stresa  $100 \text{ mM NaCl}$ , pri tretmanima s  $\text{NaHS}$  ( $0,151 \text{ nM g}^{-1} \text{ sv.t.}$ ) i  $\text{GYY4137} + \text{SNP}$  ( $0,172 \text{ nM g}^{-1} \text{ sv.t.}$ ), utvrđen je najmanji intenzitet lipidne peroksidacije te se ove dvije vrijednosti nisu međusobno značajno razlikovale. Povišeni intenzitet lipidne peroksidacije je utvrđen kod kontrole ( $0,228 \text{ nM g}^{-1} \text{ sv.t.}$ ) te tretmana s  $\text{SNP}$  ( $0,234 \text{ nM g}^{-1} \text{ sv.t.}$ ) i  $\text{NaHS} + \text{SNP}$  ( $0,234 \text{ nM g}^{-1} \text{ sv.t.}$ ), između kojih nisu utvrđene značajne razlike. Varijante tretmana biljke s čistim  $\text{GYY4137}$  ( $0,195 \text{ nM g}^{-1} \text{ sv.t.}$ ) te u kombinaciji navedenog spoja s  $\text{SNP}$  ( $0,172 \text{ nM g}^{-1} \text{ sv.t.}$ ), se nisu međusobno značajno razlikovale.

Značajno najniža vrijednost intenziteta lipidne peroksidacije, na razini solnog stresa  $200 \text{ mM NaCl}$ , utvrđena je pri tretmanu s  $\text{NaHS}$  ( $0,181 \text{ nM g}^{-1} \text{ sv.t.}$ ), dok je značajno najviša vrijednost navedenog parametra utvrđena pri tretmanu  $\text{NaHS} + \text{SNP}$  ( $0,304 \text{ nM g}^{-1} \text{ sv.t.}$ ). Intenzitet lipidne peroksidacije, na navedenoj razini stresa, utvrđen kod netretiranih biljaka ( $0,212 \text{ nM g}^{-1} \text{ sv.t.}$ ) se nije značajno razlikovao od utvrđenog pri tretmanu s  $\text{GYY4137}$  ( $0,220 \text{ nM g}^{-1} \text{ sv.t.}$ ). Također nije utvrđena značajna razlika u intenzitetu lipidne peroksidacije, između tretmana s  $\text{SNP}$ -om ( $0,262 \text{ nM g}^{-1} \text{ sv.t.}$ ) i u kombinaciji navedenog donora  $\text{NO}$  sa  $\text{GYY4137}$  ( $0,265 \text{ nM g}^{-1} \text{ sv.t.}$ ).

F testom je utvrđen značajan utjecaj solnog stresa na intenzitet lipidne peroksidacije za sve primjenjene tretmane biljke ( $P \leq 0,0001$ ).

Prema LSD testu, kod kontrole (biljaka koje nisu tretirane donorima  $\text{H}_2\text{S}$  i  $\text{NO}$ ) je, očekivano, utvrđen najniži intenzitet peroksidacije lipida koji se proporcionalno povećavao sa intenzitetom solnoga stresa. Utvrđene vrijednosti lipidne peroksidacije na razinama stresa  $100 \text{ mM}$  ( $0,228 \text{ nM g}^{-1} \text{ sv.t.}$ ) i  $200 \text{ mM NaCl}$  ( $0,212 \text{ nM g}^{-1} \text{ sv.t.}$ ) se nisu međusobno značajno razlikovale. Kod svih primjenjenih tretmana donorima  $\text{H}_2\text{S}$  odnosno  $\text{NO}$  je zabilježen porast peroksidacije lipida u listu paprike s povećanjem razine solnog stresa. Pri tretmanu s  $\text{NaHS}$  između razina solnog stresa  $50 \text{ mM}$  ( $0,141 \text{ nM g}^{-1} \text{ sv.t.}$ ) i  $100 \text{ mM NaCl}$  ( $0,151 \text{ nM g}^{-1} \text{ sv.t.}$ ), nisu utvrđene značajne međusobne razlike u razini lipidne peroksidacije. Pri tretmanima s  $\text{GYY4137}$  i  $\text{SNP}$ , razina lipidne peroksidacije je također proporcionalno pratila porast koncentracije  $\text{NaCl}$  te su se

utvrđene vrijednosti na svim razinama solnog stresa, statistički značajno razlikovale. Utvrđeni intenzitet peroksidacije lipida pri tretmanu s NaHS u kombinaciji s donatorom NO se nije značajno razlikovao između kontrole (0,167 nM g<sup>-1</sup> sv.t.) i 50 mM NaCl (0,185 nM g<sup>-1</sup> sv.t.). Pri tretmanu biljaka kombinacijom GYY4137 + SNP, utvrđeni intenzitet lipidne peroksidacije na razini stresa 100 mM NaCl (0,172 nM g<sup>-1</sup> sv.t.) se nije značajno razlikovao od utvrđenog kod kontrole (0,152 nM g<sup>-1</sup> sv.t.) i na 50 mM NaCl (0,189 nM g<sup>-1</sup> sv.t.), dok su se ove dvije vrijednosti međusobno značajno razlikovale.

Prema F testu, tretman biljke je značajno utjecao na sadržaj prolina u tkivu lista paprike na svim razinama solnog stresa ( $P \leq 0,0001$ ; *Tablica 24*).

**Tablica 24.** Značajnost utjecaja solnog stresa i tretmana biljke s donorima H<sub>2</sub>S i NO (200 μM SNP, 200 μM GYY4137, 200 μM NaHS), na sadržaj prolina u listovima paprike.

TRETMANI BILJKE	VARIJANTA NaCl STRESA				F test
	Kontrola	50 mM	100 mM	200 mM	P
Kontrola	0,191 <sup>a,A(Z)</sup>	0,234 <sup>a,A(Y)</sup>	0,198 <sup>E(Z)</sup>	0,675 <sup>B(X)</sup>	1279,32 ≤0,0001
NaHS	0,124 <sup>c,C(W)</sup>	0,168 <sup>cd,CD(Z)</sup>	0,257 <sup>C(Y)</sup>	0,381 <sup>C(X)</sup>	181,26 ≤0,0001
GYY4137	0,183 <sup>a,A(Z)</sup>	0,129 <sup>e,E(W)</sup>	0,544 <sup>A(Y)</sup>	0,834 <sup>A(X)</sup>	2247,84 ≤0,0001
SNP	0,146 <sup>b,BC(w,Y)</sup>	0,162 <sup>d,D(z,Y)</sup>	0,189 <sup>E(y,X)</sup>	0,203 <sup>E(x,X)</sup>	51,34 ≤0,0001
NaHS + SNP	0,144 <sup>bc,BC(Z)</sup>	0,174 <sup>c,BC(Y)</sup>	0,303 <sup>B(X)</sup>	0,293 <sup>D(X)</sup>	361,75 ≤0,0001
GYY4137 + SNP	0,154 <sup>b,B(w,Z)</sup>	0,185 <sup>b,B(z,Y)</sup>	0,231 <sup>D(x,X)</sup>	0,218 <sup>E(y,X)</sup>	121,20 ≤0,0001
F test	14,89	150,13	1027,68	1015,83	
P	≤0,0001	≤0,0001	≤0,0001	≤0,0001	

μM g<sup>-1</sup> sv.t.; podaci su prosjek tri ponavljanja; ANOVA, F test; razlike između tretmana biljke za istu varijantu stresa, označene različitim slovom, su značajne prema LSD testu (<sup>a,b,c</sup>  $P=0,05$ ; <sup>A,B,C</sup>  $P=0,01$ ); razlike između varijante stresa u istom tretmanu biljke označene različitim slovom, su značajne prema LSD testu (<sup>x,y,z</sup>  $P=0,05$ ; <sup>X,Y,Z</sup>  $P=0,01$ ).

Kod kontrole (biljke koje nisu izložene solnom stresu), povećani sadržaj prolina je utvrđena kod biljaka netretiranih donorima H<sub>2</sub>S i NO (0,191 μM g<sup>-1</sup> sv.t.) i pri tretmanu s GYY4137 (0,183 μM g<sup>-1</sup> sv.t.) te se, prema LSD testu, ove vrijednosti nisu

međusobno značajno razlikovale. Najniži sadržaj prolina je utvrđen pri tretmanu s NaHS ( $0,124 \mu\text{M g}^{-1}$  sv.t.) te se nije značajno razlikovao od vrijednosti utvrđenih pri tretmanu s kombinacijom ovog spoja i SNP ( $0,144 \mu\text{M g}^{-1}$  sv.t.). Pri tretmanima kontrolnih biljaka s čistim SNP-om te pri kombinaciji ovog spoja s oba donora  $\text{H}_2\text{S}$ , također nisu utvrđene značajne međusobne razlike u analiziranom parametru.

Na razini solnog stresa  $50 \text{ mM NaCl}$ , najviši sadržaj prolina je utvrđen kod kontrole (biljaka netretiranih donorima  $\text{H}_2\text{S}$  i  $\text{NO}$ ;  $0,234 \mu\text{M g}^{-1}$  sv.t.), dok je najniži sadržaj ove aminokiseline utvrđen pri tretmanu s GYY4137 ( $0,129 \mu\text{M g}^{-1}$  sv.t.). Obje navedene vrijednosti su se, prema LSD testu, značajno razlikovale od utvrđenih pri ostalim tretmanima biljke na navedenoj razini solnog stresa. Sadržaj prolina pri tretmanu s NaHS ( $0,168 \mu\text{M g}^{-1}$  sv.t.) se nije značajno razlikovao od utvrđenog pri tretmanu s čistim SNP-om ( $0,162 \mu\text{M g}^{-1}$  sv.t.) te kod kombinacije navedenog donora  $\text{NO}$  s NaHS-om ( $0,174 \mu\text{M g}^{-1}$  sv.t.).

Na razini solnog stresa  $100 \text{ mM NaCl}$ , pri tretmanu biljaka s GYY4137 je utvrđena značajno najviša vrijednost sadržaja prolina ( $0,544 \mu\text{M g}^{-1}$  sv.t.). Najmanji sadržaj prolina je utvrđen kod kontrolnih biljaka i pri tretmanu s SNP te se vrijednosti pri ove dvije varijante tretmana biljke nisu međusobno značajno razlikovale.

Na  $200 \text{ mM NaCl}$ , najniže vrijednosti sadržaja prolina su utvrđene pri tretmanima biljaka s SNP ( $0,203 \mu\text{M g}^{-1}$  sv.t.) i GYY4137 ( $0,834 \mu\text{M g}^{-1}$  sv.t.) gdje se nisu međusobno statistički značajno razlikovale. Najviši sadržaj prolina je utvrđen pri tretmanu s GYY4137 ( $0,834 \mu\text{M g}^{-1}$  sv.t.) te se statistički značajno razlikovao od sadržaja prolina utvrđenog pri ostalim tretmanima biljke na najvišoj razini solnog stresa.

F testom je utvrđen značajan utjecaj solnog stresa na sadržaj prolina u tkivu lista paprike, za sve primjenjene tretmane biljke ( $P \leq 0,0001$ ).

Prema LSD testu, kod biljaka netretiranih s donorima  $\text{H}_2\text{S}$  i  $\text{NO}$ , značajno najviši sadržaj prolina je utvrđen na  $200 \text{ mM NaCl}$  ( $0,675 \mu\text{M g}^{-1}$  sv.t.), dok se vrijednosti navedenog parametra utvrđene kod kontrole (bez solnog stresa;  $0,191 \mu\text{M g}^{-1}$  sv.t.) i na  $100 \text{ mM NaCl}$  ( $0,198 \mu\text{M g}^{-1}$  sv.t.), nisu značajno razlikovale. Pri tretmanima biljaka s NaHS i SNP sadržaj prolina u tkivu lista je proporcionalno pratio porast razine solnog stresa te su se sve utvrđene vrijednosti pri navedenim tretmanima biljke, statistički značajno razlikovale. Tako je najveći sadržaj prolina pri spomenutim tretmanima

utvrđen na 200 mM NaCl (NaHS: 0,381  $\mu\text{M g}^{-1}$  sv.t., SNP: 0,203  $\mu\text{M g}^{-1}$  sv.t.), a najniži kod kontrole (NaHS: 0,124  $\mu\text{M g}^{-1}$  sv.t., SNP: 0,146  $\mu\text{M g}^{-1}$  sv.t.). Pri tretmanima biljke s kombinacijom donora H<sub>2</sub>S i NO, najmanji sadržaj prolina je utvrđen kod kontrole (NaHS + SNP: 0,144  $\mu\text{M g}^{-1}$  sv.t., GYY4137 + SNP: 0,154  $\mu\text{M g}^{-1}$  sv.t.). Sadržaj spomenute aminokiseline, utvrđen na 100 mM NaCl (0,303  $\mu\text{M g}^{-1}$  sv.t.) i 200 mM NaCl (0,293  $\mu\text{M g}^{-1}$  sv.t.), pri tretmanu s NaHS + SNP, se nije statistički značajno razlikovao. Najveći sadržaj prolina pri tretmanu s GYY4137 + SNP je utvrđen na 100 mM NaCl (0,231  $\mu\text{M g}^{-1}$  sv.t.) te se značajno razlikovao od utvrđenih na ostalim razinama solnog stresa. Pri tretmanu biljke s GYY4137, značajno najviši sadržaj prolina je utvrđen na 200 mM NaCl (0,834  $\mu\text{M g}^{-1}$  sv.t.), a značajno najniži na 50 mM NaCl (0,129  $\mu\text{M g}^{-1}$  sv.t.).

Prema F testu, tretman biljke je značajno utjecao na koncentraciju vodikovog peroksida u tkivu lista paprike na svim razinama solnog stresa (kontrola i 50 mM NaCl  $P=0,0002$ , 100 mM i 200 mM NaCl  $P\leq 0,0001$ ; *Tablica 25*).

Kod kontrole (bez solnog stresa), najveća koncentracija vodik peroksida je utvrđena pri tretmanu s kombinacijom GYY4137 + SNP (5,354 nM  $\text{g}^{-1}$  sv.t.) te se, prema LSD testu, nije statistički značajno razlikovala od vrijednosti utvrđenih pri tretmanu s čistim GYY4137 (4,982 nM  $\text{g}^{-1}$  sv.t.) odnosno kombinacijom NaHS + SNP (5,166 nM  $\text{g}^{-1}$  sv.t.). Najmanja koncentracija navedenog spoja je utvrđena pri tretmanu biljke s NaHS (3,678 nM  $\text{g}^{-1}$  sv.t.) te se statistički značajno razlikovala od vrijednosti utvrđenih na svim ostalim tretmanima s donorima H<sub>2</sub>S odn. NO. Koncentracija vodik peroksida utvrđena pri tretmanu biljke s donatorom NO (4,735 nM  $\text{g}^{-1}$  sv.t.), se nije značajno razlikovala od utvrđene kod kontrole (4,339 nM  $\text{g}^{-1}$  sv.t.) te pri tretmanima s NaHS + SNP i GYY4137.

Na razini solnog stresa 50 mM NaCl, najviša koncentracija vodik peroksida je utvrđena pri tretmanu s GYY4137 (10,275 nM  $\text{g}^{-1}$  sv.t.) te je bila statistički značajno viša od vrijednosti utvrđenih pri ostalim tretmanima biljke na navedenoj razini stresa. Koncentracija vodik peroksida utvrđena kod kontrole (6,457 nM  $\text{g}^{-1}$  sv.t.) se nije značajno razlikovala od utvrđenih pri tretmanima s NaHS (6,646 nM  $\text{g}^{-1}$  sv.t.), SNP (5,572 nM  $\text{g}^{-1}$  sv.t.) te kombinaciji oba donora H<sub>2</sub>S s donatorom NO (NaHS + SNP: 6,929 nM  $\text{g}^{-1}$  sv.t., GYY4137 + SNP: 5,086 nM  $\text{g}^{-1}$  sv.t.).

**Tablica 25.** Značajnost utjecaja solnog stresa i tretmana biljke s donorima H<sub>2</sub>S i NO (200 μM SNP, 200 μM GYY4137, 200 μM NaHS), na koncentraciju vodikovog peroksida u listovima paprike.

TRETMANI BILJKE	VARIJANTA NaCl STRESA				F test
	Kontrola	50 mM	100 mM	200 mM	P
Kontrola	4,339 <sup>c,BC(W)</sup>	6,457 <sup>bc,B(Z)</sup>	9,101 <sup>A(Y)</sup>	14,056 <sup>a,A(X)</sup>	176,44 ≤0,0001
NaHS	3,678 <sup>d,C(z,Y)</sup>	6,646 <sup>bc,B(x,X)</sup>	4,975 <sup>C(yz,XY)</sup>	6,114 <sup>d,C(xy,X)</sup>	9,15 0,0058
GYY4137	4,982 <sup>ab,AB(Z)</sup>	10,275 <sup>a,A(X)</sup>	9,910 <sup>A(X)</sup>	7,404 <sup>d,C(Y)</sup>	59,27 ≤0,0001
SNP	4,735 <sup>bc,AB(z,Z)</sup>	5,572 <sup>bc,B(z,YZ)</sup>	7,604 <sup>B(y,Y)</sup>	9,896 <sup>c,B(x,X)</sup>	23,20 0,0003
NaHS + SNP	5,166 <sup>ab,A(W)</sup>	6,929 <sup>b,B(Z)</sup>	9,465 <sup>A(Y)</sup>	11,938 <sup>b,B(X)</sup>	105,43 ≤0,0001
GYY4137 + SNP	5,345 <sup>a,A(Y)</sup>	5,086 <sup>c,B(Y)</sup>	5,940 <sup>C(Y)</sup>	10,084 <sup>c,B(X)</sup>	19,89 0,0005
F test	12,54	12,32	34,20	36,15	
P	0,0002	0,0002	≤0,0001	≤0,0001	

nM g<sup>-1</sup> sv.t.; podaci su prosjek tri ponavljanja; ANOVA, F test; razlike između tretmana biljke za istu varijantu stresa, označene različitim slovom, su značajne prema LSD testu (<sup>a,b,c</sup> P=0,05; <sup>A,B,C</sup> P=0,01); razlike između varijante stresa u istom tretmanu biljke označene različitim slovom, su značajne prema LSD testu (<sup>x,y,z</sup> P=0,05; <sup>X,Y,Z</sup> P=0,01).

Na razini solnog stresa 100 mM NaCl, povećane koncentracije vodikovog peroksida utvrđene su kod kontrole (9,101 nM g<sup>-1</sup> sv.t.) te pri tretmanima s GYY4137 (9,910 nM g<sup>-1</sup> sv.t.) i NaHS + SNP (9,465 nM g<sup>-1</sup> sv.t.) te se ove vrijednosti nisu međusobno značajno razlikovale. Koncentracije navedenog spoja utvrđene pri tretmanima biljke s NaHS (4,975 nM g<sup>-1</sup> sv.t.) i GYY4137 + SNP (5,940 nM g<sup>-1</sup> sv.t.), se također nisu međusobno značajno razlikovale.

Kod netretiranih biljaka na 200 mM NaCl, utvrđena je najveća koncentracija vodik peroksida u tkivu lista (14,056 nM g<sup>-1</sup> sv.t.) te se statistički značajno razlikovala od koncentracija utvrđenih pri svim ostalim varijantama tretmana biljke na istoj razini solnog stresa. Pri tretmanima biljke s donorima H<sub>2</sub>S su utvrđene značajno niže koncentracije vodik peroksida (NaHS: 6,114 nM g<sup>-1</sup> sv.t., GYY4137: 7,404 nM g<sup>-1</sup> sv.t.), koje se međusobno nisu statistički značajno razlikovale. Koncentracije vodikovog peroksida utvrđene pri tretmanima s SNP (9,896 nM g<sup>-1</sup> sv.t.) i GYY4137 + SNP (10,084 nM g<sup>-1</sup> sv.t.), se nisu međusobno značajno razlikovale.



F testom je utvrđen značajan utjecaj solnog stresa na koncentraciju vodik peroksida za sve primjenjene tretmane biljke (kontrola, GYY4137 i NaHS + SNP  $P \leq 0,0001$ , NaHS  $P=0,0058$ , SNP  $P=0,0003$ , GYY4137 + SNP  $P=0,0005$ ).

Kod netretiranih biljaka te pri tretmanu s kombinacijom NaHS + SNP, porast koncentracije vodikovog peroksida proporcionalno je pratio porast razine solnoga stresa. Tako su najviše značajne vrijednosti koncentracije vodikovog peroksida pri navedenim tretmanima utvrđene na 200 mM NaCl (kontrola:  $14,056 \text{ nM g}^{-1} \text{ sv.t.}$ , NaHS + SNP:  $11,938 \text{ nM g}^{-1} \text{ sv.t.}$ ), dok su najniže vrijednosti utvrđene na varijanti bez solnog stresa (kontrola:  $4,339 \text{ nM g}^{-1} \text{ sv.t.}$ , NaHS + SNP:  $5,166 \text{ nM g}^{-1} \text{ sv.t.}$ ). Pri tretmanu s NaHS, najniža koncentracija vodik peroksida je utvrđena kod kontrole ( $3,678 \text{ nM g}^{-1} \text{ sv.t.}$ ) te se nije statistički značajno razlikovala od vrijednosti utvrđene na 100 mM NaCl ( $4,975 \text{ nM g}^{-1} \text{ sv.t.}$ ). Pri spomenutom tretmanu biljke, koncentracija vodikovog peroksida utvrđena na 200 mM NaCl ( $6,114 \text{ nM g}^{-1} \text{ sv.t.}$ ), nije se značajno razlikovala od utvrđene na 50 mM NaCl ( $6,646 \text{ nM g}^{-1} \text{ sv.t.}$ ) i 100 mM NaCl. Pri tretmanu s GYY4137, povišene koncentracije vodik peroksida su utvrđena na 50 mM ( $10,275 \text{ nM g}^{-1} \text{ sv.t.}$ ) i 100 mM NaCl ( $9,910 \text{ nM g}^{-1} \text{ sv.t.}$ ) te se nisu međusobno značajno razlikovale. Značajno najmanja koncentracija vodik peroksida pri navedenom tretmanu biljke je utvrđena kod kontrole ( $4,982 \text{ nM g}^{-1} \text{ sv.t.}$ ). Pri tretmanu biljaka s donatorom NO (SNP) kod kontrole ( $4,735 \text{ nM g}^{-1} \text{ sv.t.}$ ) i na 50 mM NaCl ( $5,572 \text{ nM g}^{-1} \text{ sv.t.}$ ) su utvrđene niže koncentracije vodik peroksida koje se međusobno nisu značajno razlikovale, dok je značajno najviša koncentracija ovog spoja utvrđena na 200 mM NaCl ( $9,896 \text{ nM g}^{-1} \text{ sv.t.}$ ). Pri tretmanu biljaka s kombinacijom GYY4137 + SNP, značajni porast koncentracije peroksida je utvrđen tek na 200 mM NaCl ( $10,084 \text{ nM g}^{-1} \text{ sv.t.}$ ), dok se vrijednosti utvrđene kod kontrole ( $5,345 \text{ nM g}^{-1} \text{ sv.t.}$ ) te na 50 mM NaCl ( $5,086 \text{ nM g}^{-1} \text{ sv.t.}$ ) i 100 mM NaCl ( $5,940 \text{ nM g}^{-1} \text{ sv.t.}$ ), nisu međusobno značajno razlikovale.

Prema F testu, tretman biljke je značajno utjecao na ukupnu aktivnost katalaze u tkivu lista paprike, na razinama solnog stresa: 50 mM NaCl ( $P=0,0479$ ), i 200 mM NaCl ( $P=0,0154$ ), dok kod kontrole (biljke koje nisu tretirane donatorima  $\text{H}_2\text{S}$  i NO) i na 100 mM NaCl, nije utvrđen značajan utjecaj (Tablica 26).

**Tablica 26.** Značajnost utjecaja solnog stresa i tretmana biljke s donorima H<sub>2</sub>S i NO (200 μM SNP, 200 μM GYY4137, 200 μM NaHS), na ukupnu aktivnost enzima katalaze u listovima paprike.

TRETMANI BILJKE	VARIJANTA NaCl STRESA				F test
	Kontrola	50 mM	100 mM	200 mM	P
Kontrola	16,204 <sup>(z,Y)</sup>	24,193 <sup>a,AB(y,XY)</sup>	30,517 <sup>(x,X)</sup>	30,417 <sup>ab,A(x,X)</sup>	14,66 0,0013
NaHS	18,325 <sup>(y,Y)</sup>	25,699 <sup>a,AB(xy,XY)</sup>	31,281 <sup>(x,XY)</sup>	32,027 <sup>a,A(x,X)</sup>	5,37 0,0255
GYY4137	26,599 <sup>(xy,XY)</sup>	14,196 <sup>b,B(z,Y)</sup>	30,582 <sup>(x,X)</sup>	19,649 <sup>c,AB(yz,XY)</sup>	4,99 0,0308
SNP	22,495	23,931 <sup>a,AB</sup>	26,536	16,515 <sup>c,B</sup>	3,45 0,0717
NaHS + SNP	18,703	29,265 <sup>a,A</sup>	27,129	19,364 <sup>c,AB</sup>	2,36 0,1473
GYY4137 + SNP	18,550	28,891 <sup>a,A</sup>	30,031	22,429 <sup>bc,AB</sup>	3,32 0,0776
F test	2,05	3,15	0,64	4,49	
P	0,1436	0,0479	0,6772	0,0154	

ΔA min<sup>-1</sup>g<sup>-1</sup> sv.t.; podaci su prosjek tri ponavljanja; ANOVA, F test; razlike između tretmana biljke za istu varijantu stresa, označene različitim slovom, su značajne prema LSD testu (<sup>a,b,c</sup>P=0,05; <sup>A,B,C</sup>P=0,01); razlike između varijante stresa u istom tretmanu biljke označene različitim slovom, su značajne prema LSD testu (<sup>x,y,z</sup>P=0,05; <sup>X,Y,Z</sup>P=0,01).

Na razini solnog stresa 50 mM NaCl, najniža ukupna aktivnost katalaze je utvrđena pri tretmanu s GYY4137 (14,196 ΔA min<sup>-1</sup>g<sup>-1</sup> sv.t.) te je bila statistički značajno niža od vrijednosti utvrđenih pri svim ostalim tretmanima biljke. Između kontrole i svih ostalih varijanata tretmana biljke s donorima H<sub>2</sub>S i NO, osim spomenutog GYY4137, nisu utvrđene značajne razlike u ukupnoj aktivnosti navedenog enzima.

Na 200 mM NaCl je utvrđena smanjena aktivnost spomenutog enzima u svim varijanata tretmana biljke s donorima H<sub>2</sub>S i NO, osim kod kontrole (30,417 ΔA min<sup>-1</sup>g<sup>-1</sup> sv.t.) i tretmana s čistim NaHS (32,027 ΔA min<sup>-1</sup>g<sup>-1</sup> sv.t.) te se utvrđene vrijednosti nisu međusobno značajno razlikovale. Ukupna aktivnost katalaze utvrđena kod kontrole, se nije značajno razlikovala od utvrđene pri tretmanu s kombinacijom GYY4137 + SNP (22,429 ΔA min<sup>-1</sup>g<sup>-1</sup> sv.t.).

F testom je utvrđen značajan utjecaj solnog stresa na ukupnu aktivnost katalaze kod netretiranih biljaka (P=0,0013) te kod tretmana s donorima H<sub>2</sub>S (NaHS P=0,0255, GYY4137 P = 0,0308).

Kod netretiranih biljaka, najmanja aktivnost katalaze je utvrđena kod kontrole (bez solnog stresa:  $16,204 \Delta A \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ sv.t.}$ ). Na 50 mM NaCl ukupna aktivnost katalaze je bila značajno viša ( $24,193 \Delta A \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ sv.t.}$ ), u odnosu na kontrolu i značajno niža u odnosu na aktivnost utvrđenu na 100 mM NaCl ( $30,517 \Delta A \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ sv.t.}$ ) i 200 mM NaCl ( $30,417 \Delta A \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ sv.t.}$ ) te se navedene vrijednosti nisu međusobno značajno razlikovale.

U varijanti tretmana s NaHS najniža aktivnost katalaze je utvrđena kod kontrole ( $18,325 \Delta A \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ sv.t.}$ ) te se nije značajno razlikovala od vrijednosti utvrđene na 50 mM NaCl ( $25,699 \Delta A \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ sv.t.}$ ). Na razinama solnog stresa 50 mM NaCl, 100 mM NaCl ( $31,281 \Delta A \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ sv.t.}$ ) i 200 mM NaCl ( $32,027 \Delta A \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ sv.t.}$ ), nisu utvrđene značajne međusobne razlike u aktivnosti spomenutog enzima kod biljaka tretiranih s NaHS.

Pri tretmanu s GYY4137 najniža aktivnost katalaze je utvrđena na 50 mM NaCl ( $14,196 \Delta A \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ sv.t.}$ ) te se nije značajno razlikovala od vrijednosti utvrđene pri 200 mM NaCl ( $19,649 \Delta A \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ sv.t.}$ ), koja se isto tako nije značajno razlikovala od kontrole ( $19,649 \Delta A \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ sv.t.}$ ). Najviša aktivnost katalaze je utvrđena na 100 mM NaCl ( $30,582 \Delta A \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ sv.t.}$ ) što se također nije značajno razlikovalo od aktivnosti katalaze utvrđene kod kontrole (bez solnog stresa).

Prema F testu, tretman biljke je značajno utjecao na specifičnu aktivnost katalaze u tkivu lista paprike, kod kontrole (bez solnog stresa;  $P=0,0294$ ) te na razini solnog stresa 100 mM NaCl ( $P=0,0116$ ), dok na razinama 50 mM i 200 mM NaCl, nije utvrđen značajan utjecaj (*Tablica 27*).

Kod kontrole, najveća specifična aktivnost enzima katalaze je utvrđena pri tretmanu s GYY4137 ( $4,566 \Delta A \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ prot.}$ ) te se nije statistički značajno razlikovala od aktivnosti utvrđene pri tretmanu s NaHS ( $3,808 \Delta A \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ prot.}$ ). Također nisu utvrđene statistički značajne razlike u aktivnosti spomenutog enzima između netretiranih biljaka te u varijantama tretmana s čistim donatorom NO i u kombinaciji s donorima H<sub>2</sub>S.

Na razini solnog stresa 100 mM NaCl, najniža specifična aktivnost katalaze je utvrđena pri tretmanu s čistim SNP ( $3,754 \Delta A \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ prot.}$ ) te se nije značajno razlikovala od aktivnosti utvrđene kod tretmana s donorima H<sub>2</sub>S (NaHS:  $4,300 \Delta A \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ prot.}$ ,

GY4137: 4,036  $\Delta A \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ prot.}$ ). Najviša specifična aktivnost katalaze (6,489  $\Delta A \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ prot.}$ ), je utvrđena u varijanti tretmana s kombinacijom GYY4137 + SNP te se nije statistički značajno razlikovala od aktivnosti utvrđenih kod kontrole (5,948  $\Delta A \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ prot.}$ ) i pri tretmanu s kombinacijom NaHS + SNP (5,555  $\Delta A \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ prot.}$ ).

**Tablica 27.** Značajnost utjecaja solnog stresa i tretmana biljke s donorima H<sub>2</sub>S i NO (200  $\mu\text{M}$  SNP, 200  $\mu\text{M}$  GYY4137, 200  $\mu\text{M}$  NaHS), na specifičnu aktivnost enzima katalaze u listovima paprike.

TRETMANI BILJKE	VARIJANTA NaCl STRESA				F test
	Kontrola	50 mM	100 mM	200 mM	P
Kontrola	2,456 <sup>bc,B(Y)</sup>	2,938 <sup>(Y)</sup>	5,948 <sup>a,AB(X)</sup>	5,147 <sup>(X)</sup>	46,50 ≤0,0001
NaHS	3,808 <sup>ab,AB(y,Y)</sup>	3,404 <sup>(y,Y)</sup>	4,300 <sup>bc,AB(y,XY)</sup>	6,230 <sup>(x,X)</sup>	8,14 0,0082
GY4137	4,566 <sup>a,A</sup>	2,320	4,036 <sup>bc,B</sup>	3,886	2,29 0,1555
SNP	3,023 <sup>bc,AB</sup>	3,098	3,754 <sup>c,B</sup>	3,850	0,63 0,6131
NaHS + SNP	2,770 <sup>bc,AB</sup>	3,343	5,555 <sup>ab,AB</sup>	3,962	3,64 0,637
GY4137 + SNP	2,215 <sup>c,B(z,Y)</sup>	3,793 <sup>(y,Y)</sup>	6,489 <sup>a,A(x,X)</sup>	3,975 <sup>(y,Y)</sup>	15,30 0,0011
F test	3,70	2,13	4,86	2,16	
P	0,0294	0,1312	0,0116	0,1272	

$\Delta A \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ prot.}$ ; podaci su prosjek tri ponavljanja; ANOVA, F test; razlike između tretmana biljke za istu varijantu stresa, označene različitim slovom, su značajne prema LSD testu (<sup>a,b,c</sup>  $P=0,05$ ; <sup>A,B,C</sup>  $P=0,01$ ); razlike između varijante stresa u istom tretmanu biljke označene različitim slovom, su značajne prema LSD testu (<sup>x,y,z</sup>  $P=0,05$ ; <sup>X,Y,Z</sup>  $P=0,01$ ).

F testom je utvrđen značajan utjecaj solnog stresa na specifičnu aktivnost katalaze kod netretiranih biljaka ( $P \leq 0,0001$ ) te kod tretmana s NaHS ( $P=0,0082$ ) i GYY4137 + SNP ( $P = 0,0011$ ).

Kod biljaka koje nisu tretirane donorima H<sub>2</sub>S i NO, specifična aktivnost katalaze utvrđena kod kontrole (bez solnog stresa; 2,456  $\Delta A \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ prot.}$ ) i na 50 mM NaCl (2,938  $\Delta A \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ prot.}$ ) se nisu značajno razlikovale, međutim utvrđene vrijednosti su bile značajno više od onih na 100 mM NaCl (5,948  $\Delta A \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ prot.}$ ) i 200 mM

NaCl ( $5,147 \Delta A \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ prot.}$ ), koje se također, nisu međusobno značajno razlikovale.

U varijanti tretmana s NaHS, najveća aktivnost spomenutog enzima ( $6,230 \Delta A \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ prot.}$ ) je utvrđena na najvišoj razini stresa te se značajno razlikovala od utvrđenih na svim ostalim razinama stresa. Pri tome, do razine stresa 100 mM NaCl nisu utvrđene značajne međusobne razlike u specifičnoj aktivnosti enzima katalaze.

Pri tretmanu biljke s kombinacijom GYY4137 + SNP, značajno najniža aktivnost katalaze je utvrđena kod kontrole ( $2,215 \Delta A \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ sv.t.}$ ), dok je značajno najviša aktivnost utvrđena na 100 mM NaCl ( $6,489 \Delta A \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ prot.}$ ). Aktivnosti enzima utvrđene na 50 mM NaCl ( $3,793 \Delta A \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ prot.}$ ) i 200 mM NaCl ( $3,975 \Delta A \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ prot.}$ ), se nisu međusobno značajno razlikovale.

Prema F testu, tretman biljke je značajno utjecao na ukupnu aktivnost gvajakol-peroksidaze u listu paprike, na svim razinama solnog stresa ( $P \leq 0,0001$ ; *Tablica 28*).

U varijanti bez solnog stresa (kontrola), značajno viša aktivnost ovog enzima je utvrđena pri tretmanima s oba donora H<sub>2</sub>S (NaHS:  $5,812 \Delta A \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ sv.t.}$ , GYY4137:  $5,396 \Delta A \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ sv.t.}$ ) te su se ove vrijednosti i međusobno statistički značajno razlikovale. Najniža aktivnost gvajakol-peroksidaze ( $1,546 \Delta A \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ sv.t.}$ ), je utvrđena u varijanti tretmana biljke s NaHS + SNP te se značajno razlikovala od vrijednosti utvrđenih pri svim ostalim tretmanima. Ukupna aktivnost enzima gvajakol-peroksidaze utvrđena pri tretmanu s kombinacijom GYY4137 + SNP ( $3,139 \Delta A \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ sv.t.}$ ), se nije statistički značajno razlikovala od kontrole (biljke koje nisu tretirane donorima H<sub>2</sub>S i NO).

Na razini solnog stresa 50 mM NaCl, najviša ukupna aktivnost spomenutog enzima je utvrđena kod kontrole ( $4,307 \Delta A \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ sv.t.}$ ) te se značajno razlikovala od vrijednosti utvrđenih pri ostalim tretmanima biljke. Pri varijantama tretmana biljke s NaHS ( $2,928 \Delta A \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ sv.t.}$ ), SNP ( $3,082 \Delta A \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ sv.t.}$ ) te kombinacijama oba donora H<sub>2</sub>S s donorom NO, (NaHS + SNP:  $2,890 \Delta A \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ sv.t.}$ , GYY4137 + SNP:  $3,114 \Delta A \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ sv.t.}$ ), nisu utvrđene značajne međusobne razlike u ukupnoj aktivnosti gvajakol-peroksidaze. Aktivnost navedenog enzima utvrđena pri tretmanu s čistim GYY4137 ( $3,343 \Delta A \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ sv.t.}$ ) je bila značajno viša od utvrđene pri tretmanu s NaHS, ali se nije značajno razlikovala od vrijednosti utvrđenih u varijantama tretmana biljke s čistim

SNP te u kombinaciji navedenog donora NO sa GYY4137, u varijanti pokusa s 50 mM NaCl.

**Tablica 28.** Značajnost utjecaja solnog stresa i tretmana biljke s donorima H<sub>2</sub>S i NO (200 μM SNP, 200 μM GYY4137, 200 μM NaHS), na ukupnu aktivnost enzima gvajakol-peroksidaze u listovima paprike.

TRETMANI BILJKE	VARIJANTA NaCl STRESA				F test
	Kontrola	50 mM	100 mM	200 mM	P
Kontrola	3,205 <sup>c,C(W)</sup>	4,307 <sup>A(Z)</sup>	5,637 <sup>b,B(Y)</sup>	7,249 <sup>A(X)</sup>	291,49 ≤0,0001
NaHS	5,812 <sup>a,A(z,Y)</sup>	2,928 <sup>C(w,Z)</sup>	6,260 <sup>a,A(y,Y)</sup>	6,877 <sup>B(x,X)</sup>	264,19 ≤0,0001
GYY4137	5,396 <sup>b,B(Y)</sup>	3,343 <sup>B(W)</sup>	4,785 <sup>c,C(Z)</sup>	6,668 <sup>B(X)</sup>	232,05 ≤0,0001
SNP	2,795 <sup>d,D(w,Z)</sup>	3,082 <sup>BC(z,YZ)</sup>	3,650 <sup>f,D(x,X)</sup>	3,342 <sup>E(y,Y)</sup>	33,02 ≤0,0001
NaHS + SNP	1,546 <sup>e,E(Z)</sup>	2,890 <sup>C(Y)</sup>	4,503 <sup>d,C(X)</sup>	4,647 <sup>C(X)</sup>	432,68 ≤0,0001
GYY4137 + SNP	3,139 <sup>c,DC(Y)</sup>	3,114 <sup>BC(Y)</sup>	3,967 <sup>e,D(X)</sup>	4,091 <sup>D(X)</sup>	73,50 ≤0,0001
F test	384,88	35,56	150,70	401,85	
P	≤0,0001	≤0,0001	≤0,0001	≤0,0001	

ΔA min<sup>-1</sup>g<sup>-1</sup> sv.t.; podaci su prosjek tri ponavljanja; ANOVA, F test; razlike između tretmana biljke za istu varijantu stresa, označene različitim slovom, su značajne prema LSD testu (<sup>a,b,c</sup> P=0,05; <sup>A,B,C</sup> P=0,01); razlike između varijante stresa u istom tretmanu biljke označene različitim slovom, su značajne prema LSD testu (<sup>x,y,z</sup> P=0,05; <sup>X,Y,Z</sup> P=0,01).

Na razini solnog stresa 100 mM NaCl, utvrđene su značajne razlike u aktivnost gvajakol-peroksidaze u svim varijantama tretmana biljke. Tako je najveća ukupna aktivnost ovog enzima izmjerena pri tretmanu s NaHS (6,260 ΔA min<sup>-1</sup>g<sup>-1</sup> sv.t.), dok je najniža utvrđena pri tretmanu s čistim SNP (3,650 ΔA min<sup>-1</sup>g<sup>-1</sup> sv.t.). Ukupna aktivnost gvajakol-peroksidaze pri svim varijantama tretmana biljke, osim pri tretmanu s NaHS, je bila niža od utvrđene kod kontrole (5,637 ΔA min<sup>-1</sup>g<sup>-1</sup> sv.t.).

Najveća ukupna aktivnost spomenutog enzima na 200 mM NaCl, utvrđena je kod netretiranih biljaka (7,249 ΔA min<sup>-1</sup>g<sup>-1</sup> sv.t.) te se značajno razlikovala od vrijednosti utvrđenih pri svim ostalim tretmanima. U varijantama tretmana biljke s donorima H<sub>2</sub>S, ukupna aktivnost gvajakol-peroksidaze je bila značajno viša nego u ostalim varijantama (NaHS: 6,877 ΔA min<sup>-1</sup>g<sup>-1</sup> sv.t., GYY4137: 6,668 ΔA min<sup>-1</sup>g<sup>-1</sup> sv.t.), no ove dvije

vrijednosti se nisu međusobno značajno razlikovale. Kao i na prethodnoj razini stresa, značajno najniža aktivnost gvajakol-peroksidaze je utvrđena pri tretmanu s čistim donorom NO (SNP: 3,342  $\Delta A \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1}$  sv.t.).

F testom je utvrđen značajan utjecaj solnog stresa na ukupnu aktivnost gvajakol-peroksidaze kod svih primjenjenih tretmana biljke ( $P \leq 0,0001$ ).

Kod netretiranih biljaka porast aktivnosti gvajakol-peroksidaze je proporcionalno pratio porast solnog stresa te je najveća aktivnost utvrđena na 200 mM NaCl (7,249  $\Delta A \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1}$  sv.t.), a značajno najmanja kod kontrole (3,2048  $\Delta A \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1}$  sv.t.). Pri tretmanima biljke s NaHS, GYY4137 i SNP, ukupna aktivnost navedenog enzima se statistički značajno razlikovala na svima razinama solnog stresa. Tako je najniža aktivnost u varijantama tretmana s donorima H<sub>2</sub>S, utvrđena na 50 mM NaCl (NaHS: 2,928  $\Delta A \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1}$  sv.t., GYY4137: 3,343  $\Delta A \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1}$  sv.t.), a u varijanti tretmana s donorom NO kod kontrole (2,795  $\Delta A \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1}$  sv.t.). Pri tretmanima biljaka s donorima H<sub>2</sub>S, najviša ukupna aktivnost gvajakol-peroksidaze je utvrđena na najvišoj razini solnog stresa (NaHS: 6,877  $\Delta A \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1}$  sv.t., GYY4137: 6,668  $\Delta A \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1}$  sv.t.), dok pri tretmanu s donorom NO na 100 mM NaCl (3,650  $\Delta A \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1}$  sv.t.). U varijanti tretmana biljke s kombinacijom NaHS + SNP, porast aktivnosti gvajakol-peroksidaze proporcionalno je pratio porast razine solnog stresa, s time da se utvrđene vrijednosti na 100 mM (4,503  $\Delta A \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1}$  sv.t.) i 200 mM NaCl (4,647  $\Delta A \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1}$  sv.t.), nisu statistički značajno razlikovale. Pri tretmanu s kombinacijom GYY4137 + SNP, ukupna aktivnost gvajakol-peroksidaze utvrđena kod kontrole (3,139  $\Delta A \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1}$  sv.t.) i na 50 mM NaCl (3,114  $\Delta A \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1}$  sv.t.), se nije međusobno značajno razlikovala, međutim ove vrijednosti su bile značajno više od utvrđenih na 100 mM NaCl (3,967  $\Delta A \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1}$  sv.t.) i 200 mM NaCl (4,091  $\Delta A \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1}$  sv.t.), koje se također nisu međusobno značajno razlikovale.

Prema F testu, tretman biljke donorima H<sub>2</sub>S i NO je značajno utjecao na specifičnu aktivnost gvajakol-peroksidaze u listu paprike, kod kontrole ( $P=0,0002$ ) te na razinama solnog stresa, 100 mM NaCl ( $P=0,0173$ ) i 200 mM NaCl ( $P \leq 0,0001$ ; *Tablica 29*).

Prema LSD testu, najviša vrijednost specifične aktivnosti gvajakol-peroksidaze kod kontrole (bez solnog stresa), utvrđena je pri tretmanu s NaHS (2,302  $\Delta A \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$

prot.) te se statistički značajno razlikovala od vrijednosti utvrđenih pri ostalim tretmanima biljke, koje se nisu međusobno značajno razlikovale.

**Tablica 29.** Značajnost utjecaja solnog stresa i tretmana biljke s donorima H<sub>2</sub>S i NO (200 μM SNP, 200 μM GYY4137, 200 μM NaHS), na specifičnu aktivnost enzima gvajakol-peroksidaze u listovima paprike.

TRETMANI BILJKE	VARIJANTA NaCl STRESA				F test P
	Kontrola	50 mM	100 mM	200 mM	
Kontrola	0,662 <sup>B(y,Y)</sup>	0,660 <sup>(y,Y)</sup>	0,907 <sup>ab,AB(y,XY)</sup>	1,208 <sup>a,A(x,X)</sup>	11,20 0,0031
NaHS	2,302 <sup>A(x,X)</sup>	0,614 <sup>(y,Y)</sup>	1,201 <sup>a,A(y,XY)</sup>	0,943 <sup>b,B(y,Y)</sup>	7,95 0,0088
GYY4137	0,934 <sup>B</sup>	0,714	0,777 <sup>b,AB</sup>	0,771 <sup>c,BC</sup>	2,20 0,1653
SNP	0,664 <sup>B</sup>	0,603	0,617 <sup>b,B</sup>	0,533 <sup>d,D</sup>	1,26 0,3527
NaHS + SNP	0,423 <sup>B(z,Y)</sup>	0,475 <sup>(vz,Y)</sup>	0,600 <sup>b,B(y,XY)</sup>	0,771 <sup>c,BC(x,X)</sup>	11,09 0,0032
GYY4137 + SNP	0,631 <sup>B</sup>	0,658	0,652 <sup>b,B</sup>	0,658 <sup>cd,CD</sup>	0,03 0,9942
F test	12,53	1,06	4,34	21,60	
P	0,0002	0,4294	0,0173	≤0,0001	

$\Delta A \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  prot.; podaci su prosjek tri ponavljanja; ANOVA, F test; razlike između tretmana biljke za istu varijantu stresa, označene različitim slovom, su značajne prema LSD testu (<sup>a,b,c</sup>  $P=0,05$ ; <sup>A,B,C</sup>  $P=0,01$ ); razlike između varijante stresa u istom tretmanu biljke označene različitim slovom, su značajne prema LSD testu (<sup>x,y,z</sup>  $P=0,05$ ; <sup>X,Y,Z</sup>  $P=0,01$ ).

Na razini solnog stresa 100 mM NaCl, najviša aktivnost gvajakol-peroksidaze je utvrđena također pri tretmanu s NaHS (1,201  $\Delta A \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  prot.) te se nije značajno razlikovala od utvrđene kod netretiranih biljaka (0,907  $\Delta A \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  prot.). Između kontrole i svih ostalih varijanti tretmana biljke, nisu utvrđene značajne međusobne razlike u specifičnoj aktivnosti gvajakol-peroksidaze na ovoj razini solnog stresa.

Na 200 mM NaCl, značajno najviša aktivnost spomenutog enzima je utvrđena kod netretiranih biljaka (1,208  $\Delta A \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  prot.). Najniža specifična aktivnost ovog enzima je utvrđena pri tretmanu s čistim donatorom NO (0,533  $\Delta A \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  prot.) te se nije značajno razlikovala od utvrđene pri tretmanu s kombinacijom GYY4137 + SNP (0,658  $\Delta A \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  prot.), koja se nije značajno razlikovala od aktivnosti enzima



utvrđene pri tretmanima biljaka s čistim GYY4137 ( $0,771 \Delta A \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ prot.}$ ) i s kombinacijom NaHS + SNP ( $0,771 \Delta A \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ prot.}$ ).

F testom je utvrđen značajan utjecaj solnog stresa na specifičnu aktivnost gvajakol-peroksidaze u listu paprike, kod netretiranih biljaka ( $P=0,0031$ ) te pri tretmanima s NaHS ( $P=0,0088$ ) i pri kombinaciji navedenog spoja s donorom NO ( $P=0,0032$ ).

Kod netretiranih biljaka najveća aktivnost spomenutog enzima ( $1,208 \Delta A \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ prot.}$ ) je utvrđena na najvišoj razini solnog stresa te se značajno razlikovala od aktivnosti utvrđenih na svim ostalim razinama stresa. Pri tome, do razine solnog stresa od 100 mM NaCl nisu utvrđene značajne međusobne razlike u specifičnoj aktivnosti enzima gvajakol-peroksidaze.

U varijanti tretmana s NaHS najveća specifična aktivnost spomenutog enzima je utvrđena kod kontrole (bez solnog stresa;  $2,302 \Delta A \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ prot.}$ ) te se statistički značajno razlikovala od vrijednosti utvrđenih pri svim ostalim tretmanima, između kojih nije bilo statistički značajnih razlika.

Pri tretmanu s kombinacijom NaHS + SNP najniža specifična aktivnost gvajakol-peroksidaze je utvrđena kod kontrole ( $0,423 \Delta A \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ prot.}$ ) te se nije značajno razlikovala od utvrđene na 50 mM NaCl ( $0,475 \Delta A \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ prot.}$ ), koja se također nije značajno razlikovala od aktivnosti utvrđene na 100 mM NaCl ( $0,600 \Delta A \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ prot.}$ ). Značajno najviša aktivnost navedenog enzima u navedenoj varijanti tretmana je utvrđena na 200 mM NaCl ( $0,771 \Delta A \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ prot.}$ ).

Prema F testu, tretman biljke donorima  $\text{H}_2\text{S}$  i NO je značajno utjecao na ukupnu aktivnost glutation-reduktaze u listu paprike, na svim razinama solnog stresa (kontrola, 100 mM i 200 mM NaCl  $P \leq 0,0001$ , 50 mM NaCl  $P=0,0107$ ; *Tablica 30*).

Prema LSD testu, najviša vrijednost ukupne aktivnosti glutation-reduktaze kod kontrole (bez solnog stresa) je utvrđena pri tretmanu s GYY4137 ( $3,954 \Delta A \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ sv.t.}$ ) te se nije značajno razlikovala od utvrđene u varijanti tretmana biljke s kombinacijom NaHS + SNP ( $3,858 \Delta A \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ sv.t.}$ ). Ukupna aktivnost navedenog enzima utvrđena pri tretmanu s kombinacijom GYY4137 + SNP ( $3,394 \Delta A \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ sv.t.}$ ) se nije značajno razlikovala od aktivnosti utvrđene pri tretmanu s čistim NaHS ( $3,202 \Delta A \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ sv.t.}$ ). Utvrđene ukupne aktivnosti glutation-reduktaze pri tretmanima s kombinacijom donora

H<sub>2</sub>S i NO (NaHS + SNP: 3,858 ΔA min<sup>-1</sup>g<sup>-1</sup> sv.t., GYY4137 + SNP: 3,394 ΔA min<sup>-1</sup>g<sup>-1</sup> sv.t.), također se nisu međusobno značajno razlikovale. Najmanja aktivnost glutation-reduktaze je utvrđena pri tretmanu biljke s čistim donorom NO (2,091 ΔA min<sup>-1</sup>g<sup>-1</sup> sv.t.) te se značajno razlikovala od vrijednosti utvrđenih pri svim ostalim tretmanima.

**Tablica 30.** Značajnost utjecaja solnog stresa i tretmana biljke s donorima H<sub>2</sub>S i NO (200 μM SNP, 200 μM GYY4137, 200 μM NaHS), na ukupnu aktivnost enzima glutation-reduktaze u listovima paprike.

TRETMANI BILJKE	VARIJANTA NaCl STRESA				F test
	Kontrola	50 mM	100 mM	200 mM	P
Kontrola	2,622 <sup>d,DC(z,Z)</sup>	3,825 <sup>abc,AB(y,Y)</sup>	4,620 <sup>A(x,X)</sup>	4,322 <sup>B(x,XY)</sup>	67,21 ≤0,0001
NaHS	3,202 <sup>c,BC(z,Y)</sup>	3,697 <sup>bc,AB(y,Y)</sup>	4,435 <sup>A(x,X)</sup>	4,878 <sup>A(x,X)</sup>	25,08 0,0002
GYY4137	3,954 <sup>a,A(XY)</sup>	3,347 <sup>c,B(Y)</sup>	3,544 <sup>B(Y)</sup>	4,618 <sup>AB(X)</sup>	7,60 0,0100
SNP	2,091 <sup>e,D(z)</sup>	4,236 <sup>ab,A(X)</sup>	3,127 <sup>BC(Y)</sup>	2,988 <sup>C(Y)</sup>	27,45 ≤0,0001
NaHS + SNP	3,858 <sup>ab,AB(x,XY)</sup>	4,316 <sup>a,A(x,X)</sup>	2,723 <sup>C(y,Z)</sup>	3,015 <sup>C(y,YZ)</sup>	16,32 0,0009
GYY4137 + SNP	3,394 <sup>bc,AB(y,Y)</sup>	3,362 <sup>c,B(y,Y)</sup>	4,511 <sup>A(x,X)</sup>	2,778 <sup>C(z,Y)</sup>	16,60 0,0009
F test	18,50	4,98	18,21	64,51	
P	≤0,0001	0,0107	≤0,0001	≤0,0001	

ΔA min<sup>-1</sup>g<sup>-1</sup> sv.t.; podaci su prosjek tri ponavljanja; ANOVA, F test; razlike između tretmana biljke za istu varijantu stresa, označene različitim slovom, su značajne prema LSD testu (<sup>a,b,c</sup> P=0,05; <sup>A,B,C</sup> P=0,01); razlike između varijante stresa u istom tretmanu biljke označene različitim slovom, su značajne prema LSD testu (<sup>x,y,z</sup> P=0,05; <sup>X,Y,Z</sup> P=0,01).

Na razini solnog stresa 50 mM NaCl najmanja aktivnost enzima utvrđena pri tretmanu s GYY4137 (3,347 ΔA min<sup>-1</sup>g<sup>-1</sup> sv.t.), nije se značajno razlikovala od utvrđenih pri tretmanu biljaka s kombinacijom navedenog spoja i donora NO (3,362 ΔA min<sup>-1</sup>g<sup>-1</sup> sv.t.), s čistim NaHS (3,697 ΔA min<sup>-1</sup>g<sup>-1</sup> sv.t.) te kod kontrole (3,825 ΔA min<sup>-1</sup>g<sup>-1</sup> sv.t.). Ukupna aktivnost glutation-reduktaze utvrđena pri tretmanu s kombinacijom NaHS + SNP (4,316 ΔA min<sup>-1</sup>g<sup>-1</sup> sv.t.), nije se značajno razlikovala od utvrđene pri tretmanu s čistim donorom NO (4,236 ΔA min<sup>-1</sup>g<sup>-1</sup> sv.t.) odnosno kod kontrole (3,825 ΔA min<sup>-1</sup>g<sup>-1</sup> sv.t.) na istoj razini solnog stresa.

U varijanti pokusa sa 100 mM NaCl, najniža aktivnost glutation-reduktaze je utvrđena pri tretmanu s kombinacijom NaHS + SNP (2,723  $\Delta A \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1}$  sv.t.) te se nije statistički značajno razlikovala od utvrđene pri tretmanu s čistim donatorom NO (3,127  $\Delta A \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1}$  sv.t.). Na navedenoj razini stresa nisu utvrđene značajne međusobne razlike u ukupnoj aktivnosti glutation-reduktaze između kontrole (4,620  $\Delta A \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1}$  sv.t.), u varijanti tretmana biljke s NaHS (4,435  $\Delta A \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1}$  sv.t.) te pri kombinaciji GYY4137 + SNP (4,511  $\Delta A \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1}$  sv.t.). Ukupna aktivnost glutation-reduktaze utvrđena pri tretmanima s GYY4137 (3,544  $\Delta A \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1}$  sv.t.) i SNP (3,127  $\Delta A \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1}$  sv.t.) se također nije međusobno značajno razlikovala.

Na 200 mM NaCl, najviša aktivnost spomenutog enzima je utvrđena u varijanti tretmana s čistim NaHS (4,878  $\Delta A \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1}$  sv.t.) te se nije značajno razlikovala od vrijednosti utvrđene pri tretmanu s GYY4137 (4,618  $\Delta A \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1}$  sv.t.), koja se također nije značajno razlikovala od kontrole (4,322  $\Delta A \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1}$  sv.t.). Niže vrijednosti ukupne aktivnosti glutation-reduktaze utvrđene pri tretmanu s čistim donatorom NO (2,988  $\Delta A \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1}$  sv.t.) te pri kombinacijama navedenog spoja s donatorima H<sub>2</sub>S (NaHS + SNP: 3,015  $\Delta A \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1}$  sv.t., GYY4137 + SNP: 2,778  $\Delta A \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1}$  sv.t.), se nisu međusobno značajno razlikovale.

F testom je utvrđen značajan utjecaj solnog stresa na ukupnu aktivnost glutation-reduktaze u listu paprike, pri svim varijantama tretmana biljke s donatorima H<sub>2</sub>S odnosno NO (kontrola i SNP  $P \leq 0,0001$ , NaHS + SNP i GYY4137 + SNP  $P = 0,0009$ , NaHS  $P = 0,0002$ , GYY4137  $P = 0,01000$ ).

Kod netretiranih biljaka i pri tretmanu s NaHS najmanja aktivnost spomenutog enzima (kontrola: 2,622  $\Delta A \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1}$  sv.t., NaHS: 3,202  $\Delta A \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1}$  sv.t.), je utvrđena u varijanti bez solnog stresa te se značajno razlikovala od vrijednosti utvrđenih na svim primjenjenim razinama stresa. U navedenim varijantama tretmana s donatorima H<sub>2</sub>S i NO, između razina solnog stresa 100 mM (kontrola: 4,620  $\Delta A \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1}$  sv.t., NaHS: 4,435  $\Delta A \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1}$  sv.t.) i 200 mM NaCl (kontrola: 4,322  $\Delta A \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1}$  sv.t., NaHS: 4,878  $\Delta A \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1}$  sv.t.), nisu utvrđene značajne statističke razlike u ukupnoj aktivnosti glutation-reduktaze. Aktivnosti spomenutog enzima utvrđene na 50 mM NaCl su bile značajno više (kontrola: 3,825  $\Delta A \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1}$  sv.t., NaHS: 3,697  $\Delta A \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1}$  sv.t.) od

utvrđenih kod kontrole, a ujedno i značajno niže od vrijednosti utvrđenih na višim razinama stresa.

U varijanti tretmana s GYY4137 najveća ukupna aktivnost glutathion-reduktaze je utvrđena na 200 mM NaCl (4,618  $\Delta A \text{ min}^{-1} \text{g}^{-1} \text{ sv.t.}$ ) te se nije značajno razlikovala od utvrđene kod kontrole (3,954  $\Delta A \text{ min}^{-1} \text{g}^{-1} \text{ sv.t.}$ ). Ukupna aktivnost spomenutog enzima u biljkama bez stresa te pri 50 mM NaCl (3,347  $\Delta A \text{ min}^{-1} \text{g}^{-1} \text{ sv.t.}$ ) i 100 mM NaCl (3,544  $\Delta A \text{ min}^{-1} \text{g}^{-1} \text{ sv.t.}$ ) se također nije statistički značajno razlikovala.

Pri tretmanu s donatorom NO (SNP), značajno najniža aktivnost glutathion-reduktaze je utvrđena kod kontrole (2,091  $\Delta A \text{ min}^{-1} \text{g}^{-1} \text{ sv.t.}$ ), dok je značajno najviša aktivnost spomenutog enzima utvrđena na 50 mM NaCl (4,236  $\Delta A \text{ min}^{-1} \text{g}^{-1} \text{ sv.t.}$ ). Pri navedenoj varijanti tretmana, ukupna aktivnosti glutathion-reduktaze utvrđene na 100 mM NaCl (3,127  $\Delta A \text{ min}^{-1} \text{g}^{-1} \text{ sv.t.}$ ) i 200 mM NaCl (2,988  $\Delta A \text{ min}^{-1} \text{g}^{-1} \text{ sv.t.}$ ) se nisu međusobno značajno razlikovale.

Pri tretmanu s kombinacijom NaHS + SNP ukupna aktivnost spomenutog enzima utvrđena kod kontrole (3,858  $\Delta A \text{ min}^{-1} \text{g}^{-1} \text{ sv.t.}$ ) i na 50 mM NaCl (4,316  $\Delta A \text{ min}^{-1} \text{g}^{-1} \text{ sv.t.}$ ) se nije međusobno značajno razlikovala te su obje vrijednosti bile značajno više od utvrđenih na 100 mM NaCl (2,723  $\Delta A \text{ min}^{-1} \text{g}^{-1} \text{ sv.t.}$ ) i 200 mM NaCl (3,015  $\Delta A \text{ min}^{-1} \text{g}^{-1} \text{ sv.t.}$ ), između kojih također nisu utvrđene značajne razlike.

U varijanti tretmana s kombinacijom GYY4137 + SNP značajno najviša aktivnost glutathion-reduktaze je utvrđena na 100 mM NaCl (4,511  $\Delta A \text{ min}^{-1} \text{g}^{-1} \text{ sv.t.}$ ), dok je značajno najniža aktivnost utvrđena na 200 mM NaCl (2,778  $\Delta A \text{ min}^{-1} \text{g}^{-1} \text{ sv.t.}$ ). Između kontrole (3,394  $\Delta A \text{ min}^{-1} \text{g}^{-1} \text{ sv.t.}$ ) i 50 mM NaCl (3,362  $\Delta A \text{ min}^{-1} \text{g}^{-1} \text{ sv.t.}$ ), pri navedenom tretmanu, nisu utvrđene značajne razlike u ukupnoj aktivnosti glutathion-reduktaze.

Prema F testu, primjenjeni tretmani biljke s donatorima H<sub>2</sub>S odnosno NO su značajno utjecali na specifičnu aktivnost glutathion-reduktaze kod kontrole (bez solnog stresa;  $P=0,0030$ ) te na razinama stresa 100 mM NaCl ( $P=0,0157$ ) i 200 mM NaCl ( $P \leq 0,0001$ ; *Tablica 31*).

Kod kontrole, LSD testom je utvrđena značajno niža specifična aktivnost glutathion-reduktaze pri tretmanu s donatorom NO (SNP; 0,192  $\Delta A \text{ min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{ prot.}$ ). Između varijanti tretmana s NaHS (0,390  $\Delta A \text{ min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{ prot.}$ ), GYY4137 (0,347  $\Delta A \text{ min}^{-1} \text{mg}^{-1}$

prot.) te kombinacije donora H<sub>2</sub>S s donorom NO (NaHS + SNP: 0,362 ΔA min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> prot., GYY4137 + SNP: 0,311 ΔA min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> prot.), nisu utvrđene statistički značajne razlike u aktivnosti navedenog enzima. Specifična aktivnost glutation-reduktaze utvrđena kod kontrole (0,293 ΔA min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> prot.), je bila značajno niža od utvrđene pri tretmanu s NaHS (0,390 ΔA min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> prot.), dok se nije značajno razlikovala od vrijednosti utvrđenih u varijantama tretmana s GYY4137 te s kombinacijom oba donora H<sub>2</sub>S sa donorom NO.

**Tablica 31.** Značajnost utjecaja solnog stresa i tretmana biljke s donorima H<sub>2</sub>S i NO (200 μM SNP, 200 μM GYY4137, 200 μM NaHS), na specifičnu aktivnost enzima glutation-reduktaze u listovima paprike.

TRETMANI BILJKE	VARIJANTA NaCl STRESA				F test
	Kontrola	50 mM	100 mM	200 mM	P
Kontrola	0,293 <sup>b,AB(y,Y)</sup>	0,409 <sup>(x,XY)</sup>	0,415 <sup>ab,AB(x,X)</sup>	0,355 <sup>b,B(xy,XY)</sup>	4,93 0,0317
NaHS	0,390 <sup>a,A(YZ)</sup>	0,327 <sup>(Z)</sup>	0,447 <sup>a,A(XY)</sup>	0,500 <sup>a,A(X)</sup>	12,96 0,0019
GYY4137	0,347 <sup>ab,A(y,Y)</sup>	0,358 <sup>(y,XY)</sup>	0,440 <sup>a,A(x,XY)</sup>	0,445 <sup>a,A(x,X)</sup>	6,69 0,0143
SNP	0,192 <sup>c,B(z,Y)</sup>	0,403 <sup>(x,X)</sup>	0,291 <sup>c,B(yz,XY)</sup>	0,343 <sup>bc,B(xy,X)</sup>	8,11 0,0082
NaHS + SNP	0,362 <sup>ab,A</sup>	0,364	0,334 <sup>bc,AB</sup>	0,280 <sup>d,B</sup>	1,36 0,3222
GYY4137 + SNP	0,311 <sup>ab,A(y,XY)</sup>	0,309 <sup>(y,XY)</sup>	0,459 <sup>a,A(x,X)</sup>	0,292 <sup>cd,B(y,Y)</sup>	5,10 0,0291
F test	6,89	1,50	4,47	20,52	
P	0,0030	0,2601	0,0157	≤0,0001	

ΔA min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> prot.; podaci su prosjek tri ponavljanja; ANOVA, F test; razlike između tretmana biljke za istu varijantu stresa, označene različitim slovom, su značajne prema LSD testu (<sup>a,b,c</sup>P=0,05; <sup>A,B,C</sup>P=0,01); razlike između varijante stresa u istom tretmanu biljke označene različitim slovom, su značajne prema LSD testu (<sup>x,y,z</sup>P=0,05; <sup>X,Y,Z</sup>P=0,01).

Na 100 mM NaCl, najniža aktivnost glutation-reduktaze je utvrđena pri tretmanu s donorom NO (0,291 ΔA min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> prot.) te se nije značajno razlikovala od aktivnosti utvrđene pri tretmanu s kombinacijom navedenog spoja i NaHS (0,334 ΔA min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> prot.), koja se nije razlikovala od kontrole (0,415 ΔA min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> prot.). Specifična aktivnost spomenutog enzima utvrđena kod kontrole te u varijantama tretmana s donorima H<sub>2</sub>S (NaHS: 0,447 ΔA min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> prot., GYY4137: 0,440 ΔA min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup>

prot.) i s kombinacijom GYY4137 + SNP ( $0,459 \Delta A \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ prot.}$ ) se nije međusobno značajno razlikovala.

Na 200 mM NaCl, značajno najmanja aktivnost glutation-reduktaze ( $0,280 \Delta A \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ prot.}$ ) je utvrđena pri tretmanu s kombinacijom NaHS + SNP te se nije značajno razlikovala od aktivnosti utvrđene pri tretmanu s kombinacijom GYY4137 + SNP ( $0,292 \Delta A \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ prot.}$ ), koja se također nije značajno razlikovala od specifične aktivnosti utvrđene pri tretmanu s SNP ( $0,343 \Delta A \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ prot.}$ ). Specifična aktivnost utvrđena u varijantama tretmana s NaHS ( $0,500 \Delta A \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ prot.}$ ) i GYY4137 ( $0,445 \Delta A \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ prot.}$ ) se nije međusobno značajno razlikovala, ali je bila značajno viša od utvrđenih pri svim ostalim tretmanima.

F testom je utvrđen značajan utjecaj solnog stresa na specifičnu aktivnost glutation-reduktaze u listu paprike, kod netretiranih biljaka ( $P=0,0317$ ), pri tretmanima s NaHS ( $P=0,0019$ ), GYY4137 ( $P=0,0143$ ) i SNP ( $P=0,0082$ ) te pri kombinaciji navedenog spoja s GYY4137 ( $P=0,0291$ ).

Kod netretiranih biljaka najmanja aktivnost spomenutog enzima je utvrđena kod kontrole ( $0,293 \Delta A \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ prot.}$ ) te se nije značajno razlikovala od utvrđene na 200 mM NaCl ( $0,355 \Delta A \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ prot.}$ ). Na 50 mM NaCl ( $0,409 \Delta A \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ prot.}$ ), 100 mM NaCl ( $0,415 \Delta A \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ prot.}$ ) i 200 mM NaCl, također nisu utvrđene značajne međusobne razlike u specifičnoj aktivnosti glutation-reduktaze.

U varijanti tretmana s NaHS, najmanja specifična aktivnost glutation-reduktaze je utvrđena na 50 mM NaCl ( $0,327 \Delta A \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ prot.}$ ) te se nije značajno razlikovala od kontrole ( $0,390 \Delta A \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ prot.}$ ), koja se nadalje nije razlikovala od aktivnosti utvrđene na 100 mM NaCl ( $0,447 \Delta A \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ prot.}$ ). Na razinama 100 mM i 200 mM NaCl ( $0,500 \Delta A \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ prot.}$ ), također nisu utvrđene značajne međusobne razlike u specifičnoj aktivnosti navedenog enzima.

Pri tretmanu s GYY4137 utvrđene vrijednosti specifične aktivnosti glutation-reduktaze kod kontrole ( $0,347 \Delta A \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ prot.}$ ) i na 50 mM NaCl ( $0,358 \Delta A \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ prot.}$ ) se nisu međusobno značajno razlikovale, ali su bile značajno niže od utvrđenih na 100 mM NaCl ( $0,440 \Delta A \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ prot.}$ ) i 200 mM NaCl ( $0,445 \Delta A \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ prot.}$ ), između kojih također nisu utvrđene značajne razlike.

U varijanti tretmana s donorom NO, najniža vrijednost specifične aktivnosti glutathion-reduktaze je utvrđena kod kontrole (0,192  $\Delta A \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ prot.}$ ) te se nije značajno razlikovala od utvrđene na 100 mM NaCl (0,291  $\Delta A \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ prot.}$ ), koja se nije značajno razlikovala od one na 200 mM NaCl (0,343  $\Delta A \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ prot.}$ ). Također nisu utvrđene značajne međusobne razlike u specifičnoj aktivnosti spomenutog enzima na 50 mM NaCl (0,403  $\Delta A \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ prot.}$ ) i 200 mM NaCl (0,343  $\Delta A \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ prot.}$ ).

U varijanti tretmana s kombinacijom GYY4137 + SNP značajno veća aktivnost glutathion-reduktaze je utvrđena na 100 mM NaCl (0,459  $\Delta A \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ prot.}$ ). Specifična aktivnost navedenog enzima utvrđena na ostalim razinama stresa i kod kontrole, se nije značajno razlikovala.

#### **5.4.1. Korelacije između pokazatelja antioksidativne aktivnosti u listu paprike u uvjetima solnog stresa pod utjecajem donora NO i H<sub>2</sub>S**

Biljke koje nisu tretirane niti s SNP niti s NaHS, odnosno GYY4137, pokazale su najviše značajnih korelacija, što ukazuje na čvrstu povezanost ispitivanih pokazatelja, uslijed utjecaja solnog stresa u listovima paprika, (*Tablica 32*). Sadržaj prolina u ovom pokusu nije bio u vezi s aktivnosti katalaze, glutathion reduktaze te nije korelirao s intenzitetom lipidne peroksidacije. Sadržaj peroksida je bio u vrlo značajnim pozitivnim korelacijama sa svim ispitivanim pokazateljima osim specifične aktivnosti glutathion-reduktaze, što znači da je porast koncentracije peroksida uslijed solnog stresa u listu paprika praćen aktivacijom više obrambenih mehanizama. Aktivnosti katalaze su pokazale čvrstu povezanost s ostalim pokazateljima, s izuzetkom sadržaja prolina i glutathion-reduktaze, na razini specifičnih aktivnosti ova dva enzima. Ukupna aktivnost gvajakol-peroksidaze nije korelirala jedino sa specifičnom aktivnosti glutathion-reduktaze, a specifična aktivnost gvajakol-peroksidaze nije bila u korelaciji s aktivnostima glutathion-reduktaze. Intenzitet lipidne peroksidacije je bio u vrlo značajnim pozitivnim korelacijama sa svim ostalim pokazateljima, izuzev prolina.

Primjenjeni tretmani donorima NO i H<sub>2</sub>S su vrlo različito utjecali na prethodno prikazane korelacijske povezanosti u listu paprika. U tretmanu s NaHS su uočene

**Tablica 32.** Značajnost i smjer korelacija između pokazatelja stresa i antioksidativne reakcije u listu paprike izložene solnom stresu, ovisno o tretmanu biljke s donorom NO i/ili H<sub>2</sub>S

x	y	Kontrola	NaHS	GY4137	SNP	NaHS + SNP	GY4137 + SNP
PRO	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	**↑↑			**↑↑	**↑↑	
	CATu		*↑↑				
	CATs		**↑↑			*↑↑	**↑↑
	GPODu	**↑↑	*↑↑	**↑↑	**↑↑	**↑↑	**↑↑
	GPODs	**↑↑				**↑↑	
	GRu		**↑↑	*↑↑		**↑↓	
	GRs		**↑↑	**↑↑			
	TBARS		**↑↑	**↑↑	**↑↑	**↑↑	
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	CATu	**↑↑					
	CATs	**↑↑					
	GPODu	**↑↑		*↑↓	*↑↑	**↑↑	**↑↑
	GPODs	**↑↑	**↑↓	*↑↓		**↑↑	
	GRu	**↑↑				*↑↓	
	GRs					*↑↓	
	TBARS	**↑↑			**↑↑	**↑↑	**↑↑
	CATu	CATs	**↑↑	*↑↑	**↑↑		
GPODu		**↑↑					
GPODs		*↑↑					
GRu		**↑↑	**↑↑				
GRs		*↑↑					
TBARS		**↑↑	**↑↑				
CATs	GPODu	**↑↑	*↑↑			*↑↑	*↑↑
	GPODs	*↑↑					
	GRu	**↑↑	**↑↑				*↑↑
	GRs		*↑↑				*↑↑
	TBARS	**↑↑	**↑↑				
GPODu	GPODs	**↑↑				**↑↑	
	GRu	**↑↑		**↑↑		**↑↓	
	GRs		**↑↑				
	TBARS	**↑↑			**↑↑	**↑↑	*↑↑
GPODs	GRu					*↑↓	
	GRs					*↑↓	
	TBARS	*↑↑				**↑↑	
GRu	GRs	*↑↑	**↑↑		**↑↑		**↑↑
	TBARS	**↑↑	**↑↑			*↑↓	*↑↓
GRs	TBARS		**↑↑	**↑↑		*↑↓	

\* značajnost na razini  $P=0,05$ ; \*\* značajnost na razini  $P=0,01$ ; ↑↑ korelacija pozitivnog smjera; ↑↓ korelacija negativnog smjera.



značajne promjene. Sadržaj prolina i peroksida nisu bili u korelaciji, kao niti odnos prolina i specifične aktivnosti gvajakol-peroksidaze. Nasuprot tome, pojavila se značajna povezanost prolina s aktivnostima katalaze i glutation-reduktaze te intenziteta lipidne peroksidacije. Jedina korelacija koja se nije promijenila je između prolina i ukupne aktivnosti gvajakol-peroksidaze. Kako su peroksidi u listu paprike bili u čvrstim vezama s većinom ispitivanih pokazatelja, evidentno je da je tretman biljke s NaHS poremetio te odnose. U toj varijanti pokusa, peroksidi su korelirali samo sa specifičnom aktivnosti gvajakol-peroksidaze, uz jedinu korelaciju negativnog smjera. Tretman s NaHS je utjecao na povezanost aktivnosti katalaze s ostalim pokazateljima, tako da se izgubila značajnost povezanosti ukupne aktivnosti katalaze sa aktivnostima gvajakol-peroksidaze, sadržajem peroksida i specifičnom aktivnosti glutation-reduktaze, ali se pojavila čvrsta pozitivna veza s prolinom, s kojim je i specifična aktivnost katalaze u ovoj varijanti postala vrlo značajna. Pod utjecajem tretmana s NaHS, ukupna aktivnost gvajakol-peroksidaze više nije bila u korelaciji s peroksidom, niti ukupnom aktivnosti katalaze i glutation-reduktaze. Također je izostala veza sa specifičnom aktivnosti istog enzima i intenzitetom lipidne peroksidacije. Specifična aktivnost gvajakol-peroksidaze u tretmanu s NaHS više nije korelirala s intenzitetom lipidne peroksidacije. Za razliku od katalaze i gvajakol-peroksidaze, glutation reduktaza je pokazala veći broj značajnih korelacija, tako da je u tretmanu s NaHS utvrđena značajna pozitivna povezanost njene ukupne aktivnosti s prolinom, a specifične s prolinom, specifičnom aktivnosti katalaze, ukupnom aktivnošću gvajakol-peroksidaze i intenzitetom lipidne peroksidacije. Za razliku od kontrolnih biljaka, u tretmanu s NaHS je intenzitet lipidne peroksidacije korelirao s prolinom i specifičnom aktivnosti glutation-reduktaze, a izostale su veze s peroksidom i obje aktivnosti gvajakol-peroksidaze.

Tretman s GYY4137 je kao i NaHS povećao povezanost prolina s gvajakol-peroksidazom i glutation-reduktazom te intenzitetom lipidne peroksidacije, međutim nije djelovao na povezanost prolina i aktivnosti katalaze, kako je to utvrđeno u tretmanu s NaHS. U odnosu na perokside, za razliku od NaHS, ovaj donor H<sub>2</sub>S je intenzivirao povezanost s ukupnom aktivnosti gvajakol-peroksidaze, uz negativan smjer veze. Još jače od NaHS, smanjio je povezanost obje aktivnosti katalaze i intenziteta lipidne

peroksidacije s ostalim pokazateljima. Kao i u tretmanu s NaHS, veza između peroksida i specifične aktivnosti gvajakol-peroksidaze je bila negativnog smjera.

Tretman sa SNP je također poremetio povezanost ispitivanih pokazatelja kakva je bila utvrđena u netretiranim biljkama. U ovoj varijanti pokusa, za razliku od donora H<sub>2</sub>S, tretman s donorom NO je potvrdio povezanost prolina i peroksida te intenziteta lipidne peroksidacije i peroksida, odnosno ukupne aktivnosti gvajakol-peroksidaze. Većina korelacija koje su bile značajne kod netretiranih biljaka ili u tretmanima s donorima H<sub>2</sub>S, u ovoj varijanti pokusa je izgubila značajnost. Sve utvrđene korelacije su bile pozitivnog smjera.

U tretmanu s kombinacijom NaHS + SNP, sadržaj prolina je značajno korelirao sa svim ostalim pokazateljima osim s ukupnom aktivnosti katalaze i specifičnom aktivnosti glutathion-reduktaze, a jedina korelacija negativnog smjera je bila s ukupnom aktivnosti glutathion reduktaze. Sadržaj peroksida je bio u negativnoj korelaciji s obje aktivnosti glutathion-reduktaze a pozitivnoj s prolinom, obje aktivnosti gvajakol-peroksidaze i intenzitetom lipidne peroksidacije. Ukupna aktivnost katalaze pri ovom tretmanu nije pokazala značajnu povezanost s nijednim pokazateljem, a specifična aktivnost je pozitivno korelirala s prolinom i ukupnom aktivnosti peroksidaze. Osim navedenih odnosa gvajakol-peroksidaze, utvrđena je negativna veza njene ukupne aktivnosti s ukupnom aktivnosti glutathion-reduktaze, kao i negativne veze njene specifične aktivnosti s obje aktivnosti glutathion reduktaze. Ovaj tretman je jedini rezultirao značajnim vezama između specifične aktivnosti gvajakol-peroksidaze i aktivnosti glutathion-reduktaze. Intenzitet lipidne peroksidacije je u ovoj varijanti pokusa bio u vrlo značajnoj pozitivnoj korelaciji s prolinom, peroksidom i obje aktivnosti gvajakol-peroksidaze, dok je s obje aktivnosti glutathion-reduktaze bio u slabije izraženoj negativnoj korelaciji.

Tretman kombinacijom GYY4137 + SNP je rezultirao s više značajnih korelacija nego pri pojedinačnim tretmanima. Za razliku od oba pojedinačna tretmana, u njihovoj kombinaciji je izostala značajna povezanost prolina i intenziteta lipidne peroksidacije. Prolin je vrlo značajno i pozitivno korelirao sa specifičnom aktivnosti katalaze i

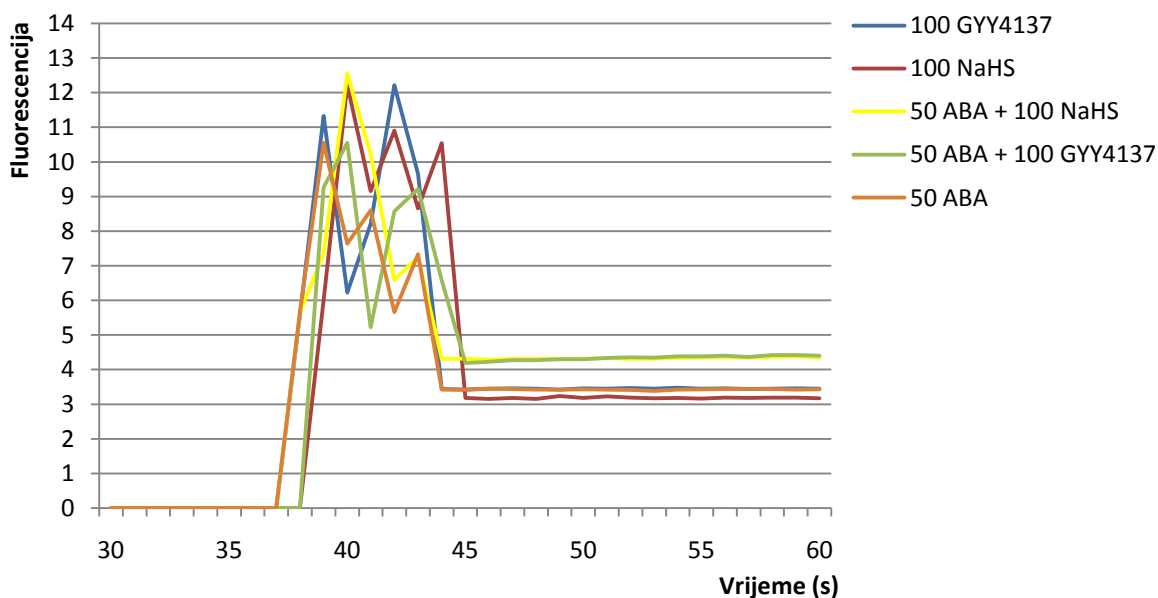
ukupnom aktivnosti gvajakol-peroksidaze, koja je bila i u značajnoj korelaciji s peroksidom. Povećan sadržaj peroksida je praćen većim intenzitetom lipidne peroksidacije, kao u svim ostalim varijantama pokusa osim kod pojedinačnih tretmana s donorima H<sub>2</sub>S. Za razliku od pojedinačnih tretmana sa SNP i GYY4137, njihova kombinacija je dovela u čvrstu pozitivnu vezu ukupnu i specifičnu aktivnost katalaze. Utvrđene su i vrlo značajne pozitivne veze specifične aktivnosti katalaze s ukupnom aktivnosti peroksidaze te obje aktivnosti glutacion-reduktaze. Intenzitet lipidne peroksidacije je u ovom tretmanu bio povezan jedino sa sadržajem peroksida.

## 6. RASPRAVA

### 6.1. Interakcije H<sub>2</sub>S i NO u mehanizmu rada puči i odgovoru na solni stres kod uročnjaka i paprike

Glavni cilj ovog istraživanja je bio utvrditi da li u mehanizmima otvaranja i zatvaranja puči te u mehanizmima obrane od solnog stresa, H<sub>2</sub>S interferira sa NO signalnim putevima, te da li postoji jednak odgovor na H<sub>2</sub>S i NO tretmane kod paprike, kao i kod uročnjaka. Osnovna hipoteza je da sumporovodik sudjeluje u prijenosu staničnih signala putem dušik oksida kod biljaka, kao što je to dokazano kod humanih tkiva.

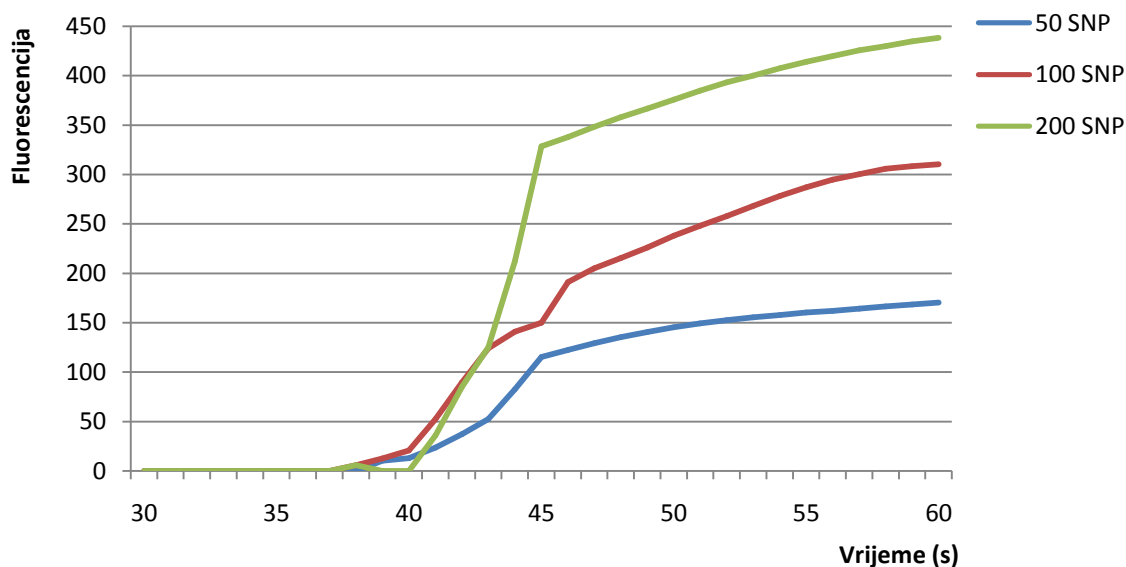
Preliminarnim istraživanjima se željelo utvrditi da li postoje interferencije H<sub>2</sub>S i ABA s kemikalijom koja se često koristi za detekciju NO pomoću fluorimetra, DAF-2.



**Grafikon 1.** Intenzitet fluorescencije nakon dodavanja 15  $\mu$ M DAF-2 (finalna koncentracija), donorima H<sub>2</sub>S i ABA ( $\mu$ M), *in vitro*.

Mjerenjem fluorescencije *in vitro*, dokazano je da ABA, donori H<sub>2</sub>S, kao ni njihova kombinacija, ne utječu značajno na porast intenziteta fluorescencije, nakon dodatka DAF-2 (Grafikon 1). Time se isključuje mogućnost pojave NO-nespecifične fluorescencije puči, koja bi eventualno mogla zamaskirati utjecaj primjenjenih tretmana epiderme lista, prilikom vizualizacije NO pomoću CLMS u stanicama. Također,

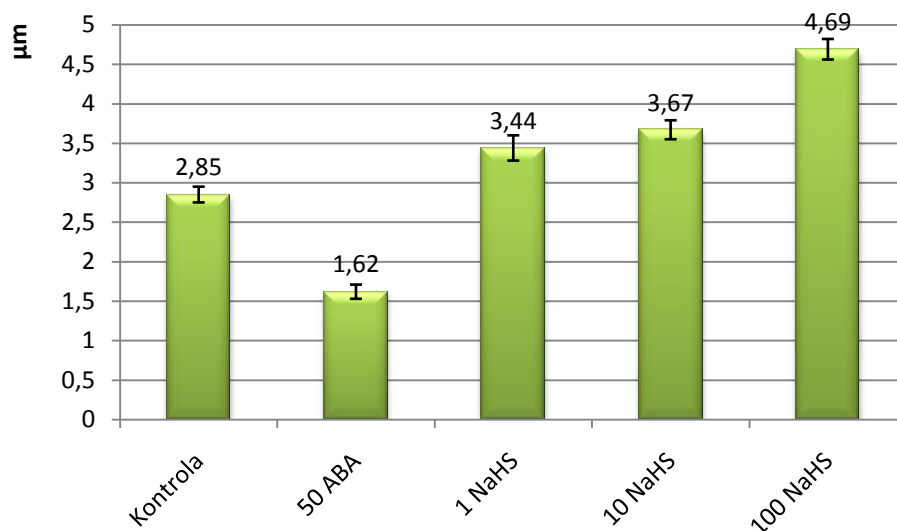
mjerenjem fluorescencije je provjerena reakcija DAF-2 i SNP, uobičajeno primjenjivog donora NO.



**Grafikon 2.** Intenzitet fluorescencije nakon dodavanja 15  $\mu\text{M}$  DAF-2 (finalna koncentracija), donoru NO ( $\mu\text{M}$ ), *in vitro*.

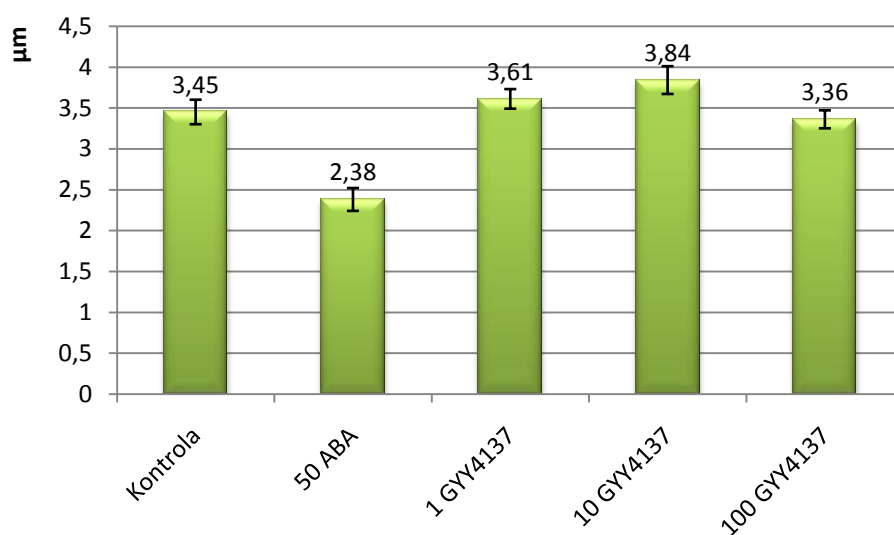
Nakon dodavanja DAF-2 rastućim koncentracijama SNP, *in vitro*, zabilježen je porast intenziteta fluorescencije, proporcionalno s porastom koncentracije SNP (Grafikon 2), što upućuje na specifičnu fluorescenciju ovog spoja, uzrokovanu otpuštanjem NO i stvaranjem kompleksa s DAF-2.

Drugi dio preliminarnih istraživanja je imao za cilj utvrditi reakciju puči na tretmane s  $\text{H}_2\text{S}$ , primjenjenog u različitim koncentracijama donora NaHS i GYY4137. Stanice zapornice puči pripadaju među one najsloženije ali istovremeno jedinstvene i specijalizirane biljne stanice, u kojima se detaljno može proučavati gotovo svaki signalni događaj (Desikan i sur., 2005.). Kako je poznato da ABA stimulira zatvaranje puči, jedna od varijanata je bio tretman epidermalnih segmenata lista uročnjaka s 50  $\mu\text{M}$  ABA. Mjerenjem otvora puči nakon 2,5 satnog tretmana s ABA, ustanovljeno je značajno smanjenje otvora puči u odnosu na kontrolu. U tretmanu s NaHS nije došlo do zatvaranja puči već upravo suprotno, promjer puči je bio veći što je koncentracija primjenjenog NaHS bila veća (Grafikon 3). Čak i najniža koncentracija NaHS (1  $\mu\text{M}$ ) je značajno povećala promjer otvora puči u odnosu na kontrolu, a naročito na tretman s ABA.



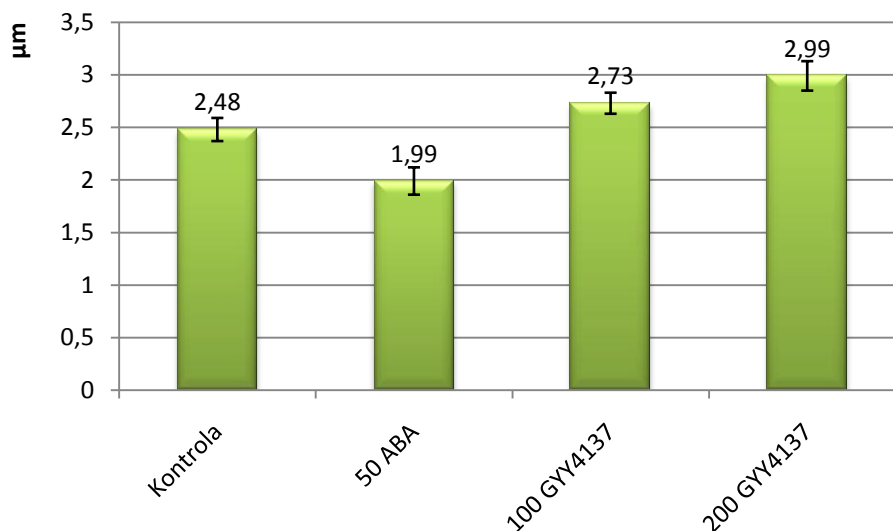
**Grafikon 3.** Utjecaj tretmana lista s NaHS i ABA, na otvor puči kod uročnjaka, ekotip Columbia.

Djelovanje  $H_2S$  na mehanizam rada puči provjereno je i primjenom GYY4137. Taj spoj je sporootpuštajući donor  $H_2S$  (Li i sur., 2008., 2009.; Whiteman i sur., 2010.). I u ovom slučaju puči su pod utjecajem  $H_2S$  iz GYY4137 bile jače otvorene nego u kontroli, ali ne toliko kao u tretmanu s NaHS (*Grafikon 4*). Najveći otvor puči je postignut u tretmanu s 10 µM GYY4137.



**Grafikon 4.** Utjecaj tretmana lista s GYY4137 i ABA, na otvor puči kod uročnjaka, ekotip Columbia.

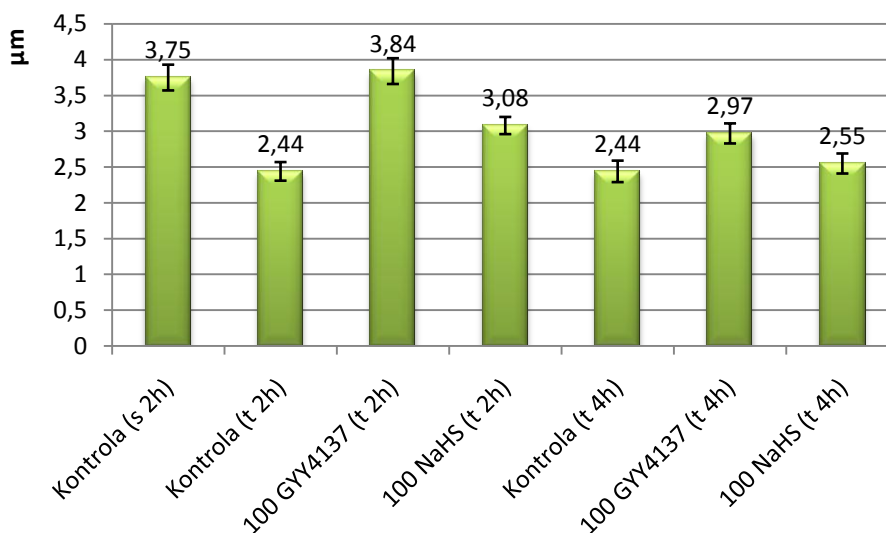
Ovi rezultati pokazuju da GYY4137 dobro oponaša djelovanje NaHS te da je primjenjiv za istraživanja funkcije H<sub>2</sub>S u biljkama. Kako je ustanovljeno da H<sub>2</sub>S stimulira otvaranje puči, pokus je ponovljen s GYY4137 ali listovi prethodno nisu izloženi jakom osvjetljenju koje izaziva otvaranje puči. Ponovo je utvrđeno da su puči u kontroli bile zatvorenije, da je tretman s ABA dodatno smanjio njihov otvor a GYY4137 je stimulirao otvaranje puči, proporcionalno primjenjenoj koncentraciji (*Grafikon 5*).



**Grafikon 5.** Utjecaj tretmana lista s GYY4137 i ABA, na otvor puči kod uročnjaka, ekotip *Landsberg erecta*.

Dobiveni rezultati pokazuju da se puči prirodno zatvaraju ako su listovi izloženi tami u trajanju 2 odnosno 4 sata, ukoliko nisu tretirani s NaHS ili GYY4137, koji sprječavaju njihovo zatvaranje (*Grafikon 6*). U ovom slučaju, pri jednakim koncentracijama donora (100 μM), GYY4137 je pokazao jači učinak. Može se pretpostaviti da tomu razlog dugotrajnije prisustvo H<sub>2</sub>S iz GYY4137 u usporedbi s NaHS iz kojeg se H<sub>2</sub>S naglo otpušta, te može biti i brzo uklonjen određenim, za sada nedovoljno poznatim metaboličkim procesima u stanicama. Djelovanje H<sub>2</sub>S u smislu otvaranja puči ili sprječavanja njihovog zatvaranja uslijed tame može imati značajne učinke na intenzitet transpiracije kao i ulazak CO<sub>2</sub> u list. Praktičan značaj ovakvog fiziološkog djelovanja H<sub>2</sub>S bi trebalo dalje istraživati naročito u kulturnim biljnim vrstama, zbog mogućeg utjecaja na produktivnost biljaka. De Kok i sur. (1989.) u svom istraživanju s više biljnih vrsta nisu utvrdili vezu između intenziteta transpiracije i intenziteta odnosno

dužine fumigacije biljaka s H<sub>2</sub>S. Suprotan učinak H<sub>2</sub>S na promjer puči su utvrdili García-Mata i Lamattina (2010.), kod *Vicia faba* L., *Arabidopsis thaliana* L. i *Impatiens walleriana* Hook. f. te autori smatraju da H<sub>2</sub>S stimulacijom zatvaranja puči doprinosi otpornosti biljaka na sušu.



**Grafikon 6.** Utjecaj osvjetljenja i tretmana lista donorima H<sub>2</sub>S, na promjer puči kod uročnjaka, ekotip Columbia.

Kako je preliminarnim istraživanjem dokazano da se puči uročnjaka intenzivno zatvaraju ako su tretirane s ABA, a donori H<sub>2</sub>S inhibiraju zatvaranje puči pod utjecajem tame, proveden je pokus s paprikom u kojem su korišteni i kombinirani tretmani, u kojima je uz 50 µM ABA istovremeno primjenjena rastuća koncentracija ispitivanih donora H<sub>2</sub>S. Najniže vrijednosti promjera puči izmjerene su nakon tretmana s 50 µM ABA i 50 µM ABA u kombinaciji s 10 µM GYY4137. Promjeri puči nakon tretmana s čistom ABA-om i u kombinaciji s GYY4137, bili su statistički značajno manji od promjera utvrđenih kod kontrole i nakon tretmana s čistim GYY4137 (*Tablica 14*).

Najveći promjer puči je utvrđen nakon tretmana sa 100 µM GYY4137 bez ABA. Kombinirani tretmani pokazuju da je intenzitet inhibicije zatvaranja puči uslijed tretmana s ABA ovisan o koncentraciji donora GYY4137. Slični rezultati su dobiveni i u varijantama kombinacije ABA i različitih koncentracija NaHS (*Tablica 15*). Vrijednosti promjera utvrđene nakon tretmana s 10, 50 i 100 µM NaHS u kombinaciji s



50  $\mu\text{M}$  ABA, proporcionalno su pratile porast koncentracije NaHS-a, te je najveći promjer puči utvrđen na tretmanu sa 100  $\mu\text{M}$  NaHS bez ABA.

Kako bi se ocijenila učinkovitost djelovanja donora  $\text{H}_2\text{S}$  na puči koje su stimulirane na zatvaranje tamom kod paprike, proveden je pokus u kojem su primjenjene tri koncentracije NaHS odnosno GYY4137, uz kontrolu bez primjene donora. Značajno najniža vrijednost promjera, utvrđena je očekivano, kod kontrole, dok je najveći promjer, utvrđen kod listova nakon tretmana s 200  $\mu\text{M}$  NaHS (*Tablica 16*). Vrijednosti promjera puči nakon tretmana rastućim koncentracijama oba donora  $\text{H}_2\text{S}$  u uvjetima tame, proporcionalno su pratile porast njihove koncentracije. Između tretmana s 200  $\mu\text{M}$  NaHS i 200  $\mu\text{M}$  GYY4137, odnosno tretmana sa 100  $\mu\text{M}$  NaHS i 100  $\mu\text{M}$  GYY4137, nisu utvrđene statistički značajne razlike. U varijanti pokusa gdje je primjenjeno 100  $\mu\text{M}$  ABA, s istom koncentracijom ispitivanih donora  $\text{H}_2\text{S}$ , najmanji promjer puči paprike je utvrđen u tretmanu s čistom ABA a najveći u tretmanu s čistim NaHS (*Tablica 17*).

U varijanti pokusa s donorom (SNP) i scavengerom NO (cPTIO), najmanji promjer utvrđen je kod puči nakon tretmana sa čistim SNP-om, dok je najveći promjer utvrđen nakon tretmana s čistim NaHS-om (*Tablica 18*), što ponovo potvrđuje pravilo da NO stimulira zatvaranje a  $\text{H}_2\text{S}$  otvaranje puči, ili inhibira njihovo zatvaranje. Kod kontrole te nakon tretmana sa SNP-om u kombinaciji s oba donora  $\text{H}_2\text{S}$  i cPTIO, nisu utvrđene značajne razlike u promjeru puči, dakle istovremeno prisustvo NO i nekog inhibitora u konačnici nema utjecaja na promjer puči paprike. Obzirom da nisu značajne razlike između tretmana u kojima je paralelno primjenjen cPTIO te tretmana u kojima je primjenjen neki donor  $\text{H}_2\text{S}$ , može se pretpostaviti da  $\text{H}_2\text{S}$  ima inhibitorno djelovanje na NO-ovisan prijenos signala koji dovodi do zatvaranja puči.

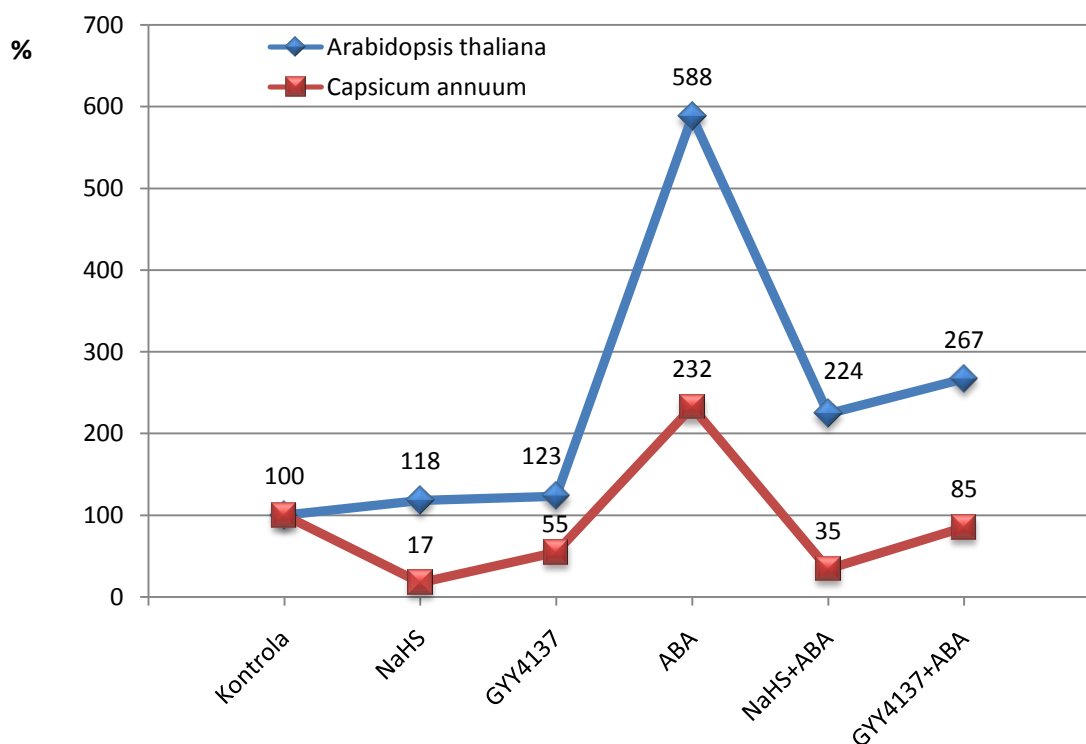
Zatvaranje puči uslijed ABA ili tame povezano je s povećanom produkcijom NO (Neill i sur., 2002.a; Bright i sur., 2006.), stoga je bilo potrebno dokazati prisustvo NO i provjeriti utjecaj donora  $\text{H}_2\text{S}$  na njegovu produkciju u pučima primjenom bojanja s DAF-2DA i njegove detekcije pomoću CLMS. Kako je vidljivo na *slici 5*, kontrola u kojoj nisu primjenjeni niti tretman s ABA niti donori  $\text{H}_2\text{S}$ , ne pokazuje značajno

prisustvo NO u stanicama zapornicama uročnjaka, dok tretman s ABA izaziva intenzivnu fluorescenciju, uslijed produkcije NO. Bez primjene ABA, tretman s NaHS ili s GYY4137 rezultira izvjesnom fluorescencijom. Međutim, u kombinaciji pojedinog donora H<sub>2</sub>S zajedno s ABA, uočljivo je izrazito manja akumulacija NO, što znači da je produkcija NO u prisustvu H<sub>2</sub>S značajno manja.

Ako se cPTIO smatra scavengerom NO i kao takav primjenjuje u biološkim istraživanjima, na temelju rezultata ovih istraživanja može se pretpostaviti isto djelovanje H<sub>2</sub>S na NO, odnosno vjerojatnu interakciju njihovih signalnih puteva. Pri tome, na metaboličkoj razini, H<sub>2</sub>S ne mora djelovati na isti način kao cPTIO. Naime, Planchet i Kaiser (2006.) navode da SNP ne proizvodi samo NO već i nitrit, čija produkcija je bila veća u prisustvu cPTIO. U njihovom prikazu detekcije NO pomoću DAF fluorescencije i kemiluminiscencije, 500 μM cPTIO je potpuno spriječilo produkciju NO iz SNP, pri čemu je SNP-ovisna fluorescencija uz primjenu DAF smanjena samo za 85%. Bethke i sur. (2004.) su pokazali da biljna tkiva mogu sintetizirati NO neenzimatskom redukcijom nitrita iz apoplasta a fenolne komponente u mediju mogu povećati intenzitet te sinteze NO. Dakle, ostaje nejasan mehanizam interakcije NO i H<sub>2</sub>S, jer uzevši u obzir promjer otvora puči u ovom istraživanju treba naglasiti da je samostalni tretman s cPTIO rezultirao s vrijednostima na razini kontrole, dok su pojedinačni tretmani s donorima H<sub>2</sub>S rezultirali statistički značajno većim otvorom puči. To upućuje na mogućnost da H<sub>2</sub>S nije samo scavenger NO, koji svojim djelovanjem remeti NO signalni put prema zatvaranju puči, nego je moguće da ima i određenu ulogu u prijenosu signala kojim se puči otvaraju.

U pučima paprike je i bez tretmana s ABA odnosno donorima H<sub>2</sub>S utvrđena nešto viša razina fluorescencije u usporedbi s pučima uročnjaka (*Slika 5*), međutim, i ovdje je utvrđen značajan utjecaj primjenjenih tretmana epidermalnih fragmenata lista paprike, na intenzitet fluorescencije puči (*Slika 6*), što je jasno vidljivo na *grafikonu 7*. Kvantifikacijom intenziteta fluorescencije se potvrđuje da je statistički značajno najjači intenzitet fluorescencije, utvrđen nakon tretmana s ABA (*Tablica 19*), dok je najmanji intenzitet fluorescencije utvrđen nakon tretmana s NaHS. Kao i kod uročnjaka, CLMS

metodom je i u listovima paprika dokazano značajno smanjenje akumulacije NO u pućima ukoliko je uz ABA primjenjen i neki od ispitivanih donora H<sub>2</sub>S.



**Grafikon 7.** Razlike u reakciji obje biljne vrste na primjenjene tretmane, u smislu akumulacije NO u pućima izražene kao % fluorescencije u odnosu na netretirane listove. Kod paprike je uočljivo manja akumulacija NO općenito, a naročito pri samostalnim tretmanima s donorima H<sub>2</sub>S te manja akumulacija NO, kao reakcija na tretman s ABA, u usporedbi s uročnjakom.

Smanjenje epifluorescencije NO pri tretmanu lista *Vicia faba* L. s rastućim koncentracijama NaHS su dobili i García-Mata i Lamattina (2010.), ali autori to ne objašnjavaju interakcijom H<sub>2</sub>S i NO već to prikazuju kao test viabilnosti stanica pri tretmanu s H<sub>2</sub>S. “Quenching” NO pomoću H<sub>2</sub>S je dokazan u izoliranim tkivima i kulturi stanica sisavaca (Ali i sur., 2006.; Whiteman i sur., 2006.). Također se smatra da u animalnim sustavima H<sub>2</sub>S smanjuje produkciju NO putem inhibicije NOS (Kubo i sur., 2007.).

Pored utjecaja ispitivanih signalnih molekula, uvjeta osvjetljenosti i poznatog djelovanja ABA na veličinu otvora pući, potrebno je spomenuti da u ovakvim istraživanjima uvjeti uzgoja pokusnih biljaka mogu značajno utjecati na mjerene

pokazatelje. Na primjer, *Tradescantia virginiana* L. i *Arabidopsis thaliana* L. uzgajani pri većoj relativnoj vlažnosti su imali veću širinu otvora puči u odnosu na biljke uzgajane u uvjetima niže relativne vlage, u istraživanju Atta (2010.).

Obzirom da je otvaranje i zatvaranje puči ovisno o intenzitetu svjetla, postavljen je pokus u kojemu su listovi različitih genotipova uročnjaka prije tretmana s donorima H<sub>2</sub>S izloženi određeno vrijeme svjetlu, odnosno tami. Kako je prethodno ustanovljeno da H<sub>2</sub>S otvara puči, njegovi donori (NaHS i GYY4137) su primjenjeni samo na listove izložene tami. Da bi se utvrdio utjecaj solnog stresa kao i interakcije osvjetljenja, H<sub>2</sub>S i solnog stresa na promjer puči, biljke su izložene solnom stresu (50 mM NaCl).

U cjelini, primjenjena razina solnog stresa, te interakcije stres x genotip odnosno stres x tretman lista x genotip, nisu imali značajan utjecaj na promjer puči uročnjaka (*Tablica 1*). U prosjeku za sve tretmane lista nije bilo značajnih razlika u promjeru otvora puči između kontrole i biljaka tretiranih s NaCl, ali je očigledan značaj osvjetljenja kao i značajan utjecaj donora H<sub>2</sub>S na obje varijante stresa (*Tablice 5 i 6*).

Također, tretman lista i genotip su vrlo značajno utjecali na promjer puči i kod kontrolnih biljaka i kod tretmana s NaCl (*Tablica 2*). Očekivano, najveći promjer puči na obje varijante stresa (kontrola i NaCl), izmjerene su kod listova izloženih svjetlu. Između tretmana lista donorima H<sub>2</sub>S u tami, nisu utvrđene statistički značajne razlike u promjeru puči ni za jednu varijantu stresa. U uvjetima tame, utvrđen je veći promjer puči pri tretmanu s H<sub>2</sub>S u odnosu na netretirane listove, kod obje varijante pokusa. Dakle i kod kontrolnih biljaka i kod onih izloženih stresu, H<sub>2</sub>S je inhibirao zatvaranje puči uslijed tame.

Obzirom na značajan utjecaj genotipa, u prosjeku za sve tretmane lista, kod kontrolnih biljaka i kod tretmana s NaCl, ekotip Ler je imao najveći promjer, a genotip Nia2 najmanji promjer puči. Genotip Nia2 je imao najmanji promjer puči u sve četiri varijante tretmana listova. Kod mutanta Nia2 je utvrđen značajan negativan utjecaj stresa na promjer puči nakon tretmana H<sub>2</sub>S donorima u uvjetima tame. Kod ostalih genotipova, stres nije značajno utjecao na promjer puči ni u jednoj varijanti tretmana listova. Vjerojatno je da 50 mM NaCl nije visoka razina solnog stresa za ostale

ispitivane genotipove uročnjaka. U skladu s tim su i rezultati Attumi (2007), koji zaključuje da umjerena razina solnog stresa od 50 mM NaCl u kulturi stanica Ler (*Arabidopsis thaliana* L., var. Landsberg erecta) smanjuje porast broja stanica u kulturi na 75% od kontrole, dok iste u uzgojnom mediju s 80 mM NaCl ne mogu preživjeti.

Kod sva četiri ispitivana genotipa, osvjetljenje i donori H<sub>2</sub>S su djelovali slično. Puči su bile najviše otvorene kod osvjetljenih listova a najmanje kod listova u mraku bez tretmana s H<sub>2</sub>S. Tretmani epiderme s donorima H<sub>2</sub>S su povećali promjer puči, odnosno inhibirali njihovo zatvaranje u uvjetima tame.

Utjecaj svjetla odnosno tame na promjer puči paprike kao i djelovanje donora NO odnosno H<sub>2</sub>S ispitivan je u posebnom pokusu u koji je bio uključen i tretman biljke s NaCl. U listovima koji su držani u uvjetima tame, očekivano, utvrđen je značajno manji promjer puči nego kod listova koji su bili izloženi direktnom osvjetljenju, u prosjeku za sve varijante tretmana listova donorom NO i H<sub>2</sub>S.

Nakon tretmana NaHS-om utvrđen je najveći promjer puči, dok je nakon tretmana SNP-om utvrđen najmanji promjer, što potvrđuje isti mehanizam djelovanja H<sub>2</sub>S na promjer puči kao i kod uročnjaka. U cjelini, najmanji promjer puči je utvrđen nakon tretmana sa SNP u uvjetima tame, što ukazuje na poznati mehanizam djelovanja prema kojem NO stimulira zatvaranje puči.

Kod biljaka paprika izloženih solnom stresu, promjer puči kod listova tretiranih NO donorom bio je statistički značajno manji od promjera utvrđenih nakon tretmana s donorima H<sub>2</sub>S. Dio kontrolnih kao i biljaka koje su izložene solnom stresu ostavljene su uz redovito zalijevanje demineraliziranom vodom kako bi se smanjila koncentracija soli u supstratu. Nakon 3 dana oporavka od solnog stresa, analizirana je njihova reakcija u pučima na iste tretmane lista. Listovi na kojima nisu primjenjeni donori NO i H<sub>2</sub>S su pokazali različit otvor puči, s tim da je najmanji promjer utvrđen kod biljaka koje nisu izložene solnom stresu. Biljke pod utjecajem solnog stresa i nakon faze oporavka su u prosjeku imale povećan otvor puči, što znači da je kod paprike pod utjecajem solnog stresa došlo do otvaranja puči.

U istraživanju Kaymakanove i sur. (2008.) je 100 mM NaCl odnosno Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> primjenjeno u Hoagland hranjivu otopinu s biljkama graha, a tretman je trajao 7 dana. Utvrđen je povećan broj puči po jedinici površine lista i manje dimenzije puči, kao rezultat smanjenja volumena stanica uslijed dehidracije, kao direktne posljedice solnog stresa. Povećan intenzitet lipidne peroksidacije i akumulacija prolina potvrđuju stanje stresa u listovima, a autori ističu jači stres kod tretmana sulfatom, pretpostavljajući da je razlog veća koncentracija Na<sup>+</sup>.

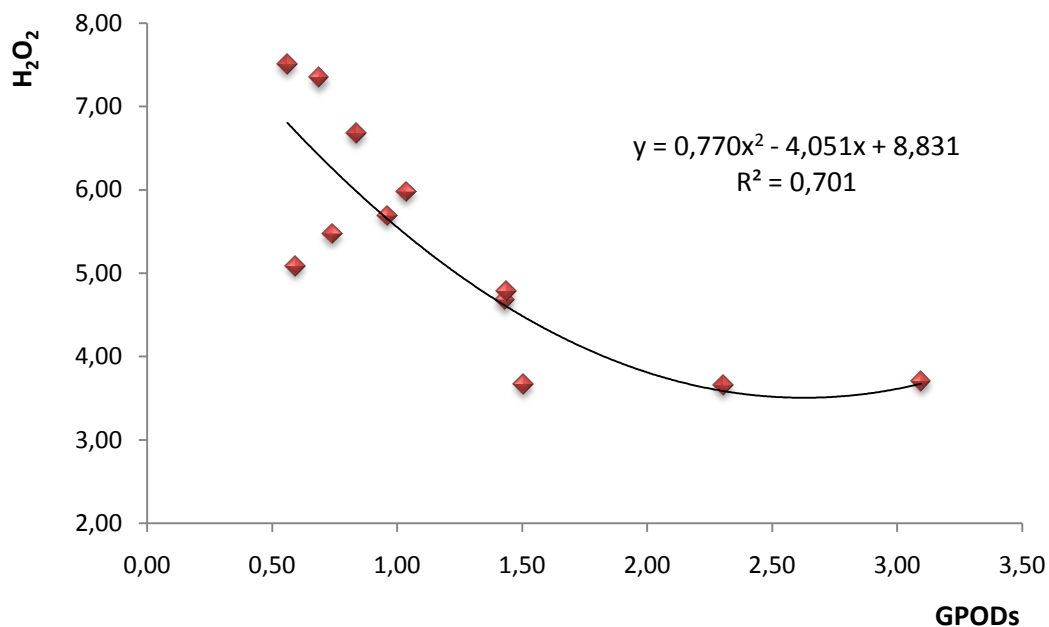
## 6.2. Antioksidativna aktivnost u listu paprike uslijed solnog stresa i uz primjenu donora NO i H<sub>2</sub>S

U pokusu u kojem su 4 genotipa uročnjaka izložena umjerenom solnom stresu (50 μM NaCl), solni stres je značajno smanjio promjer puči nakon tretmana listova donorima H<sub>2</sub>S u uvjetima tame, u prosjeku za sve genotipove (*Tablica 4*), dok u listovima koji nisu tretirani s H<sub>2</sub>S donorima solni stres nije značajno utjecao na promjer puči niti na svjetlu niti u tami. Značajnost utjecaja interakcije stresa x tretman lista na promjer puči, utvrđena je samo kod ekotipa Ler. Puči kod sva četiri genotipa, u uvjetima solnog stresa ali i kod kontrolnih biljaka, reagirale su isto na tretmane listova donorima H<sub>2</sub>S u uvjetima tame, pri čemu su donori H<sub>2</sub>S inhibirali zatvaranje puči uslijed tame (*Tablice 5 i 6*). U tom pokusu nisu vršene analize stresnih odnosno antioksidativnih pokazatelja u listu ali su isti analizirani u pokusima s paprikom. Cilj je bio utvrditi da li tretmani sa H<sub>2</sub>S i NO utječu na aktivnosti katalaze, glutation-reduktaze i gvajakol-peroksidaze, na akumulaciju vodik peroksida i prolina te na razinu lipidne peroksidacije, u tkivu lista paprike izložene različitim razinama solnog stresa.

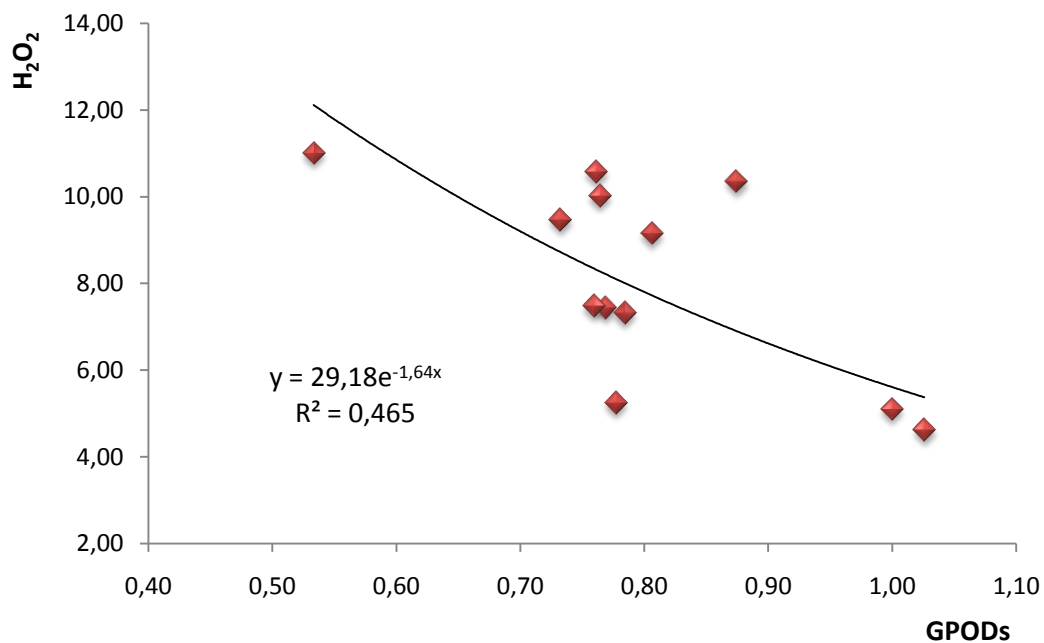
U pokusu u kojem je paprika izložena djelovanju 150 μM NaCl, F testom je utvrđen značajan utjecaj stresa na sve analizirane parametre (*Tablica 13*). Intenzitet lipidne peroksidacije, sadržaj ukupnih peroksida i prolina su bili najveći u listovima biljaka izloženim solnom stresu, u odnosu na kontrolu i biljke u fazi oporavka od stresa. Ukupne aktivnosti gvajakol-peroksidaze i glutation-reduktaze su bile najveće na kontroli a katalaze u fazi oporavka od stresa. Specifične aktivnosti ovih enzima su pokazale isti trend kao i ukupne aktivnosti. Prema dobivenim rezultatima, 150 μM NaCl je intenzitet stresa koji je bio dovoljan za aktivaciju antioksidativnih mehanizama u listu paprike. Pri hidroponskom uzgoju paprike, hranjiva otopina bi trebala imati električnu provodljivost (EC) 1,7 - 1,8 dS m<sup>-1</sup>, što zavisi od fenofaze uzgoja paprike (Parađiković, 2009.). Takva vrijednost EC odgovara 19 - 20 mM NaCl, stoga je jasno da je primjenjena koncentracija soli od 150 mM visoka razina solnog stresa za papriku.

U drugom pokusu je primjenjeno više razina solnog stresa (0, 50, 100 i 200 mM NaCl) a biljke su ujedno tretirane i donorima NO i H<sub>2</sub>S te njihovim kombinacijama.

Prema LSD testu, koncentracija peroksida se značajno povećavala u listu paprike s povećanjem intenziteta solnog stresa te je najveća vrijednost (*Tablica 20*), utvrđena na 200 mM NaCl. Najveća koncentracija peroksida je utvrđena kod biljaka koje nisu tretirane s donorima NO i H<sub>2</sub>S, a najniža u varijanti tretmana biljke s NaHS.



**Grafikon 8.** Korelacija između sadržaja peroksida i specifične aktivnosti gvajakol-peroksidaze pri tretmanima biljke s NaHS.



**Grafikon 9.** Korelacija između sadržaja peroksida i specifične aktivnosti gvajakol-peroksidaze pri tretmanima biljke s GYY4137.

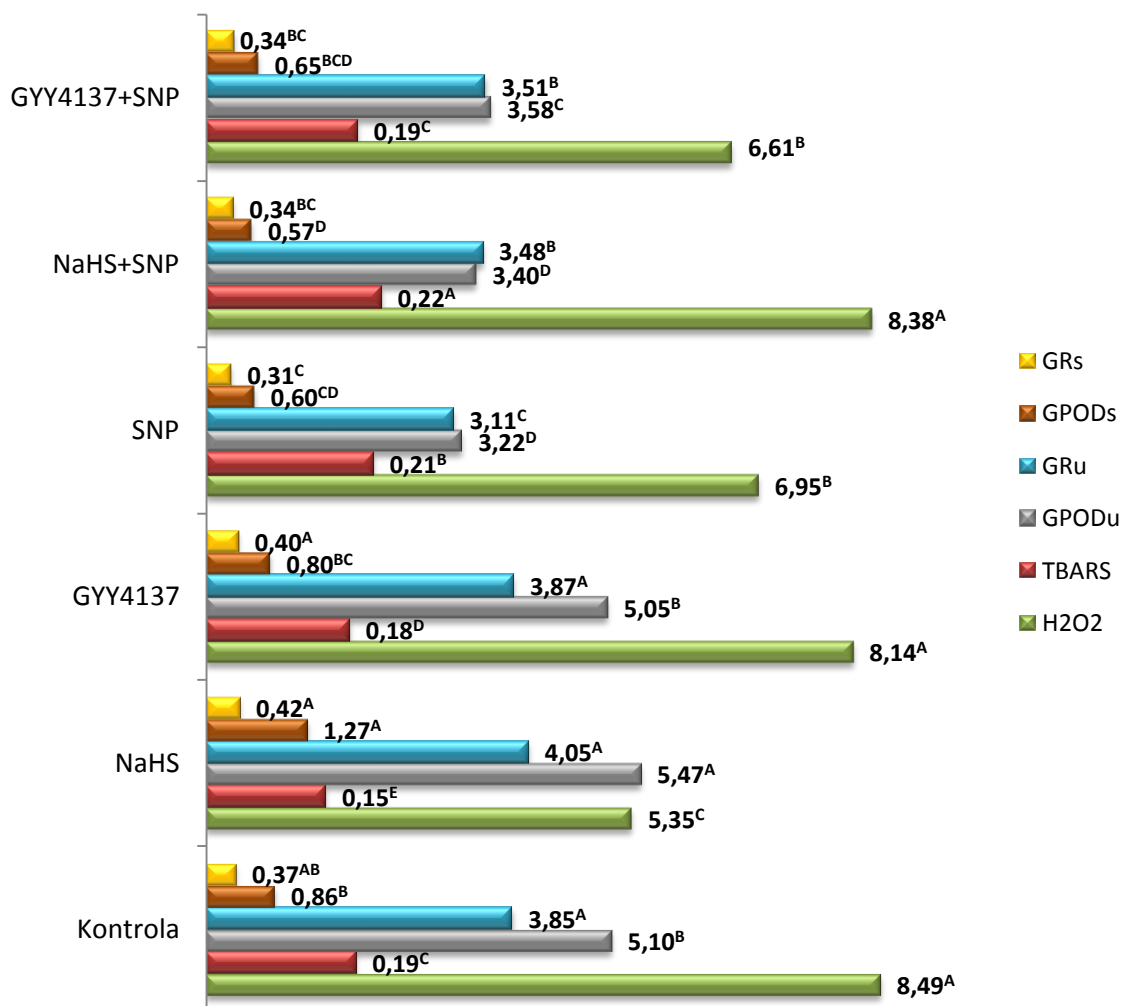


Utvrđen je značajan utjecaj razine solnog stresa, primjenjenih donora H<sub>2</sub>S i NO, kao i njihove interakcije na intenzitet lipidne peroksidacije u tkivu lista paprike. Lipidna peroksidacija se značajno povećavala s intenzitetom solnog stresa te je najveća vrijednost utvrđena na 200 mM NaCl. Najniže vrijednosti navedenog parametra su utvrđene na tretmanima s donorima H<sub>2</sub>S. Prema navedenim pokazateljima bi se moglo zaključiti da egzogena primjena H<sub>2</sub>S smanjuje koncentraciju peroksida i intenzitet lipidne peroksidacije u uvjetima solnog stresa kod paprike, odnosno da H<sub>2</sub>S može povećavati otpornost paprike na solni stres. To pokazuju i vrlo značajne korelacije negativnog smjera između sadržaja peroksida i specifične aktivnosti gvajakol-peroksidaze, utvrđene u tretmanima s NaHS (*Grafikon 8*) i GYY4137 (*Grafikon 9*).

Porast koncentracije peroksida i intenziteta lipidne peroksidacije s razinom stresa praćen je i akumulacijom prolina u listu paprike (*Tablica 20*). Analizirajući utjecaj tretmana biljke s donorima H<sub>2</sub>S i NO, najveći sadržaj prolina je utvrđen u varijanti tretmana biljke s GYY4137. Značajno niža vrijednost sadržaja prolina u odnosu na kontrolu je utvrđena kod tretmana biljke s donatorom NO, naročito čistim SNP, ali i u kombinacijama s donorima H<sub>2</sub>S.

Ukupna aktivnost katalaze je bila najveća na 100 mM NaCl a najniža na kontroli i 200 mM NaCl (*Tablica 21*). Treba naglasiti da je analiza antioksidativnog odgovora u listu paprike izvršena nakon tretmana s NaCl koji je trajao tri dana, tako da je teško uspoređivati dobivene rezultate s drugim sličnim istraživanjima provedenim u različitim eksperimentalnim uvjetima i naročito, drugim biljnim vrstama. Na primjer, u istraživanju reakcije duhana na tretman s 300 mM NaCl (Razavizadeh i Ehsanpour, 2009.), najveća ukupna aktivnost katalaze je utvrđena 48 h od primjene tretmana, paralelno s povećanom sintezom prolina. Interesantno je da u ovom istraživanju primjenjeni tretmani s donorima NO i H<sub>2</sub>S nisu imali utjecaja na aktivnosti katalaze, (*Tablice 21 i 22*), koje su stimulirane stresom do razine od 100 mM NaCl. Ukupna aktivnost gvajakol-peroksidaze je bila najveća na najvišoj razini stresa i u tretmanu s NaHS, a najmanja u tretmanu s SNP. Primjenjeni donor NO je značajno smanjio obje aktivnosti glutation-reduktaze, koje su bile značajno povećane u tretmanima s NaCl u odnosu na kontrolu.

Specifična aktivnost gvajakol-peroksidaze nije pokazala pravilnost u odnosu na razinu stresa a primjenjeni donori su djelovali jednako kao i na ukupnu aktivnost. Specifična aktivnost glutation-reduktaze je značajno povećana u tretmanima s stresom uz najveću vrijednost kod primjene NaHS i najnižu u tretmanu s SNP.



**Grafikon 10.** Utjecaj donora NO i H<sub>2</sub>S na pokazatelje stresa i antioksidativne aktivnosti u listu paprike izložene solnom stresu u rasponu 0 – 200 mM NaCl. (Prosjeci označeni različitim slovom se razlikuju prema LSD testu (<sup>A,B,C</sup>  $P=0,01$ )).

Kako je vidljivo na *grafikonu 10*, u listovima paprike gdje nisu primjenjeni tretmani s donorom NO odnosno H<sub>2</sub>S (kontrola), prosječan sadržaj peroksida je bio visok. U tretmanu s NaHS je značajno smanjen, uz veće vrijednosti GPODu, GPODs i GRu.

GY4137 je imao slabiji antioksidativni učinak pa su aktivnosti enzima, sadržaj peroksida i intenzitet lipidne peroksidacije bili na razini kontrole. Tretman s SNP je značajno smanjio sadržaj peroksida ali vjerojatno ne putem NO-stimulacije aktivnosti ispitivanih enzima, koje su bile čak niže nego u kontroli. Nasuprot tomu, Shi i sur. (2007.) su u pokusu s krastavcem tretiranom sa 100 mM NaCl u hranjivoj otopini ustanovili povećanje antioksidativne aktivnosti pod utjecajem SNP i manju lipidnu peroksidaciju te manju akumulaciju peroksida u mitohondrijima u korijenu krastavca. Osim što se u ovom istraživanju radi o drugoj vrsti i različitoj primjeni odnosno koncentraciji NaCl, može se pretpostaviti da je egzogeni NO aktivirao neke druge antioksidativne mehanizme, koji ovdje nisu analizirani, ili specifične metaboličke promjene koje doprinose otpornosti biljke na solni stres. Tu se sigurno ne može ubrojiti sinteza prolina, jer je u tretmanu s SNP njegov sadržaj bio najniži (*Tablica 20*). Prema utvrđenim vrijednostima aktivnosti enzima u kombiniranim tretmanima NO i H<sub>2</sub>S donora, može se pretpostaviti suprotan učinak primjenjenih komponenata, kao i kod efekta na promjer otvora puči. Sličan zaključak o međusobnom djelovanju H<sub>2</sub>S i NO iznose Christou i sur. (2011.), koji su izvršili predtretman korijena jagoda u hidroponu s 10 mM NaHS te izložili biljke solnom, osmotskom i toplinskom stresu. Pod utjecajem predtretmana s H<sub>2</sub>S, utvrđena je povećana provodljivost puči, viši relativni sadržaj vlage u listu, manje ispiranje iona i niža razina lipidne peroksidacije. Autori zaključuju da je H<sub>2</sub>S smanjio oksidacijski i nitrozativni stres u biljkama, putem reducirane *de novo* sinteze NO i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> te održanja visokog redoks stanja askorbata i glutaciona.

Rezultati ovog istraživanja pokazuju pozitivan učinak H<sub>2</sub>S na antioksidativnu aktivnost u listu paprike u uvjetima solnog stresa. Slične rezultate su dobiveni u istraživanju utjecaja H<sub>2</sub>S na toksičnost Cu (Zhang i sur., 2008) i Al kod pšenice (Zhang i sur., 2010.a), kod osmotskog stresa u batatu (Zhang i sur., 2009.) i sušnog stresa kod soje (Zhang i sur., 2010.c). Chen i sur. (2011.) su utvrdili povećan sadržaj klorofila, ukupnih tiola, glutaciona i cisteina, aktivnost RuBISCO te poboljšane pokazatelje fotosintetske učinkovitosti kod špinata, pri tretmanu s NaHS. Antioksidativni odgovor na sušni stres u listu i korijenu paprike su istraživali Sziderics i sur. (2010.) te utvrdili akumulaciju šećera i prolina u korijenu a poliamina u listovima. Unatoč različitoj akumulaciji prolina u listu i korijenu paprike pod stresom, razina transkripata za ključne enzime

metabolizma prolina je bila podjednaka u listu i korijenu, na temelju čega autori smatraju da je prolin sintetiziran u listovima transportiran u korijen.

Proučavanje odgovora na stres povećava naše spoznaje osnova biljne biokemije (Bohnert i sur., 1995.). U razvoju uzgojnog programa s ciljem poboljšanja tolerancije usjeva na solni stres, Arzani (2008.) smatra da je kao prvo potrebno steći znanje vezano za genetiku i fiziologiju mehanizama tolerancije. Kako je tolerancija abiotskog stresa kompleksno svojstvo, iako je identificiran velik broj gena uključenih u odgovor na abiotski stres, ostaju velike praznine u našem razumijevanju tog svojstva (Vij i Tyagi, 2007.). Desikan i sur. (2005.) smatraju da će biokemijska karakterizacija različitih izvora ROS u stanicama, zajedno s mehanizmima kojima se regulira njihovo stvaranje i uklanjanje te mehanizama prijenosa ROS signala, omogućiti daljnje funkcionalne analize kako bi se definirali oni biološki procesi u kojima ROS imaju ulogu. Autori naglašavaju da nekoliko vrsta abiotskog stresa, poput niskih i visokih temperatura, prevelikog osvjetljenja, suše i zaslanjenosti mogu poremetiti staničnu homeostazu i pojačati stvaranje ROS u stanicama. Stoga istraživanja interakcija između pojedinih signalnih komponenti mogu doprinijeti boljem poznavanju reakcija biljaka na stres i uočavanju tolerantnih genotipova, čija sposobnost prilagodbe metabolizma radi učinkovitog prevladavanja stresa može imati veliki praktični značaj u biljnoj proizvodnji.

## 7. ZAKLJUČAK

Rezultati prikazanih istraživanja upućuju na slijedeće zaključke:

1. U svim pokusima s tretmanima lista uročnjaka, ABA i SNP su stimulirali zatvaranje puči, dok su tretmani lista s donorima H<sub>2</sub>S rezultirali većim otvorom puči, čak i u odnosu na kontrolu, ovisno o varijanti osvjetljenja. Kada su oba donora H<sub>2</sub>S bila primjenjena u jednakim koncentracijama (100 μM), GYY4137 je imao jači učinak.
2. U pokusu s različitim trajanjem tame, dokazano je da se puči prirodno zatvaraju ukoliko nisu istovremeno tretirane donorima H<sub>2</sub>S. Vjerojatno je da takav učinak može imati velik značaj za intenzitet transpiracije i ulazak CO<sub>2</sub> u list. Praktičan značaj ovakvog fiziološkog djelovanja bi trebalo dalje istraživati, naročito u kulturnim biljnim vrstama, zbog potencijalnog utjecaja na produktivnost biljke.
3. U istraživanju utjecaja donora NO i donora H<sub>2</sub>S, kod obje biljne vrste (uročnjak i paprika), najmanji promjer otvora puči je utvrđen u tretmanu s SNP (donor NO) a najveći s primjenom čistog NaHS, što potvrđuje da NO sudjeluje u signalnom putu koji vodi ka zatvaranju puči a H<sub>2</sub>S djeluje suprotno.
4. Kod primjene inhibitora NO (cPTIO), u kombiniranom tretmanu cPTIO+SNP nije bilo učinka na promjer otvora puči, slično učinku tretmana s kombinacijama SNP i donora H<sub>2</sub>S. Kako je tretman s cPTIO rezultirao otvorom puči na razini kontrole a pojedinačni tretmani oba donora H<sub>2</sub>S (NaHS i GYY4137) su izazvali povećanje otvora puči u odnosu na kontrolu i cPTIO, moguće je da H<sub>2</sub>S nije samo scavenger NO već da ima određenu ulogu u signalnom putu kojim se puči otvaraju.
5. Detekcijom NO uz primjenu bojanja s DAF-2 DA i CLMS, dokazana je pojava NO pod utjecajem tretmana s ABA te smanjena akumulacija NO ako je istovremeno primjenjen neki donor H<sub>2</sub>S, kod obje ispitivane biljne vrste. ABA je jače stimulirala akumulaciju NO u pučima uročnjaka a inhibitorni učinak H<sub>2</sub>S na akumulaciju NO je bio izraženiji kod paprike.
6. Pri izlaganju biljaka uročnjaka solnom stresu (50 mM NaCl), u prosjeku za sve tretmane lista nije bilo značajnih razlika u promjeru otvora puči između kontrole i biljaka tretiranih s NaCl, ali je očigledan značaj osvjetljenja kao i značajan utjecaj donora H<sub>2</sub>S na obje varijante stresa.

7. Utjecaj genotipa je bio značajan za promjer otvora puči i kod biljaka pod stresom i kod kontrole. Ekotip Ler je u prosjeku za sve tretmane lista imao najveći otvor puči a Nia2 najmanji u obje varijante stresa.
8. Kod sva četiri ispitivana genotipa uročnjaka, osvjetljenje i donori H<sub>2</sub>S su imali jednako djelovanje. Puči su bile otvorenije kod osvjetljenih listova a najzatvorenije kod listova izloženih tami bez primjene donora H<sub>2</sub>S.
9. Kod biljaka paprike izloženih solnom stresu (150 mM NaCl), kao i u fazi oporavka nakon solnog stresa, puči su bile značajno otvorenije u odnosu na kontrolu, u prosjeku za sve tretmane lista. Solni stres je rezultirao značajno većim otvorom puči u tretmanima lista s čistim GYY4137 i u kombinaciji SNP + GYY4137.
10. Istraživanje reakcije biljaka paprike na solni stres (150 mM NaCl) pokazuje da je primjenjena razina stresa dovoljna za pokretanje antioksidativnih mehanizama u listu paprike. Intenzitet lipidne peroksidacije, sadržaj peroksida i prolina su bili značajno povećani u odnosu na kontrolu i biljke u fazi oporavka od stresa. Ukupne i specifične aktivnosti gvajakol-peroksidaze i glutation-reduktaze su bile smanjene u odnosu na kontrolne biljke a katalaza je imala najveću aktivnost u fazi oporavka od stresa.
11. U pokusu u kojem je primjenjeno više razina solnog stresa (0, 50, 100 i 200 mM NaCl) a biljke paprike su ujedno tretirane i donorima NO i H<sub>2</sub>S te njihovim kombinacijama, intenzitet lipidne peroksidacije i sadržaj peroksida su se značajno povećavali u listu paprike s povećanjem intenziteta solnog stresa. Tretmani biljke s donorima H<sub>2</sub>S su rezultirali smanjenjem navedenih pokazatelja.
12. Vrlo značajne korelacije negativnog smjera između sadržaja peroksida i specifične aktivnosti gvajakol-peroksidaze, utvrđene u tretmanima s NaHS i GYY4137 upućuju na pretpostavku da H<sub>2</sub>S može povećavati otpornost paprike na solni stres.
13. Porast intenziteta lipidne peroksidacije i sadržaja peroksida u listu paprike izložene solnom stresu praćen je povećanjem sadržaja prolina. Najveći sadržaj prolina je utvrđen u varijanti tretmana biljke s GYY4137, a značajno niži sadržaj prolina u varijantama pokusa s tretmanima biljke sa SNP.
14. Primjenjeni tretmani donorima NO i H<sub>2</sub>S nisu imali utjecaja na aktivnost katalaze u listu paprike. Ukupna aktivnost gvajakol-peroksidaze je bila najveća na najvišoj razini stresa i u tretmanu s NaHS a najmanja u tretmanu sa SNP. Primjenjeni donori

su jednako djelovali i na njenu specifičnu aktivnost. SNP je smanjio aktivnost glutation-reduktaze, pri čemu je specifična aktivnost ovog enzima značajno povećana na višim razinama stresa i u tretmanu s NaHS.

15. Tretman biljaka paprike s NaHS je značajno smanjio sadržaj peroksida te rezultirao s većim aktivnostima ispitivanih enzima, izuzev katalaze, nakon izlaganja solnom stresu. Tretman s GYY4137 je imao slabiji antioksidativni učinak pa su u prosjeku za sve varijante stresa aktivnosti enzima, sadržaj peroksida i intenzitet lipidne peroksidacije bili na razinama utvrđenim u biljkama koje nisu tretirane donorima NO ili H<sub>2</sub>S.
16. U tretmanu s donatorom NO su utvrđene najniže vrijednosti sadržaja prolina i aktivnosti pojedinih enzima kao i manji sadržaj peroksida, što ukazuje na mogućnost NO-stimulacije nekih drugih antioksidativnih mehanizama u listu paprike u uvjetima solnog stresa.
17. Utvrđene aktivnosti ispitivanih enzima u listu paprike u kombiniranim tretmanima NO i H<sub>2</sub>S donora, ukazuju na suprotan učinak primjenjenih komponenata, odnosno međusobno poništavanje pojedinačnih učinaka.
18. U cjelini, rezultati ovog istraživanja pokazuju pozitivan učinak H<sub>2</sub>S na antioksidativnu aktivnost u listu paprike u uvjetima solnog stresa, a GYY4137 se može smatrati prikladnim donatorom H<sub>2</sub>S za istraživanje funkcija H<sub>2</sub>S u biljkama.

## 8. LITERATURA

1. Aebi H (1984) Catalase *in vitro*. Methods in Enzymology 105: 121-126.
2. Ali MY, Cheong YP, Mok Y-YP, Whiteman M, Bhatia M, Moore PK (2006) Effect of hydrogen sulfide and nitric oxide alone and together on rat aortic contractility and blood pressure. British Journal of Pharmacology 149: 625-634.
3. Altman A, Hasegawa M (2011) Plant Biotechnology and Agriculture. Elsevier: 586 p.
4. Aneja V, Schlesinger WH, Erisman JW (2008) Farming pollution. Nature Geoscience 1: 409-411.
5. Arora A, Sairam RK, Srivastava GC (2002) Oxidative stress and antioxidative system in plants. Current Science 82(10): 1227-1238.
6. Arzani A (2008) Improving salinity tolerance in crop plants: a biotechnological view. In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant 44: 373-383.
7. Atta AA (2010) Stomatal closure of *Arabidopsis thaliana* L. and *Tradescantia virginiana* L. after growth at higher relative air humidity. MSc thesis, Wageningen University and Research Centre, Netherlands: 47 pp.
8. Bacci E, Gaggi C, Lanzillotti E, Ferrozzi S, Valli L (2000) Geothermal power plants at Mt. Amiata (Tuscany–Italy): mercury and hydrogen sulphide deposition revealed by vegetation. Chemosphere 40: 907-911.
9. Banerjee R (2011) Hydrogen Sulfide: Redox Metabolism and Signaling. Antioxidants & Redox Signaling 15(2): 339-341.
10. Bartels D, Sunkar R (2005) Drought and salt tolerance in plants. Critical Reviews in Plant Sciences 24: 23-58.
11. Bates LS, Waldern RP, Teare ID (1973) Rapid determination of free proline for water stress studies. Plant and Soil 39: 205–207.



12. Bethke PC, Badger MR, Jones RL (2004) Apoplastic synthesis of nitric oxide by plant tissues. *The Plant Cell* 16: 332-341.
13. Bethke PC, Libourel IG, Jones RL (2006) Nitric oxide reduces seed dormancy in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany* 57: 517-26.
14. Pooja B-M, Vadez V, Kiran KS (2008) Transgenic approaches for abiotic stress tolerance in plants: retrospect and prospects. *Plant Cell Reports* 27: 411–424.
15. Bhattacharjee S (2005) Reactive oxygen species and oxidative burst: Roles in stress, senescence and signal transduction in plants. *Current Science* 89(7): 1113-1121.
16. Bloem E, Riemenschneider A, Volker J, Papenbrock J, Schmidt A, Salac I *et al.* (2004) Sulphur supply and infection with *Pyrenopeziza brassica* influence L-cysteine desulhydrase activity in *Brassica napus* L. *Journal of Experimental Botany* 55: 2305–2312.
17. Bohnert HJ, Nelson DE, Jensen RG (1995) Adaptations to environmental stresses. *The Plant Cell* 7: 1099-1111.
18. Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
19. Brewer CA, (1992) Responses by stomata on leaves to microenvironmental conditions. Pages 67-77, in *Tested studies for laboratory teaching*, Volume 13 (C. A. Goldman, Editor). *Proceedings of the 13<sup>th</sup> Workshop/Conference of the Association for Biology Laboratory Education (ABLE)*: 67-75 p.
20. Bright J, Desikan R, Hancock JT, Neill SJ (2006) ABA-induced NO generation and stomatal closure in *Arabidopsis* are dependent on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> synthesis. *Plant Journal* 45: 113-122.
21. Chen J, Wu F-H, Wang W-H, Zheng C-J, Lin G-H, Dong X-J, He J-X, Pei Z-M, Zheng H-L (2011) Hydrogen sulphide enhances photosynthesis through promoting chloroplast biogenesis, photosynthetic enzyme expression, and thiol redox

- modification in *Spinacia oleracea* seedlings. *Journal of Experimental Botany* 62(13): 4481–4493.
22. Christou A, Manganaris G, Papadopoulos I, Fotopoulos V (2011) The importance of hydrogen sulfide as a systemic priming agent in strawberry plants grown under key abiotic stress factors. 4<sup>th</sup> International Workshop - COST Action FA0605, Plant Abiotic Stress: From Systems Biology to Sustainable Agriculture, 17-19 November 2011, Limassol, Cyprus. Book of abstracts: 47 p.
  23. Chookhampaeng S (2011) The effect of salt stress on growth, chlorophyll content, proline content and antioxidative enzymes of pepper (*Capsicum annuum* L.) seedling. *European Journal of Scientific Research* 49(1): 103-109.
  24. Crawford NM (2006) Mechanisms for nitric oxide synthesis in plants. *Journal of Experimental Botany* 57(3): 471-478.
  25. De Kok LJ, Bosma W, Maas FM, Kuiper PJC (1985) The effect of short-term H<sub>2</sub>S fumigation on water-soluble sulphhydryl and glutathione levels in spinach. *Plant, Cell and Environment* 8: 189-194.
  26. Delledonne M (2005) NO news is good news for plants. *Current Opinion in Plant Biology* 8: 390-396.
  27. Desikan R (2010) Sniffing stomata? *New Phytologist* 188: 910-913.
  28. Desikan R, Cheung M-K, Bright J, Henson D, Hancock JT, Neill SJ (2004) ABA, hydrogen peroxide and nitric oxide signalling in stomatal guard cells. Crosstalk in Plant Signal Transduction Special Issue, *Journal of Experimental Botany* 55(395): 205-212.
  29. Desikan R, Griffiths R, Hancock JT, Neill SJ (2002) A new role for an old enzyme Nitrate reductase-mediated nitric oxide generation is required for abscisic acid-induced stomatal closure in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Science, USA* 99: 16319-16324.

30. Desikan R, Hancock J, Neill S (2005) Reactive oxygen species as signaling molecules. In: Antioxidants and Reactive Oxygen Species in Plants. Smirnoff N (ed.), Blackwell Publishing: 169-196.
31. Dorman DC, Moulin FJ, McManus BE, Mahle KC, James RA, Struve MF (2002) Cytochrome oxidase inhibition induced by acute hydrogen sulfide inhalation: correlation with tissue sulfide concentrations in the rat brain, liver, lung, and nasal epithelium. *Toxicological Sciences* 65: 18-25.
32. García-Mata C, Gay R, Sokolovski S, Hills A, Lamattina L, Blatt MR (2003) Nitric oxide regulates  $K^+$  and  $Cl^-$  channels in guard cells through a subset of abscisic acid-evoked signaling pathways. *Proceedings of the National Academy of Science, USA* 100(19): 11116–11121.
33. García-Mata C, Lamattina L (2001) Nitric oxide induces stomatal closure and enhances the adaptive plant responses against drought stress. *Plant Physiology* (126): 1196–1204.
34. García-Mata C, Lamattina L (2002) Nitric oxide and abscisic acid cross talk in guard cells. *Plant Physiology* 128: 790-792.
35. García-Mata C, Lamattina L (2007) Abscisic acid (ABA) inhibits light-induced stomatal opening through calcium- and nitric oxide-mediated signaling pathways. *Nitric Oxide* 17: 143-151.
36. García-Mata C, Lamattina L (2010) Hydrogen sulphide, a novel gasotransmitter involved in guard cell signaling. *New Phytologist* 188: 977-984.
37. Gas E, Flores-Pérez Ú, Sauret-Güeto S, Rodríguez-Concepción M (2009) Hunting for plant nitric oxide synthase provides new evidence of a central role for plastids in nitric oxide metabolism. *The Plant Cell* 21: 18-23.
38. Gergel D, Cederbaum AI (1996) Inhibition of the Catalytic Activity of Alcohol Dehydrogenase by Nitric Oxide Is Associated with S Nitrosylation and the Release of Zinc. *Biochemistry* 35: 16186-16194.

39. Gémes K, Poór P, Horváth E, Kolbert Z, Szopkó D, Szepesi A, Tari I (2011) Cross-talk between salicylic acid and NaCl-generated reactive oxygen species and nitric oxide in tomato during acclimation to high salinity. *Plant Physiology* 142(2): 179-92.
40. Grün S, Lindermayr C, Sell S, Durner J (2006) Nitric oxide and gene regulation in plants. *Journal of Experimental Botany* 57: 507-516.
41. Halliwell B (2006) Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiology* 141: 312-322.
42. Hällgren J-E, Fredriksson S-A (1982) Emission of hydrogen sulfide from sulfur dioxide-fumigated pine trees. *Plant Physiology* 70: 456-459.
43. Hancock JT, Desikan R, Clarke A, Hurst RD, Neill SJ (2001) Cell signalling following plant/pathogen interactions involves the generation of reactive oxygen and reactive nitrogen species. *Plant Physiology and Biochemistry* 40: 611-617.
44. Hancock, JT (2009) The role of redox mechanisms in cell signalling. *Molecular Biotechnology* 43: 162-166.
45. Hancock JT (2010) Cell signalling. Third edition, Oxford University Press: 368 pp.
46. Hancock JT, Lisjak M, Teklić T, Wilson ID, Whiteman M. (2011) Hydrogen sulphide and signalling in plants. *CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources* 6: No. 012.
47. Heath RL, Packer L (1968) Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I-Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 125: 189-198.
48. Herschbach C, van der Zalm E, Schneider A, Jouanin L, De Kok LJ, Rennenberg H (2000) Regulation of sulfur nutrition in wild-type and transgenic poplar over-expressing  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase in the cytosol as affected by atmospheric H<sub>2</sub>S. *Plant Physiology* 124: 461-474.

49. Hu X, Neill SJ, Tang Z, Cai W (2005) Nitric Oxide mediates gravitropic bending in soybean roots. *Plant Physiology* 137: 663-670.
50. Ince AG, Karaca M, Onus AN (2010) Polymorphic microsatellite markers transferable across *Capsicum* species. *Plant Molecular Biology Reporter* 28: 285-291.
51. Jiang Y, Yang B, Harris NS, Deyholos MK (2007) Comparative proteomic analysis of NaCl stress-responsive proteins in *Arabidopsis* roots. *Journal of Experimental Botany*: 1-17.
52. Jin J-W, Xu Y-F, Huang Y-F (2010) Protective effect of nitric oxide against arsenic-induced oxidative damage in tall fescue leaves. *African Journal of Biotechnology* 9(11): 1619-1627.
53. Kaymakanova M, Stoeva N, Mincheva T (2008) Salinity and its effects on the physiological response of bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of Central European Agriculture* 9(4): 749-756.
54. Kimura H. (2000) Hydrogen sulfide induces cyclic AMP and modulates the NMDA receptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 267: 129-133.
55. King GM, Klug MJ, Weigert RG, Chalmers AG (1982) Relation of soilwater movement and sulphide concentration to *Spartina alterniflora* production in a Georgia salt marsh. *Science* 218: 61-63.
56. Koch MS, Mendelssohn IA, McKee KL (1990) Mechanism for the hydrogen sulphide-induced growth limitation in wetland macrophytes. *Limnology and Oceanography* 35: 399-408.
57. Koch MS, Erskine JM (2001) Sulfide as a phytotoxin to the tropical seagrass *Thalassia testudinum*: interactions with light, salinity and temperature. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 266: 81-95.
58. Kourtidis K, Kelesis A, Petrakakis M (2008) Hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) in urban ambient air. *Atmospheric Environment* 42: 7476-7482.

59. Kubo S, Kurokawa Y, Doe I, Masuko T, Sekiguchi F, Kawabata A (2007) Hydrogen sulfide inhibits activity of three isoforms of recombinant nitric oxide synthase. *Toxicology* 241: 92-97.
60. Li J-H, Liu Y-Q, Lu P, Lin H-F, Bai Y, Wang X-C, Chen Y-L (2009) A signaling pathway linking nitric oxide production to heterotrimeric G-protein and hydrogen peroxide regulates extracellular calmodulin induction of stomatal closure in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 150: 114-124.
61. Li L, Salto-Tellez M, Tan C, et al. (2009) GYY4137, a novel hydrogen sulfide-releasing molecule, protects against endotoxic shock in the rat. *Free Radical Biology and Medicine* 47: 103-113.
62. Li L, Whiteman M, Guan YY, et al. (2008) Characterization of a novel, water-soluble hydrogen sulfide releasing molecule (GYY4137): New insights into the biology of hydrogen sulfide. *Circulation* 117: 2351-2360.
63. Lozano-Juste J, León J (2011) Nitric oxide regulates DELLA content and *PIF* expression to promote photomorphogenesis in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 156(3): 1410-1423.
64. MacRobbie EAC (1992) Calcium and ABA-induced stomatal closure. *Philosophical Transactions of The Royal Society B: Biological Sciences* 338: 5-18.
65. Men L, Wang Y (2007) The oxidation of yeast alcohol dehydrogenase-1 by hydrogen peroxide in vitro. *Journal of Proteome Research* 6: 216-225.
66. Mancardi D, Penna C, Merlino A, Del Soldato P, Wink DA, Pagliaro P (2009) Physiological and pharmacological features of the novel gasotransmitter: Hydrogen sulfide. *Biochimica et Biophysica Acta* 1787: 864-872.
67. Mittler R (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science* 7(9): 405-410.
68. Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M, Van Breusegem F (2004) Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in Plant Science* 9(10): 490-498.

69. Moreau M, Lee GI, Wang Y, Crane BR, Klessig DF (2008) AtNOS/AtNOA1 is a functional *Arabidopsis thaliana* cGTPase and not nitric-oxide synthase. *The Journal of Biological Chemistry* 283(47): 32957-32967.
70. Morse JW, Millero FJ, Cornwell JC, Rickard D (1987) The chemistry of the hydrogen sulfide and iron sulfide systems in natural waters. *Earth-Science Reviews* 24: 1-42.
71. Mukherjee SP, Choudhuri MA (1983) Implications of water stress-induced changes in the levels of endogenous ascorbic acid and hydrogen peroxide in *Vigna* seedlings. *Physiologia Plantarum* 58: 166-170.
72. Mur LAJ, Carver TLW, Prats E (2006) NO way to live; the various roles of nitric oxide in plant-pathogen interactions. *Journal of Experimental Botany* 57(3): 489-505.
73. Neill SJ, Desikan R, Clarke A, Hancock JT (2002a) Nitric oxide is a novel component of abscisic acid signaling in stomatal guard cells. *Plant Physiology* 128: 13-16.
74. Neill SJ, Desikan R, Clarke A, Hancock JT (2002b) Hydrogen peroxide signaling. *Current Opinion in Plant Biology* 5: 388-395.
75. Neill SJ, Desikan R, Clarke A, Hurst RD, Hancock JT (2002c) Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants. *Antioxidants and Reactive Oxygen Species in Plants Special Issue, Journal of Experimental Botany* 53: 1237-1247.
76. Neill S, Bright J, Desikan R, Hancock J, Harrison J, Wilson I (2008b) Nitric oxide evolution and perception. *Transport of Plant Growth Regulators Special Issue, Journal of Experimental Botany* 59(1): 25-35.
77. Neill S, Barros R, Bright J, Desikan R, Hancock J, Harrison J, Morris P, Ribeiro D, Wilson I (2008a) Nitric oxide, stomatal closure, and abiotic stress. *Journal of Experimental Botany* 59(2): 165-176.

78. Pengelly C, Wilson I, Hancock JT (2010) Nitric oxide scavenging by food: implications for *in vivo* effects of diet. *British Journal of Biomedical Science* 67(1): 15-19.
79. Planchet E, Kaiser WM (2006) Nitric oxide (NO) detection by DAF fluorescence and chemiluminescence: a comparison using abiotic and biotic NO sources. *Journal of Experimental Botany* 57(12): 3043-3055.
80. Postgate J (1959) Sulphate reduction by bacteria. *Annual Review of Microbiology* 13: 505-520.
81. Razavizadeh R, Ehsanpour AA (2009) Effects of salt stress on proline content, expression of delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthetase, and activities of catalase and ascorbate peroxidase in transgenic tobacco plants. *Biological Letters* 46(2): 63-75.
82. Ribeiro DM (2007) Re-evaluation of the role of nitric oxide as a component of abscisic acid signalling pathway in guard cells. PhD dissertation. Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brazil: 68 p.
83. Riemenschneider A, Nikiforova V, Hoefgen R, De Kok LJ, Papenbrock J (2005) Impact of elevated H<sub>2</sub>S on metabolite levels, activity of enzymes and expression of genes involved in cysteine metabolism. *Plant Physiology and Biochemistry* 43: 473-483.
84. Rennenberg H (1983) Role of O-acetylserine in hydrogen sulphide emission from pumpkin leaves in response to sulphate. *Plant Physiology* 73: 560-565.
85. Robinson MF, Véry A-A, Sanders D, Mansfield, TA (1997) How can stomata contribute to salt tolerance? *Annals of Botany* 80: 387-393.
86. Sekiya J, Schmidt A, Rennenberg H, Wilson LG, Filner P (1982a) Hydrogen sulfide emission by cucumber leaves in response to sulfate in light and dark. *Phytochemistry* 21: 2173-2178.



87. Sekiya J, Wilson LG, Filner P (1982b) Resistance to injury by sulfur dioxide: correlation with its reduction to, and emission of, hydrogen sulfide in Cucurbitaceae. *Plant Physiology* 70: 437-441.
88. She X-P, Li J, Huang A-X, Han X-Z (2010) Fusicoccin inhibits dark-induced stomatal closure by reducing nitric oxide in the guard cells of broad bean. *Australian Journal of Botany* 58(2): 81–88.
89. Shi Q, Ding F, Wang X, Wei M (2007) Exogenous nitric oxide protect cucumber roots against oxidative stress induced by salt stress. *Plant Physiology and Biochemistry* 45: 542-550.
90. Siegel BZ, Galston W (1967): The peroxidase of *Pisum sativum*. *Plant Physiology* 42: 221-226.
91. Siegel L (1965) A direct microdetermination for sulfide. *Analytical Biochemistry* 11: 126-132.
92. Simpson GG (2005) NO flowering. *Bioessays* 27: 239-241.
93. Smith AM, Coupland G, Dolan L, Harberd N, Jones J, Martin C, Sablowski R, Amey A (2010) *Plant Biology*. Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC: 664 p.
94. Stuiver CEE, De Kok LJ, Kuiper PJC (1992) Freezing tolerance and biochemical changes in wheat shoots as affected by H<sub>2</sub>S fumigation. *Plant Physiology and Biochemistry* 30: 47–55.
95. Szabados L, Kovács H, Zilberstein A, Bouchereau A (2011) *Plants in Extreme Environments: Importance of Protective Compounds in Stress Tolerance*. U: Jean-Claude Kader and Michel Delseny, ur.: *Advances in Botanical Research*, Burlington, Academic Press 57: 105-150.
96. Sziderics AH, Oufir M, Trognitz F, Kopecky D, Matušiková I, Hausman J-F, Wilhelm E (2010) Organ-specific defence strategies of pepper (*Capsicum annuum* L.) during early phase of water deficit. *Plant Cell Reports* 29: 295-305.

97. Takemoto BK, Noble RD, Harrington HM (1986) Differential sensitivity of duckweeds (*Lemnaceae*) to sulfite: II. Thiol production and hydrogen sulphide emission as factors influencing sulphite phytotoxicity under low and high irradiance. *New Phytologist* 103: 541-548.
98. Thompson CR, Kats G (1978) Effects of continuous hydrogen sulphide fumigation on crop and forest plants. *Environmental Science Technology* 12: 550-553.
99. Türkan I, Demiral T (2009) Recent developments in understanding salinity tolerance. *Environmental and Experimental Botany* 67(1): 2-9.
100. Vij S, Tyagi AK (2007) Emerging trends in the functional genomics of the abiotic stress response in crop plants. *Plant Biotechnology Journal* 5: 361-380.
101. Vinocur B, Altman A (2005) Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress: achievements and limitations. *Current Opinion in Biotechnology* 16: 123-132.
102. Vranová E, Inzé D, Van Breusegem F (2002) Signal transduction during oxidative stress. *Antioxidants and Reactive Oxygen Species in Plants Special Issue, Journal of Experimental Botany* 53(372): 1227-1236.
103. Wang R (2002) Two's company, three's a crowd: can H<sub>2</sub>S be the third endogenous gaseous transmitter? *The FASEB Journal* 16: 1792-1798.
104. Wang R (2003) The gasotransmitter role of hydrogen sulfide. *Antioxidants and Redox Signaling* 5: 493-501.
105. Wang R (2010) Hydrogen sulfide: The third gasotransmitter in biology and medicine. *Antioxidants and Redox Signaling* 12(9): 1061-1064.
106. Wang Y-f, Mainali P, Tang C-s, Shi L, Zhang C-y, Yan H, Liu X-q, Du J-b (2008) Effects of nitric oxide and hydrogen sulfide on the relaxation of pulmonary arteries in rats. *Chinese Medical Journal* 121: 420-423.

107. Westerman S, Stulen I, Suter M, Brunold C, De Kok LJ (2001) Atmospheric H<sub>2</sub>S as sulphur source for *Brassica oleracea*: Consequences for the activity of the enzymes of the assimilatory sulphate reduction pathway. *Plant Physiology and Biochemistry* 39: 425-432.
108. Whiteman M, Li L, Kostetski I, Chu SH, Siau J-L, Bhatia M, Moore PK (2006) Evidence for the formation of a novel nitrosothiol from the gaseous mediators nitric oxide and hydrogen sulfide. *Biochemistry and Biophysical Research Communications* 343: 303-310.
109. Whiteman M, Moore PK (2009) Hydrogen sulfide and the vasculature: a novel vasculoprotective entity and regulator of nitric oxide bioavailability? *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 13: 488-507.
110. Whiteman M, Li L, Rose P, Tan CH, Parkinson DB, Moore PK, (2010) The effect of hydrogen sulfide donors on lipopolysaccharide-induced formation of inflammatory mediators in macrophages. *Antioxidants and Redox Signaling* 12: 1147-1154.
111. Wilson ID, Neill SJ, Hancock JT (2008) Nitric oxide synthesis and signalling in plants. *Plant, Cell and Environment* 31: 622-631.
112. Wilson ID, Ribeiro DM, Bright J, Confraria A, Harrison J, Barros RS, Desikan R, Neill SJ, Hancock JT (2009) Role of nitric oxide in regulating stomatal apertures. *Plant Signaling and Behavior* 4(5): 467-469.
113. Wilson LG, Bressan RA, Filner P (1978) Light-dependent emission of hydrogen sulphide from plants. *Plant Physiology* 61: 184-189.
114. Wulff A, Oliveira HC, Saviani E, Salgado I (2009) Nitrite reduction and superoxide-dependent nitric oxide degradation by *Arabidopsis* mitochondria: Influence of external NAD(P)H dehydrogenases and alternative oxidase in the control of nitric oxide levels. *Nitric Oxide* 21: 132–139.
115. Youssefian S, Nakamura M, Sano H (1993) Tobacco plants transformed with the O-acetylserine (thiol) lyase gene of wheat are resistant to toxic levels of hydrogen sulphide gas. *The Plant Journal* 4: 759-769.

116. Zhang H, Hu LY, Hu KD, He YD, Wang SH, Luo JP (2008a) Hydrogen sulfide promotes wheat seed germination and alleviates the oxidative damage against copper stress. *Journal of Integrative Plant Biology* 50: 1518-1529.
117. Zhang H, Ye Y-K, Wang S-H, Luo J-P, Tang J., Ma D-F (2009a) Hydrogen sulphide counteracts chlorophyll loss in sweetpotato seedling leaves and alleviates oxidative damage against osmotic stress. *Plant Growth Regulation* 58: 243-250.
118. Zhang H, Tang J, Liu X-P, Wang Y, Yu W, Peng W-Y, Fang F, Ma DF, Wei Z-J, Hu L-Y (2009b) Hydrogen sulfide promotes root organogenesis in *Ipomoea batatas*, *Salix matsudana* and *Glycine max*. *Journal of Integrative Plant Biology* 51(12): 1086–1094.
119. Zhang H, Tan ZQ, Hu LY, Wang SH, Luo JP, Jones RL (2010a) Hydrogen sulfide alleviates aluminum toxicity in germinating wheat seedlings. *Journal of Integrative Plant Biology* 52: 556-567.
120. Zhang H, Dou W, Jiang C-X, Wei Z-J, Liu J, Jones RL (2010b) Hydrogen sulfide stimulates  $\beta$ -amylase activity during early stages of wheat grain germination. *Plant Signaling & Behaviour* 5: 1031-1033.
121. Zhang H, Jiao H, Jiang C-X, Wang S-H, Wei Z-J, Luo J-P, Jones RL (2010c) Hydrogen sulfide protects soybean seedlings against drought-induced oxidative stress. *Acta Physiologiae Plantarum* 32: 849-857.
122. Zhang JZ, Creelman, RA, Zhu J-K (2004) From laboratory to field. Using information from *Arabidopsis* to engineer salt, cold and drought tolerance in crops. *Plant Physiology* 135: 615-621.
123. Zhang L, De Schryver P, De Gussem B, De Muyenck W, Boon N, Verstraete W (2008b) Chemical and biological technologies for hydrogen sulfide emission control in sewer systems: A review. *Water Research* 42: 1-12.
124. Zhang L, Zhou S, Xuan Y, Sun M, Zhao L (2009) Protective effect of nitric oxide against oxidative damage in *Arabidopsis* leaves under ultraviolet - B irradiation. *Journal of Plant Biology* 52(2): 135-140.

125. Xiong L, Schumaker KS, Zhu J-K (2002) Cell signaling during cold, drought and salt stress. *The Plant Cell*, Supplement: 165-183.
126. Xu J, Yin H, Li Y, Liu X (2010) Nitric oxide is associated with long-term zinc tolerance in *Solanum nigrum*. *Plant Physiology* 154: 1319-1334.
127. Žarković N, Lončarić I, Čipak A, Jurić G, Wonisch W, Borović S, Waeg G, Vuković T, Žarković K (2001) Patofiziološke značajke sekundarnih glasnika slobodnih radikala i oksidativni stres. U: Oksidativni stres i djelotvornost antioksidansa. Bradamante V, Lacković Z (ed.), Medicinska naklada, Zagreb, pp.: 13-32.

## 9. SAŽETAK

U ovom istraživanju je provedena serija pokusa s više genotipova uročnjaka (*Arabidopsis thaliana* L.) i paprike (*Capsicum annuum* L.) u kontroliranim uvjetima klima komore, s ciljem utvrđivanja fiziološke uloge H<sub>2</sub>S u biljkama i njegovog potencijalnog djelovanja kao signalne komponente, naročito u interakciji s NO signalnim putevima. Poseban naglasak je stavljen na mehanizam rada puči i prijenos signala u njihovom otvaranju i zatvaranju. Također, istraživana je učinak tretmana biljaka paprike s H<sub>2</sub>S u uvjetima solnog stresa. Kod obje biljne vrste je utvrđeno da primjenjeni donori H<sub>2</sub>S, NaHS i GYY4137, inhibiraju zatvaranje puči smanjujući akumulaciju NO, za koju je dokazano da se javlja pri tretmanu puči s donorom SNP ili s ABA. Djelovanje NO i H<sub>2</sub>S je bilo suprotno i u reakciji biljaka paprike na solni stres, pri čemu je povećana antioksidativna aktivnost u listu utvrđena nakon tretmana s H<sub>2</sub>S, naročito s NaHS. Također, GYY4137 se može smatrati prikladnim donorom H<sub>2</sub>S za istraživanje funkcija H<sub>2</sub>S u biljkama. Rezultati istraživanja ukazuju na interakcije H<sub>2</sub>S i NO u staničnom prijenosu signala u biljkama, kako u normalnim uvjetima tako i kod solnog stresa. Daljnja istraživanja ovakvog tipa bi trebala još preciznije definirati funkcije H<sub>2</sub>S u biljnom metabolizmu, zbog potencijalne praktične vrijednosti tih spoznaja za povećanje otpornosti biljaka na stres i poboljšanje njihove produktivnosti.

## 10. ABSTRACT

This research comprehends a set of experiments with several thale cress (*Arabidopsis thaliana* L.) and pepper (*Capsicum annuum* L.) genotypes in controlled conditions using growth chambers, with the aim of determining the physiological role of hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) in plants, as well as its potential effect as a signaling compound, in particular in potential interaction with nitric oxide (NO) signaling pathways. Special emphasis was focused on stomatal mechanisms and signaling in their opening and closing. Moreover, the effect of treatment of pepper plants with H<sub>2</sub>S was investigated in salt stress conditions. It was established that the applied H<sub>2</sub>S donors, NaHS and GYY4137, inhibit stomata closing in both plant species through the reduction of NO accumulation in stomata, which was proven to occur in SNP or ABA treatment. The effects of NO and H<sub>2</sub>S were opposite in pepper plants response to salt stress as well, with increased antioxidative activity in leaf obtained after H<sub>2</sub>S treatments, and with NaHS in particular. In addition, GYY4137 could be considered as a convenient H<sub>2</sub>S donor for research into H<sub>2</sub>S functions in plants. The results point out the interactions of H<sub>2</sub>S and NO in plant cell signaling, in normal as well as in salt stress conditions. Further research of this type should uncover H<sub>2</sub>S functions in plant metabolism more precisely, especially considering the potential practical value of this knowledge for plant stress resistance improvement and their productivity enhancement.

## 11. ŽIVOTOPIS

Rođen sam 24. srpnja 1981. godine u Čakovcu. Osnovnu školu završio sam 1995., a Opću gimnaziju 1999. godine u Čakovcu. Godine 1999. upisujem Poljoprivredni fakultet u Osijeku, smjer ratarstvo. Tijekom studiranja primio sam dvije rektorove nagrade za seminarske radove u akademskoj godini 2002./2003. i 2003./2004. Diplomirao sam 5. svibnja 2006. godine. 2007. godine upisao sam interdisciplinarni doktorski studij "Molekularne bioznanosti". Od 1. prosinca 2007. do danas radim na Poljoprivrednom fakultetu kao znanstveni novak na projektu MZOŠ 079-0559, „Fiziološki mehanizmi otpornosti biljaka na abiotski stres“, voditeljice prof.dr.sc. Tihane Teklić, na Katedri za fiziologiju i ishranu bilja, Zavoda za agroekologiju. Godine 2008. pohađao sam metodološki tečaj iz biologije i medicine pod nazivom "DNA i RNA" na Institutu Ruđer Bošković. U sklopu stipendije zaklade "British Scholarship Trust", proveo sam dva mjeseca (od 15. listopada do 15. prosinca 2009.) u laboratorijima "University of the West of England", u Bristolu, Engleska, radeći na istraživanjima uloge i interakcije H<sub>2</sub>S i NO, u prijenosu staničnog signala. 2010. godine u Engleskoj je pokrenut postupak za dobivanje patenta na rezultate prethodno navedenih istraživanja. Iste godine dobio sam stipendiju Hrvatske nacionalne zaklade za znanost, visoko školstvo i tehnološki razvoj Republike Hrvatske, u sklopu koje sam proveo šest mjeseci (od 1. listopada 2010. do 1. ožujka 2011.) u laboratorijima „Centre for Research in Biosciences“, prethodno navedene institucije u Engleskoj, nadovezujući se na istraživanja obavljena u 2009. godini. Sudjelujem u bilateralnom znanstveno-istraživačkom projektu Republika Hrvatska - Republika Srbija „Istraživanje otpornosti biljaka na abiotski stres“. Sudjelovao sam na nekoliko domaćih i međunarodnih znanstvenih skupova agronoma i biljnih fiziologa. Kao autor i koautor objavio sam sedam a1, sedam a2 i sedam a3 rada. Član sam Hrvatskog društva za biljnu biologiju. Oženjen sam.