



UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA AGRONOMIJO

Sara ŠUŠTARŠIČ

KAKO MERITI STRES PRI RASTLINAH?

DIPLOMSKI PROJEKT

Univerzitetni študij – 1. stopnja

Ljubljana, 2012

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA AGRONOMIJO

Sara ŠUŠTARŠIČ

KAKO MERITI STRES PRI RASTLINAH?

DIPLOMSKI PROJEKT
Univerzitetni študij – 1. stopnja

HOW TO MEASURE PLANT STRESS?

B. SC. THESIS
Academic Study Programmes

Ljubljana, 2012

Diplomski projekt je zaključek Univerzitetnega študija Kmetijstvo – agronomija – 1. stopnja. Projekt je bil opravljen na Biotehniški fakulteti Oddelka za agronomijo Katedre za fiziologijo rastlin.

Študijska komisija Oddelka za agronomijo je za mentorja diplomskega projekta imenovala prof. dr. Dominika Vodnika.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: izr. prof. dr. Marina Pintar
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Član: prof. dr. Dominik Vodnik
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Član: izr. prof. dr. Robert Veberič
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Datum zagovora: 27. september, 2012

Diplomski projekt je rezultat lastnega dela. Podpisana se strinjam z objavo svojega diplomskega projekta na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je projekt, ki sem ga oddala v elektronski obliki, identičen tiskani verziji.

Sara ŠUŠTARŠIČ

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Du1
DK UDK 581.5:581.19(043.2)
KG rastlina/ rastne razmere/ ekologija rastlin/ stres/ obrambni mehanizmi/ biotski dejavniki/ abiotski dejavniki/ kazalci stresa/ metode merjenja
AV ŠUŠTARŠIČ, Sara
SA VODNIK, Dominik (mentor)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo
LI 2012
IN KAKO MERITI STRES PRI RASTLINAH?
TD Diplomski projekt (Univerzitetni študij – 1. stopnja)
OP VII, 18, [1] str., 1 pregl., 7 sl., 18 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI Vsi živi organizmi so večkrat med svojim razvojem in rastjo izpostavljeni stresu, izjeme niso niti rastline. Rastlinam povzročajo stres biotski in abiotski dejavniki. Odzivnost rastlin na stres je odvisna od okolja v katerem rastlina živi, predvsem pa od rastline same ter njenih obrambnih mehanizmov. Rastline so razvile v namen obrambe na stres različne mehanizme, s katerimi se stresu ubranijo ali se nanj prilagodijo. Prilagoditev in obramba rastline na stres je odvisna od mnogih dejavnikov, kot so vrsta, jakost, trajanje stresa. V diplomski nalogi opisujemo kaj stres pravzaprav je in na kakšen način vpliva na rastlino ter kako stres pri rastlini prepoznamo. Poznamo specifične in nespecifične kazalce stresa, na podlagi katerih prepoznamo stres rastlin in s katerimi lahko stres tudi izmerimo. V nalogi predstavljamo najpogosteje uporabljene metode za merjenje stresa ter primere njihove uporabe.

KEY WORDS DOCUMENTATION

ND Du1
DC UDC 581.5:581.19(043.2)
CX plants/ growing conditions/ plant ecology/ stress/ stress indicators/ biotic factors/ abiotic factors/ defense mechanisms/ measurement methods
AU ŠUŠTARŠIČ, Sara
AA VODNIK, Dominik (supervisor)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Agronomy
PY 2012
TI HOW TO MEASURE STRESS IN PLANTS?
DT B. Sc. Thesis (Academic Study Programmes)
NO VII, 18, [1] p., 1 tab., 7 fig., 18 ref.
LA sl
AL sl/en
AB During development and growth all living organisms are repeatedly exposed to stress, and plants are no exception. The factors that cause stress are biotic and abiotic stressors. Plants' response to stress depends on the environment the plant lives in, but first of all on the plant itself and its defense mechanisms. In order to protect themselves from stress, plants have developed various mechanisms to resist or to adapt to stress. Adaptation and resistance to stress depend on many factors such as type, intensity and duration of stress. In this thesis it is described what stress is, how it affects the plant and how to recognize stress in plants. On the basis of specific and non-specific stress indicators we are able to recognize and even measure stress. In the dissertation the most commonly used methods for measuring plant stress and the examples of their use are presented.

KAZALO VSEBINE

	Str.
Ključna dokumentacijska informacija (KDI)	III
Key words documentation (KWD)	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo preglednic	VI
Kazalo slik	VI
Okrajšave in simboli	VII
1 UVOD	1
2 RASTLINE IN STRES	2
2.1 ODZIV RASTLIN NA STRESNE DEJAVNIKE	2
2.2 PREPOZNAVANJE STRESA	4
2.2.1 Nespecifični kazalci stresa	4
2.2.2 Specifični kazalci stresa	5
3 MERJENJE STRESA	6
3.1 FLUORESCENCA	6
3.2 KSANTOFILNI CIKEL	8
3.3 OBRAMBNI MEHANIZMI ZA ODSTRANJEVANJE REAKTIVNIH OBLIK KISIKA	11
3.4 SINTEZA PROTEINOV, SPECIFIČNIH NA POSAMEZNI STRESNI DEJAVNIK	15
4 SKLEPI	16
5 VIRI	17
ZAHVALA	

KAZALO PREGLEDNIC

	Str.
Preglednica 1: Rezultati testov na izbrane biokemijske in fiziološke parametre pri jablani sorte 'Elstar', izpostavljeni zmerni ali hudi suši, v primerjavi s kontrolnimi rastlinami (Šircelj, 2007)	14

KAZALO SLIK

	Str.
Slika 1: Fazni model stresnih dogodkov in odzivov (Larcher, 2001)	3
Slika 2: Potencialna fotokemična učinkovitost listov rastlin treh kultivarjev trave (<i>Agrostis palustris</i> Huds. A.) (Zhang in Ervin, 2004)	7
Slika 3: Delež ksantofilnih pigmentov glede na osvetljenost, letni čas in preskrbljenost z dušikom (Larcher, 2001)	9
Slika 4: Vsebnost pigmentov ksantofilnega cikla (mg/g suhe teže) v listih s kontrolnih dreves sort 'Elstar' (E-K) in 'Jonagold Wilmuta' (J-K) in dreves izpostavljenih suši sort 'Elstar' (E-S) in 'Jonagold wilmuta'(J-S) (Šircelj, 2001)	10
Slika5: Učinek Cu^{2+} in Cd^{2+} na aktivnost encima supeksid dismutaza v vodni leči <i>Lemna minor</i> . (□) Cu^{2+} ; (●) Cd^{2+} (Hou in sod., 2007)	12
Slika6: Askorbat-glutationska veriga (Veberič, 2010)	13
Slika 7: Primer različne ekspresije proteinov ob temperaturnem stresu. Ob povečani temperaturi nastajajo t.i. heat shock proteini (HSP) (Bachanan in sod., 2002)	15

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

PS I	Fotosintetski aparat I
PS II	Fotosintetski aparat II
ROS	Reaktivne kisikove spojine
SOD	Superoksid dismutaza
v	Ksantofilni pigment violaksantin
a	Ksantofilni pigment anteraksantin
z	Ksantofilni pigment zeaksantin
HSP	Proteini vročinskega šoka
GSH	Glutation (reducirana oblika glutaciona)
GSSG	Glutation disulfid (oksidirana oblika glutaciona)
F ₀	Osnovna ali minimalna fluorescenca temotno adaptiranega vzorca
F _m	Maksimalna fluorescenca temotno adaptiranega vzorca
F _v	Variabilna fluorescenca

1 UVOD

Stres je stanje organizma, nastalo pod vplivom notranjih ali zunanjih dejavnikov, ki glede na njihovo jakost in trajanje sprva vplivajo negativno. Kasneje, če organizem preživi, pa stres vpliva pozitivno, ker postane odporen proti določenim stresnim dejavnikom (Batič in sod., 2001).

Pri ljudeh stres opredelimo kot fiziološki, psihološki in vedenjski odgovor posameznika, ki se poskuša prilagoditi in privaditi notranjim in zunanjim dražljajem, ki jih imenujemo stresorji. Stresor je dogodek, situacija, oseba ali predmet, ki ga posameznik doživi kot stresni element in zajame njegovo ravnovesje, posledica tega je stresna reakcija. Stresnost neke situacije ali dogodka ni za vse ljudi enaka. Stres in dejavnike stresa pri človeku določajo posameznikova osebnost, starost, izkušnje, vrednote, prepričanja, energetska opremljenost, okoliščine in okolje v katerem oseba živi. Ločimo kratkoročni in dolgoročni stres. Simptomi stresa vključujejo alarmno reakcijo in izločanje adrenalina, povečata se krvni tlak in mišična prekrvavitev, pospeši se delovanje srca in dihanje, povečajo se budnost, previdnost in pozornost, nezmožnost koncentriranja, razdražljivost in glavobol. Prekomerni stres se pri ljudeh kaže v različnih oblikah, in sicer kot prebavne motnje, motnje srca in ožilja, motnje imunskega sistema, motnje mišičnega sistema, motnje dihal in duševne motnje. Stres lahko vpliva tudi pozitivno, in sicer kot visoka motiviranost, družabnost, občutek zadovoljstva in sreče, umirjenost in samozavest ter odločnost (Černelič, 1999).

Stres vpliva na vse organizme, izjema niso niti rastline. Kjerkoli rastejo, so podvržene številnim stresnim dejavnikom, ki omejujejo njihove možnosti za razvoj in preživetje, in prikazujejo fiziološko stanje rastline. Na svetu je veliko sušnih območij, kjer so ugodne razmere za rast in razvoj rastlin, če se sploh pojavijo, zelo kratkotrajne. Veliko zemeljske površine je bilo tako preoblikovane, da je bilo veliko divjih rastlin iztrebljenih ali izpodrinjenih. Tudi na mestih, kjer so razmere ugodne za večino rastlin, prav ta raznovrstnost in obilje vegetacije predstavlja oviro za nekatere člane skupnosti. Poleg tega pa je gosta vegetacija še posebej privlačna za parazite in glivične bolezni. Neugodne razmere niso nujno takoj smrtonosne, so pa lahko stalne na nekem območju. Takšne razmere so splošno znane kot primeri stresa (Larcher, 2001). Stres ne vodi vedno v smrt rastlin. Prav tako kot pri človeku, tudi pri rastlinah poznamo negativni in pozitivni stres. Rastline so se sposobne s svojimi obrambnimi mehanizmi izogniti, sprejeti stres ali pa se prilagoditi. Vse pa je odvisno od rezistence, trajanja, pogostosti izpostavitve, kombinacije stresorjev in organa oz. tkiva, genotipa, ravnostne faze, občutljivosti rastline.

2 RASTLINE IN STRES

Rastlinske vrste so zelo različno odporne na stres, vse pa se med rastjo in razvojem večkrat soočijo z različnimi stresnimi dejavniki. Stres pri rastlinah je večinoma opredeljen kot znatno odstopanje od optimalnih pogojev za razvoj in življenje. Stres je stanje organizma, nastalo pod vplivom notranjih ali zunanjih dejavnikov, ki glede na njihovo jakost, trajanje sprva vpliva negativno, kasneje, če organizem preživi, pa pozitivno, ker postane odporen proti določenim stresnim dejavnikom. Rastline so podvržene stresu takrat, ko so izven meja idealnih razmer. Dobesedni pomen besede »stres« je zadrega (izvira iz latinske besede *stringere*) ali stiska. Dejavnik stresa (ali stresor) označuje stresne dražljaje, odziv na stres ali stresno stanje pa označuje odziv na dražljaje kot tudi posledično stanje prilagajanja. Stres izvabi spremembe in odzive na vseh stopnjah delovanja organizma. Sprva so spremembe in odzivi še reverzibilni, lahko pa postanejo tudi trajni. Vitalnost rastline se s trajanjem stresa manjša. Lahko pa se rastlina s svojimi obrambnimi mehanizmi brani in se izogne, sprejme ali prilagodi stresu. Na meji, ko se rastlina ne more več prilagajati, se dotedanja prikrita škoda razvije v kronično bolezen ali nepopravljivo škodo (Larcher, 2001). Rastlinam povzročajo stres biotski in abiotski dejavniki. To so vročina, mraz, zmrzal, poplave in pomankanje vode, slanost, težke kovine, pomankanje hranil, pH, onesnaževanje zraka, pesticidi, ultravijolično sevanje, prevelika in premajhna jakost svetlobe, veter, bolezni, herbivorija, alelopatija, kompeticija, in še mnogi drugi dejavniki.

Odziv na stres je tekmovanje med prizadevanji za prilagoditev in procesi, ki lahko vodijo do smrti celic v protoplazmi. Kot sem omenila v uvodu, poznamo tako pozitivni kot negativni stres, tudi pri rastlinah ni nič drugače. Poznamo negativni (npr. propad celice) in pozitivni (prilagoditev, vzpostavitev ravnovesja, odpornost) stres. Eu-stres je blagi stres, ki lahko deluje kot aktivator celičnega metabolizma, poveča fiziološko aktivnost rastline in ne povzroča posledic tudi po daljšem delovanju. Di-stres pa je hud stres, katerega rezultat je škoda in ima zato negativni vpliv na rast in razvoj rastline (Lichtenthaler, 1988). Omejitvev, prilagajanje in odpornost so med seboj povezani deli odziva. Uspeh bodisi škodljivega bodisi varovalnega odziva določa, ali bo stres povzročil majhna ali začasna odstopanja od normalnega stanja ali resne trajne poškodbe.

2.1 ODZIV RASTLIN NA STRESNE DEJAVNIKE

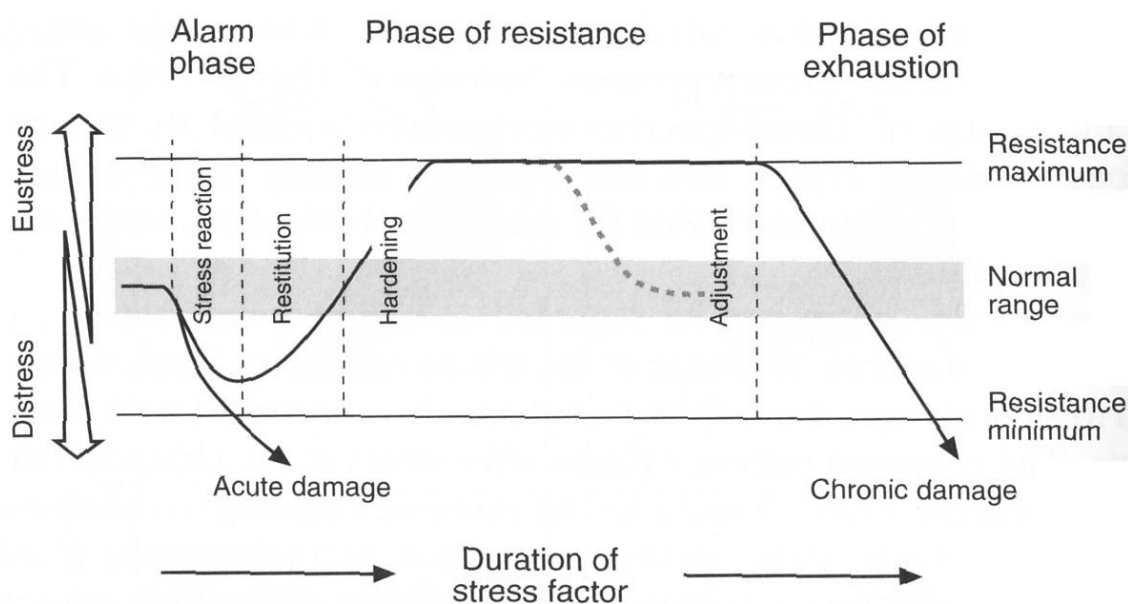
Organizem, ki je pod stresom, gre skozi zaporednja značilnih faz. Stres je stanje, pri katerem prevelik napor rastline prvotno vodi v destabilizacijo določenih funkcij, kateri sledi normalizacija in v končni fazi izboljšanje odpornosti. Če pa je meja presežena in je zmožnost prilagajanja precenjena, je posledica tega lahko trajna poškodba ali celo smrt organizma.

Prva je alarmna faza. Pojavu nenehnih motenj sledi destabilizacija strukturnih (npr. proteini, biološke membrane, celični skelet) in funkcionalnih (biokemični procesi, energetska presnova) okoliščin, ki so potrebne za normalno opravljanje življenjskih aktivnosti. V primeru, da je poškodba prehitro preveč intenzivna, se celica kljub obrambnim mehanizmom ne more izogniti resnim poškodbam. Alarmna faza se začne s stresno reakcijo, v kateri katabolizem (razgradnja) prevlada nad anabolizmom (izgradnja). Če intenzivnost dražljajev ostane nespremenjena, se hitro začne »obnovitev« v obliki obnovitvenih procesov, kot je proteinska sinteza ali po novem sinteza obrambnih snovi. Nato se proces nadaljuje v fazo rezistence.

V fazi rezistence se odpornost (»utrjevanje«) poveča tudi, če se stres ponavlja. Zaradi izboljšanja stabilnosti lahko pride do normalizacije kljub nenehnemu stresu. To pa imenujemo prilagoditev. Povečana odpornost proti stresu lahko ostane prisotna še nekaj časa potem, ko motnja preneha.

Če pa stresno stanje predolgo traja, oziroma, če stresni dejavnik predolgo deluje na rastlino, se intenzivnost stresa poveča. To pa povzroči fazo izčrpanosti in takrat je rastlina najbolj nagnjena k okužbam in vdorom patogenih mikroorganizmov v telo, torej infekcijam. Infekcije se pojavijo kot posledica oslABLJENE obrambe gostitelja in lahko vodijo v prezgodnji propad.

Če je bilo poslabšanje samo začasno, se funkcionalno stanje vrne v prvotni položaj, saj se lahko nastala škoda še popravi v fazi regeneracije (Larcher, 2001).



Slika 1: Fazni model stresnih dogodkov in odzivov (Larcher, 2001)

2.2 PREPOZNAVANJE STRESA

Različne vrste rastlin se različno odzovejo na določen stresor, odvisno od njihove genetsko določene reakcijske forme. Poleg tega pa se lahko način in intenzivnost odziva posamezne rastline na določen dejavnik stresa znatno razlikujeta, odvisno od starosti rastline, prilagodljivosti, sezonske in celo vsakodneвне aktivnosti. Čeprav je pogosto dobra vzajemnost med intenzivnostjo dejavnika stresa in odzivom, ne smemo domnevati, da je stopnja poškodbe sorazmerna z jakostjo dejavnika stresa. Niso vse spremembe, ki jih v rastlini povzroči stres nujno škodljive ali varovalne. Na vprašanje, ali je rastlina v dani situaciji pod stresom, lahko odgovorimo le tako, da jo primerjamo z rastlino v normalnem stanju. Znake stresa pri rastlini lahko spoznamo skozi različne simptome. Merila stresa so znaki motenj in vidni pokazatelji destabilizacije, prav tako pa tudi spremembe, ki so povezane z okrevanjem in mehanizmi odpornosti. Razlike med destruktivnimi in konstruktivnimi procesi težko opredelimo, saj se lahko pojavijo tudi hkrati. Stres prepoznavamo prek nespecifičnih in specifičnih kazalcev stresa (Larcher, 2001).

2.2.1 Nespecifični kazalci stresa

Nespecifični kazalci so prvotno izraz stopnje resnosti motnje. Proces je nespecifičen, če sledi stereotipnemu vzorcu, ne glede na vrsto dejavnika stresa (stresorja). Kažejo se navzven v obliki znakov, vendar po njih ne moremo sklepati na vzroke.

Primeri (Larcher, 2001):

- spremembe pri delovanju encimov (detoksifikacijski encimi, kot so peroksidaza, glutation reduktaza, dehidroaskorbat reduktaza),
- kopičenje antioksidantov (askorbinska kislina, tokoferol),
- kopičenje kompatibilnih osmotsko aktivnih snovi (aminokislina prolin, betain, sladkorni alkohol),
- biosinteza proteinov, poliaminov in številnih sekundarnih snovi (polifenoli, flavonoidi),
- tipični stresni hormoni (abscizinska kislina, jasmonska kislina, etilen),
- spremembe pri lastnostih membrane (membranski potencial, prenos snovi),
- povečano dihanje,

- zmanjšana fotosinteza,
- zmanjšana tvorba suhe snovi,
- motnje rasti, zmanjšan pridelek,
- prezgodnje staranje.

2.2.2 Specifični kazalci stresa

Učinki, značilni za stresorje, običajno vključujejo dobro izbrano točko znotraj rastline. Znake, po katerih se izraža stres, lahko povežemo s stresnim dejavnikom.

Primeri (Larcher, 2001):

- neposredna škoda na tilakoidnih membranah (močno sevanje),
- encimi (toksičnost kovinskih ionov),
- tipični znaki značilni za pomanjkanje posameznih mineralnih hranil,
- sinteza proteinov, specifičnih za odgovor na posamezni stresni dejavnik (npr. proteini anoksičnega, hipoksičnega, hladnega, mraznega, vročinskega stresa).

S spremljanjem zgoraj naštetih kazalnikov se lotevamo tudi merjenja stresa. Prisotnost stresa oz. njegovo stopnjo najlažje ocenimo s hkratnim spremljanjem večjega števila kazalnikov. Nekatere najpogosteje uporabljane pristope za merjenje stresa predstavljamo v naslednjem poglavju.

3 MERJENJE STRESA

3.1 FLUORESCENCA

Ko rastlina doživi stresno stanje, lahko pride do motenj v fotosinteznem aparatu. Fluorescenca je oddajanje svetlobe daljše valovne dolžine od tiste svetlobe, ki fotosintetski aparat vzbuja in je eden od treh načinov, na katere lahko s svetlobo vzbujeni klorofil odda energijo. Ob primernih merilnih razmerah lahko z meritvijo fluorescentnega signala sklepamo na fotokemično učinkovitost fotosinteze (dejansko, značilno za neke okoljske razmere in potencialno), t.j. na hitrost elektronskega transporta v svetlobnih razmerah (Vodnik, 2004).

Za rastline je svetloba, poleg drugih dejavnikov, nujno potrebna za razvoj in življenje, vendar pa predstavlja problem, ko je svetlobe premalo ali pa preveč. Zato so rastline razvile različne mehanizme, s katerimi čim bolj izkoriščajo nižje jakosti sevanja. Ko je sevanja preveč, pa energijo odajajo na različne načine, saj bi v nasprotnem primeru prišlo do poškodb fotosintetskega aparata in same celice.

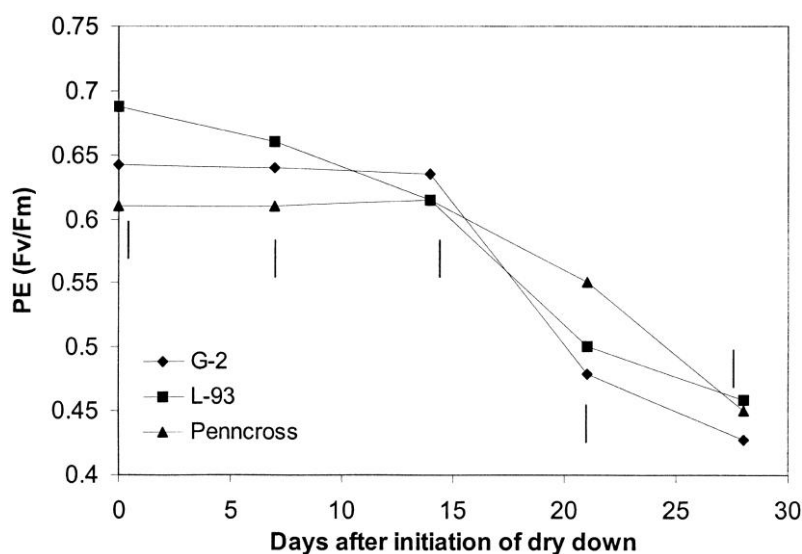
Svetlobne oziroma fotokemične reakcije so nujen proces fotosinteze. Potekajo na tilakoidni membrani, na kateri poteka vzbujanje klorofila ob prisotnosti svetlobe. Svetloba najprej vzbudi pomožne pigmente (karoteni, ksantofili), ki ščitijo reakcijski center pred poškodbami, širijo svetlobni spekter in prenašajo energijo do reakcijskega centra. Na tilakoidni membrani sta fotosistema, ki sprejemata s pomočjo antenskih kompleksov svetlobo različnih valovnih dolžin in med drugim skrbita za transport elektronov, pri čemer se tvorita NADPH in ATP. Predvsem je pomemben PS II, saj elektroni preidejo ob absorpciji fotonov na višjo energetske raven. Vzbujena molekula klorofila je nestabilna, energijo, ki jo ima, se lahko odda na različne načine. Poleg fotokemičnega dela in toplote, je eden izmed načinov odvajanja energije fluorescenca, oddajanje svetlobe daljše valovne dolžine. Fluorescirata predvsem klorofila a (glavni fotosintetski pigment) reakcijskega centra in klorofil antene PS II (Vodnik, 2001). S spremljanjem fluorescence klorofila dobimo informacijo o fotokemičnih reakcijah in o toplotnih izgubah. Energijo, ki se porabi za fotokemično delo, imenujemo fotokemično dušenje, energijo, ki se izgubi kot toplota pa nefotokemično dušenje fluorescence (Vodnik, 2001).

Pomemben je odraz fluorescence klorofila v PS II, saj služi kot merilo stresa pri rastlini. Ob absorpciji svetlobe se elektron prenese s PS II do prvega plastokinona (Qa). Dokler tega elektrona ne preda drugemu plastokinonu (Qb), ne more sprejeti naslednjega elektrona. V tem času je reakcijski center zaprt, to pa pomeni, da se del presežne energije odda v obliki fluorescence. Več kot je zaprtih reakcijskih centrov, manj bo učinkovitih fotokemičnih reakcij, posledično pa več oddajanja fluorescence.

Fotokemično učinkovitost rastline, ki je določena preko fluorescence klorofila a v PS II, merimo z modulacijskim fluorometrom. Fluorescentni signal, ki ga izmerimo na zatemnjenem listu (reakcijski centri so odprti), izvira iz klorofila b, imenujemo ga osnovna ali minimalna fluorescenca temotno adaptiranega vzorca (F_o). Ko list osvetlimo s saturacijskim žarkom (močna jakost svetlobe), se fluorescentni signal poveča. Do povečanja pride, ker je redukcija kinonov v FS II hitrejša od ponovne oksidacije. Klorofil a reakcijskega centra PS II del ekscitacijske energije odda v obliki fluorescence. Povečani fluorescentni signal imenujemo maksimalna fluorescenca temotno adaptiranega vzorca (F_m). Razliko med F_m in F_o imenujemo variabilna fluorescenca (F_v), daje nam informacijo o obsegu redukcije prvega kinona (Q_a) (Sedej, 2005).

Razmerje F_v/F_m je merilo potencialne fotokemične učinkovitosti PS II in je sorazmerno fotosintezi. Razmerje F_v/F_m pri vitalnih rastlinah (ugodne razmere) dosega vrednost do 0,83. Vrednost se zmanjša, kadar je rastlina izpostavljena stresu (Vodnik, 2001).

Meritve fluorescence se množično uporabljajo za spremljanje fiziološkega stanja rastlin. Z njimi lahko ocenimo učinke delovanja različnih stresnih dejavnikov. Na sliki 2 vidimo primer meritev potencialne fotokemične učinkovitosti treh kultivarjev trave *Agrostis palustris* izpostavljenih suši. Padajoča vrednost F_v/F_m odraža napredujoči sušni stres.



Slika 2: Potencialna fotokemična učinkovitost listov rastlin treh kultivarjev trave (*Agrostis palustris* Huds. A.) (Zhang in Ervin, 2004)

3.2 KSANTOFILNI CIKEL

Rastline v svojem okolju absorbirajo več svetlobne energije, kot jo potrebujejo za fotosintezo. Okoljski stres, ki znižuje stopnjo fotosinteze, povzroči, da se absorbira več svetlobne energije v kloroplastu, kar lahko vodi do oksidativnih poškodb fotosintetskega aparata in kasneje do propada celice. Zato so rastline opremljene z fotozaščitnim procesom, ki varno odstrani presežno energijo s pretvorbo v toplotno energijo (Larcher, 2001).

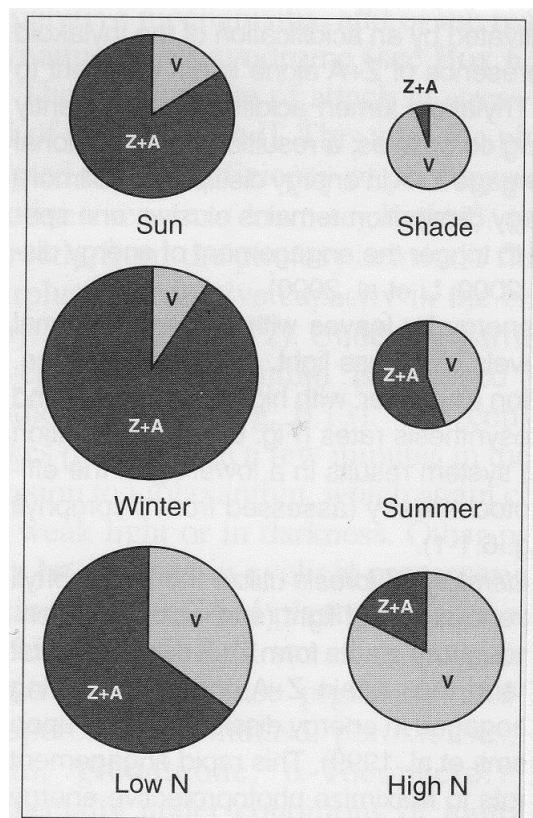
Violaksantinski cikel je prvi odkrit, najpogostejši in najbolj učinkovit od šestih poznanih ksantofilnih ciklov, zato ga v literaturi označujejo kot ksantofilni cikel. Ključna molekula mehanizma za odvajanje presežne ekscitacijske energije v tem ciklu je zeaksantin. Zeaksantin naj bi dušil vzbujeno singalet stanje klorofila neposredno ali posredno z vplivom na konformacijo ali agregacijo klorofilproteinskih kompleksov. Pretvorbe pigmentov ksantofilnega cikla so edine spremembe karotenoidnega sistema fotosintetskega aparata do katerih prihaja v razmeroma kratkem časovnem obdobju. Pojavijo se kot odziv na spremembe v ravnotežju med absorbcijo svetlobne energije v fotosinteznem metabolizmu ogljika. (Demmig-Adams in Adams, 1992). Ksantofilni cikel lahko opišemo kot porabo presežne svetlobe v PS II za pretvarjanje violaksantina v zeaksantin preko anteraksantina. Pri tem se presežna energija odvaja kot toplota, kar pa ščiti rastlino pred škodljivim delovanjem velikih jakosti svetlobe (Batič in sod., 2011).

Ksantofilni cikel sestavljata dve reakciji, ki ju katalizirata dva različna encima. Prva je deepoksidacija diepoksida violaksantina v monoepoksid anteraksantin in deepoksidacija tega v zeaksantin, kar katalizira deepoksidaza. Pri pretvorbi v zeaksantin sta prisotna še askorbat in NADPH_2 (Larcher, 2001). Ob močni svetlobi in nizkem pH poteka reakcija zelo hitro. Ob povečevanju vsebnosti zeaksantina se prekomerna energija odvaja v obliki toplote. Omenjena pretvorba poteka izključno v tilakoidah. Povečana vsebnost anteraksantina in predvsem zeaksantina nakazuje na to, da je bila rastlina pod stresom. Obratno reakcijo katalizira encim epoksidaza. Epoksidacija poteka počasi (več minut do več ur) in je odvisna od šibke osvetlitve, poteka v alkalnem pH (Larcher, 2001; Demmig-Adams in Adams, 1996).

Glede na delež pigmentov ksantofilnega cikla (violaksantin : anteraksantin : zeaksantin) v listu rastline vidimo, ali je rastlina pod stresom ali ne. Pigmentni ksantofilnega cikla so prilagojeni na različne dejavnike okolja.

Spremembe v ksantofilnem ciklu so vidne, kadar na rastlino delujejo različni stresni dejavniki. Vrste, ki rastejo v podrasti gozda, uporabljajo ksantofilni cikel za fotozaščito. Rastline že ob jutranjih (majhna količina) sončnih žarkih tvorijo zeaksantin in anteraksantin in ju obdržijo vse do medle svetlobe. Skozi vsak dodatni žarek se zeaksantin in anteraksantin vključita v odvajanje energije, ko pa se svetloba manjša, se manjša tudi njuno delovanje. Tako

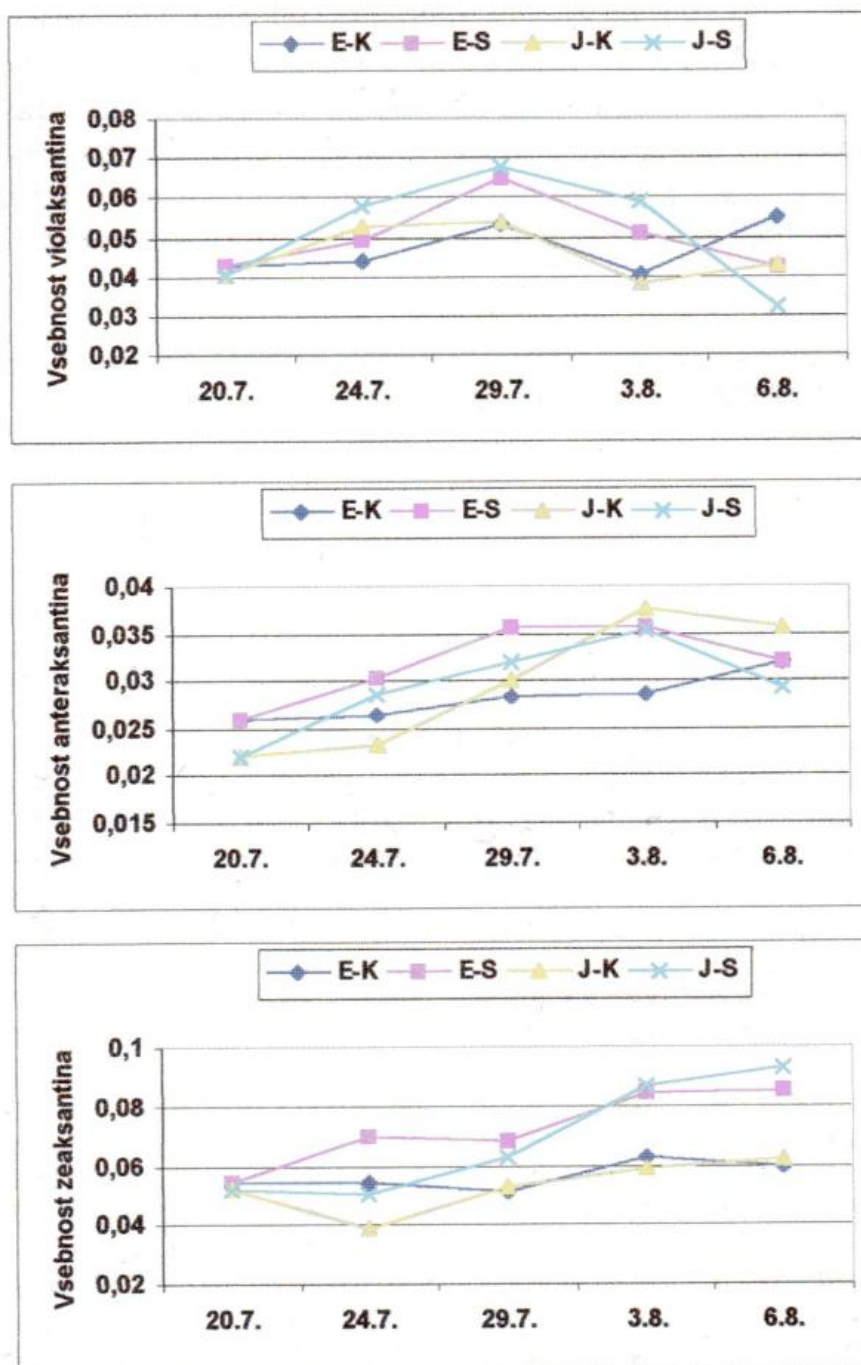
delovanje omogoča rastlinam potrebno odvajanje in fotozaščito ter pretvorbo sončne energije v fotosintezo med manj nevarno svetlobo (Larcher, 2001).



Slika 3: Delež ksantofilnih pigmentov glede na osvetljenost, letni čas in preskrbljenost z dušikom (Larcher, 2001)

V primeru popolne sončne obsevanosti je v tilakoidah močno povečan delež z+a, v primeru majhne sončne obsevanosti pa se poveča delež violaksantina. Podobno je tudi v primeru zima/poletje in pomankanje dušika/zadostna količina dušika. Pozimi rastlinske vrste redno ohranjajo povišan nivo z + a, delež v je majhen. S tem vzdržujejo svetlobni proces v visokem odvajanju energije skozi noč in dan in listom omogočijo popolno fotozaščito (Slika 3).

Primer, ko spremembe pigmentov ksantofilnega cikla niso izzvane direktno s premočno svetlobo, predstavlja raziskava sušnega stresa pri jablani, ki jo je izvedla H. Šircelj (2001). V enakih svetlobnih razmerah se razmerje vsebnosti zeaksantina napram skupnim pigmentom ksantofilnega cikla značilno poveča (Slika 4, Preglednica 1).



Slika 4: Vsebnost pigmentov ksantofilnega cikla (mg/g suhe mase) v listih s kontrolnih dreves sort 'Elstar' (E-K) in 'Jonagold Wilmuta' (J-K) in dreves izpostavljenih suši sort 'Elstar' (E-S) in 'Jonagold wilmuta' (J-S) (Šircelj, 2001)

Povečana vsebnost zeaksantina kaže na napredujočo sušo. Preko ksantofilnega cikla je zeaksantin odvajal presežno ekscitacijsko energijo iz PS II pred nastankom škodljivih oksidantov.

3.3 OBRAMBNI MEHANIZMI ZA ODSTRANJEVANJE REAKTIVNIH OBLIK KISIKA

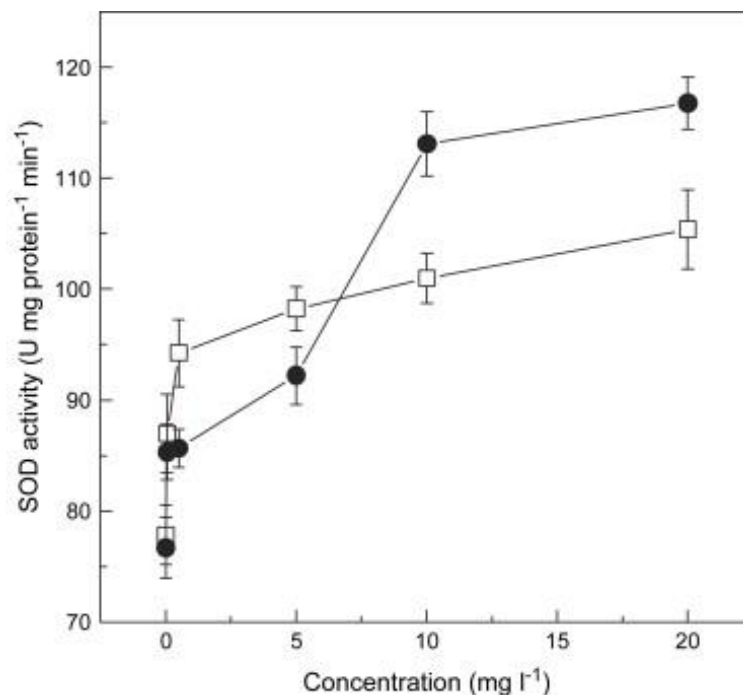
Kisik je ključnega pomena za preživetje rastlin, vendar pa lahko predstavlja problem, kadar se pretvori v reaktivne oblike kisika (ROS). Do reaktivnih kisikovih spojin prihaja zaradi okoljskih obremenitev, kot so npr suša, slanost, onesnaževanje s težkimi kovinami, napada patogenov, vročine, mraza itd. Še posebno toksične učinke imajo fotooksidanti, ki vstopajo v rastlino skozi listne reže in povzročajo oksidativni stres. Eden najbolj škodljivih je ozon, ki se ob vstopu v list razdeli na hidroksil, peroksil in superoksidni radikal ter vodo. Po izpostavljenosti ozona so najbolj ranljivi deli v celici celična stena in znotrajcelična biomembrana (Larcher, 2001). Oksidativni stres pa se pojavlja tudi kot sekundarni stres, kadar na rastlino deluje katerikoli drug stresni dejavnik.

Razvoj ROS je odgovoren za nastanek oksidativnega stresa, ki pa predstavlja veliko škodo za rastline, saj se na membranah in celičnih stenah kopičijo strupeni produkti reakcij ROS. ROS (superoksidni anion O_2^- , vodikov peroksid H_2O_2 , hidroksilni radikal OH^\cdot) imajo močno škodljivo delovanje, saj vplivajo na oksidacijo in destrukcijo lipidov, nukleinskih kislin in proteinov. Oksidativni stres povzroča nastanek lipidnih peroksidov, kar pa povzroča poškodbe celic. V ekstremnih primerih ob izpostavljenosti ozona prihaja do nekroz in pa do poškodb DNA, kar pa slabo vpliva na procese v celici (Larcher, 2001).

Pod močnim svetlobnim stresom se akumulirajo agresivne kisikove vrste, ki lahko uničijo pigmente v kloroplastu in lipide membrane. Oksidoreduktaze (superoksidna dismutaza, peroksidaza, katalaza) in antioksidanti (askorbinska kislina, glutation, α -tokoferol) delujejo kot prestrežni sistemi (Larcher, 2001).

Rastline so zaradi oksidativnega stresa razvile številne obrambne mehanizme proti reaktivnim kisikovim spojinam. Rastlinska tkiva so opremljena z antioksidativnimi sistemi, ki delujejo kot obrambni mehanizem oksidativnemu stresu. Ti sistemi funkcionirajo kot učinkovite radikalne pasti, saj lahko razstrupijo nevarne oblike reaktivnih kisikovih spojin (Larcher, 2001).

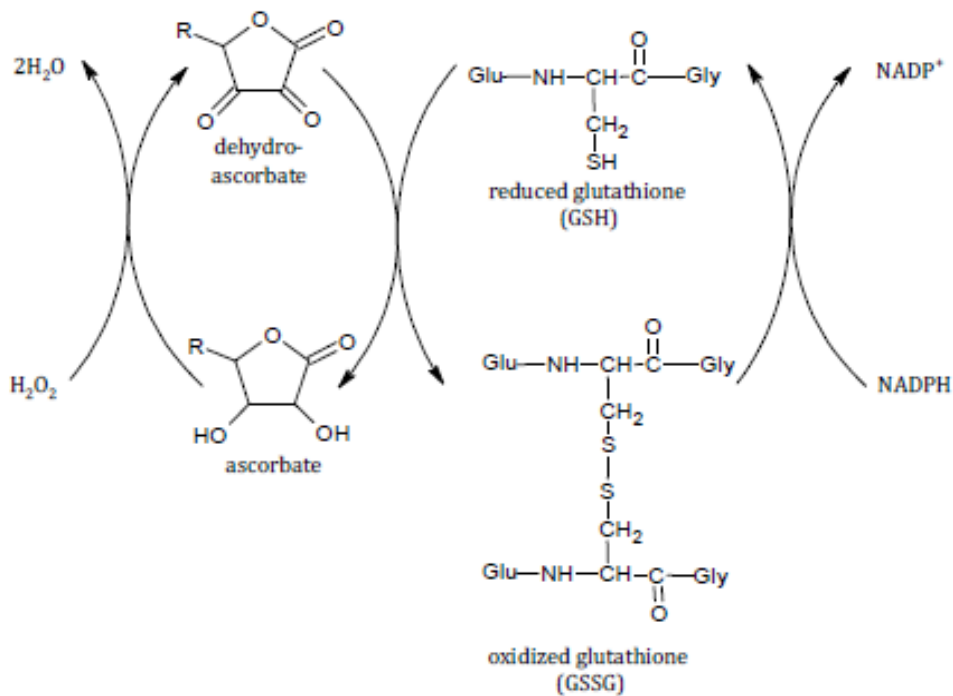
Eden od takih sistemov je encim superoksid dismutaza (SOD), ki je eden od encimov, ki sodelujejo pri odstranjevanju oz. spreminjanju ROS (poleg SOD, so pomembne še peroksidaze in encima katalaza). SOD katalizira reakcijo superoksidnega aniona na vodikov peroksid in kisik ($O_2^- + O_2^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$). Ima antioksidativno vlogo v skoraj vseh celicah, ki so izpostavljene kisiku. Nahaja se v citosolih in mitohondrijih ter kloroplastih (Mckersie in Leshem, 1994). Primer aktivacije encima SOD ob stresu zaradi težkih kovin je prikazan na sliki 5.



Slika 5: Učinek Cu²⁺ in Cd²⁺ na aktivnost encima supeksid dismutaza v vodni leči *Lemna minor* (□) Cu²⁺; (●) Cd²⁺ (Hou in sod., 2007)

V drugem mehanizmu odstranjevanja ROS, ki odstranjuje vodikov peroksid, sodelujeta askorbinska kislina in glutation. Kot močan reducent je askorbinska kislina občutljiva za kisik, na svetlobi in visoki temperaturi hitro oksidira. Prisotna je v vsaki celici, v zelenih delih in v plodovih še v večji koncentraciji. Askorbinska kislina je zaradi dveh hidroksilnih skupin ob dvojni vezi eden najmočnejši reducentov. V celični presnovi deluje v oksidoredukcijskih procesih, v askorbatno-glutationski verigi. Pri tem reverzibilno oksidira dehidroaskorbinsko kislino (Likar in sod., 2003).

Askorbatno-glutationska veriga povezuje pretvorbe askorbinske kisline in glutationa, majhnega peptida, ki ga gradijo aminokislina. Glutation je v rastlini pretežno v reducirani obliki (GSH). V stresnih razmerah pa se pretvori iz reducirane oblike v oksidirano obliko (GSSG – glutation disulfid). Ko rastlina ni več v stresnih razmerah, oksidirano obliko pretvori nazaj v reducirano obliko s pomočjo encima glutation reduktaza. Ko je rastlina v stresu je oksidacija GSH do GSSG zelo intenzivna, ob tem se poveča razmerje GSSG/GSH ter aktivnost glutation reduktaze. Veriga poteka v kloroplastu in tudi citoplazmi. Askorbat rastrupi reaktivne kisikove spojine in jih reducira. Askorbat, ki je zaradi tega oksidiran, se v celici preko glutationa ponovno obnovi. V askorbatno-glutationski verigo so vključeni encimi askorbatna peroksidaza, superoksid dismutaza, glutation in katalaza. Drugi antioksidanti so flavonoidi, polifenoli, vitamini, karotenoidi, L-tokoferol v tilakoidni membrani, ki vzpostavljajo homeostazo in odstranjujejo reaktivne oblike kisika (Larcher, 2001).



Slika 6: Askorbat-glutationska veriga (Veberič, 2010)

Primer analize askorbata in glutationa (GSH, GSSG) lahko vidimo v preglednici 1. Povečanje vsebnosti GSSG in GSSG / skupni glutation odraža napredovanje hude suše v obeh letih poskusnega merjenja. V drugem letu poskusa je povečana tudi vsebnost skupnih aminokislin, zaradi zaviranja sinteze proteinov. Povečanje vsebnosti aminokislin, zeaksantina, sorbitola in askorbinske kisline odražajo napredovanje hude suše.

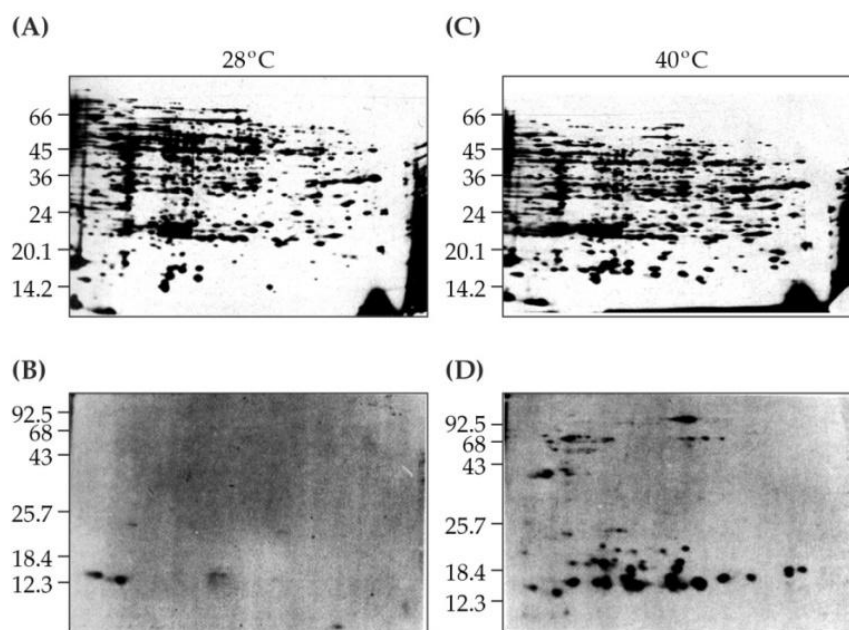
Preglednica 1: Rezultati testov na izbrane biokemijske in fiziološke parametre pri jablani sorte 'Elstar', izpostavljeni zmerni ali hudi suši, v primerjavi s kontrolnimi rastlinami (Šircelj in sod., 2007).

	mild		moderate		severe	
	$\Delta\Psi_M=0.2-0.5$ MPa		$\Delta\Psi_M=0.8-1.3$ MPa		$\Delta\Psi_M=1.9-2.1$ MPa	
	$\Delta\Psi_D=0.1-0.3$ MPa		$\Delta\Psi_D=0.6-1.4$ MPa		$\Delta\Psi_D=1.6-1.7$ MPa	
	A	B	A	B	A	B
chlorophyll a	ns	ns	ns	ns	ns	ns
chlorophyll b	ns	ns	ns	ns	ns	ns
α -carotene	ns	ns	ns	ns	ns	ns
β -carotene	ns	ns	ns	ns	ns	ns
neoxanthin	ns	ns	ns	ns	ns	ns
lutein	ns	ns	ns	ns	ns	$\downarrow p=0.024$
violaxanthin	ns	ns	ns	ns	ns	ns
antheraxanthin	ns	ns	ns	ns	ns	ns
zeaxanthin	ns	ns	$\uparrow p=0.028$	$\uparrow p<0.000$	$\uparrow p=0.010$	$\uparrow p<0.000$
total carotenoids	ns	ns	ns	ns	ns	ns
ascorbic acid	ns	ns	$\uparrow p=0.019$	$\uparrow p=0.014$	$\downarrow p=0.006$	ns
GSH	ns	ns	ns	$\uparrow p=0.009$	ns	$\downarrow p<0.000$
GSSG	ns	ns	$\uparrow p=0.031$	$\uparrow p=0.011$	$\uparrow p=0.007$	$\uparrow p=0.029$
total glutathione	ns	ns	ns	$\uparrow p=0.007$	ns	$\downarrow p<0.000$
GSSG/total	ns	ns	$\uparrow p=0.017$	$\uparrow p=0.041$	$\uparrow p<0.000$	$\uparrow p<0.000$
α -tocopherol	ns	ns	$\uparrow p=0.015$	$\uparrow p=0.002$	ns	ns
γ -tocopherol	ns	ns	$\uparrow p=0.034$	ns	ns	ns
δ -tocopherol	ns	ns	ns	ns	ns	ns
sorbitol	ns	ns	$\uparrow p=0.007$	$\uparrow p<0.000$	ns	ns
sucrose	ns	ns	ns	ns	ns	$\uparrow p=0.003$
fructose	ns	ns	ns	ns	ns	ns
glucose	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Pro	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Arg	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Glu	ns	ns	ns	ns	ns	ns
total FAA	ns	ns	ns	ns	$\uparrow p=0.030$	$\uparrow p=0.020$
Pn	ns	ns	$\downarrow p<0.000$	$\downarrow p<0.000^*$	$\downarrow p<0.000$	$\downarrow p<0.000$
Gs	ns	ns	$\downarrow p=0.004$	$\downarrow p<0.000^*$	$\downarrow p<0.000$	$\downarrow p<0.000$
Ci	ns	ns	$\downarrow p=0.012$	$\downarrow p=0.021^*$	$\uparrow p=0.006$	$\uparrow p<0.000$
transpiration	ns	ns	$\downarrow p<0.000$	$\downarrow p<0.000^*$	$\downarrow p<0.000$	$\downarrow p<0.000$

3.4 SINTEZA PROTEINOV, SPECIFIČNIH ZA ODGOVOR NA POSAMEZNI STRESNI DEJAVNIK

Poznamo proteine anoksičnega, hipoksičnega, hladnega, mraznega in vročinskega stresa. Vsak posamezen protein je specifičen za odgovor na posamezni stresni dejavnik, in ima zaščitno funkcijo.

Ob izpostavljenosti rastline ali njenega rastlinskega organa visokim temperaturam (lahko tudi za kratek čas) se proizvajajo proteini vročinskega šoka (HSP). Njihova funkcija je preprečevati oziroma popraviti škodo, ki jo povzroča vročinski stres. HSP v celicah citoplazme preprečuje razgradnjo mRNA v času vročinskega stresa (Mckersie in Leshem, 1994).



Slika 7: Primer različne ekspresije proteinov ob temperaturnem stresu pri soji. Ob povečani temperaturi nastajajo t.i. heat shock proteini (HSP) (Buchanan in sod., 2002)

V rastlinah soje, ki so bile izpostavljene povišani temperaturi 40°C se v primerjavi z rastlinami, gojenimi pri 28°C sintetizirajo drugi proteini. Heat shock proteini (HSP) so udeleženi pri odgovoru na toplotni stres. Spremembe v proteinski sliki lahko detektiramo po ekstrakciji proteinov in njihovi ločitvi z dvodimenzionalno elektorforezo. Proteine lahko naredimo vidne z različnimi tehnikami (Slika 7 A, C; B, D) (Buchanan in sod., 2002).

V diplomski nalogi smo predstavili le nekaj parametrov, s katerimi lahko spremljamo stres. Za dobro prepoznavanje in merjenje stresa je priporočljivo hkrati obravnavati več parametrov, saj na rastlino hkrati delujejo različni stresni dejavniki.

4 SKLEPI

Rastline živijo po vsem svetu, na najrazličnejših področjih. Na katerem koli področju rastejo, so podvržene različnim stresnim dejavnikom. Veliko različnih dejavnikov vpliva na to, ali se bo rastlina na stres prilagodila, ali pa bo stres premočan za rastlino in ji onemogočil rast in razvoj.

Stres prepoznamo preko specifičnih in nespecifičnih kazalcev. Nekateri so bolj ali manj uporabni za prepoznavanje in merjenje stresa. V diplomski nalogi smo uporabili tiste kazalce, ki so najbolj uporabljeni za merjenje stresa rastlin.

Rastline so v namen izogibu in prilagajanju stresa razvile najrazličnejše obrambne mehanizme. Med pomembnejšimi obrambnimi mehanizmi sta fluorescena in ksantofilni cikel ter njegovi ksantofilni pigmenti violaksantin, anteraksantin in zeaksantin. Pri tvorbi reaktivnih kisikovih spojin so pomembni obrambni mehanizmi oksidoreduktaze in antioksidanti.

Ali je rastlina pod stresom, vidimo na podlagi spremenjenih vsebnosti in deležev rastlinskih pigmentov (klorofil a, klorofil b, violaksantin, anteraksantin, zeaksantin in ostali), askorbata, glutationa in aminokislin ter snovi. Spremembe koncentracije teh snovi odražajo vlogo teh snovi pri obrambi pred oksidativnim stresom.

V nalogi navedeni primeri meritev stresa se razlikujejo v tem, da so nekatere metode nedestruktivne, druge pa destruktivne. Pri merjenju fluorescence, na primer, rastline ne poškodujemo, zato je ta metoda primerna za spremljanje napredovanja stresa oz. le fiziološkega stanja rastline skozi daljše obdobje. Poslužujemo se je tam, kjer rastline oz. njihovih delov za meritev ne moremo žrtvovati. V drugih primerih merjenja stresa pa moramo rastlino poškodovati, da pridemo do željenih podatkov, vendar pa lahko z njimi pridobimo natančnejšo informacijo o stresnem stanju (npr. analize stresnih proteinov). Izbira metode je odvisna od namena meritev.

4 VIRI

- Batič F., Levačič K. B., Martinčič A., Cimerman A., Turk B., Gogala N., Seliškar A., Šercelj A., Kosi G. 2011. Botanični terminološki slovar. Ljubljana, Založba ZRC, ZRC SAZU: 650 str.
- Buchanan B., Gruissem W., Jones R.L. 2002. Biochemistry and molecular and biology of plants. Rockville, American Society of Plant Physiologists: 1367 str.
- Černelič B. M. 1999. Vpliv stresa na naše življenje. Primorska srečanja, 214: 128-130
- Demmig-Adams B., Adams W. 1992. Operation of the xantophyll cycle in higher plants in response to diurnal changes in incident sunlight. *Planta*, 186: 390-398
- Demmig-Adams B., Adams W. 1996. The role of xantophyll cycle carotenoids in the protection of photosynthesis. *Trends in Plant Science*, 1, 1: 21-26
- Hou W., Chen X., Song G., Wang Q., Chang C. 2007. Effects of copper and cadmium on heavy metal polluted waterbody restoration by duckweed (*Lemna minor*). *Plant Physiology and Biochemistry*, 45: 62-69
- Larcher W. 2001. Physiological Plant Ecology. Ecophysiology and Stress Physiology of Functional Groups. 4th eddition. New York, Springer: 513 str.
- Lichtenthaler H. K. 1988. In vivo Chlorophyll fluorescence as a tool for stress detection in plants. V: Applications of chlorophyll fluorescence. Dodrecht, Kluwer Academic Publisher: 129-139
- Likar M., Regvar M. 2003. Praktikum fiziologije rastlin. Ljubljana, Študentska založba: 94 str.
- Mckersie D. B., Leshem Y. Y. 1994. Stress and stress coping in cultivated plants. Netherlands, Kluwer Academic Publishers: 256 str.
- Sedaj T. T. 2005. Ekologija rastlin. Priročnik za vaje. Ljubljana, Študentska založba: 81 str.
- Šircelj H. 2001. Ugotavljanje sušnega stresa pri jablani (*Malus domestica* Borkh.) z izbranimi biokemičnimi in fiziološkimi kazalci. Doktorska disertacija. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta: 164 str.
- Šircelj H., Tausz M., Grill D., Batič F. 2007. Detecting different levels of drought stress in apple trees (*Malus domestica* Borkh.) with selected biochemical and physiological parameters. *Scientia Horticulturae*, 113: 362-369

Veberič R. 2010. Bioactive compounds in fruit plants. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo: 66 str.

[http://www.bf.uni-lj.si/fileadmin/groups/2712/Bioactive_compounds_in_fruit_plants -
_Veberic.pdf](http://www.bf.uni-lj.si/fileadmin/groups/2712/Bioactive_compounds_in_fruit_plants_-_Veberic.pdf)

Vodnik D. 2001. Fiziologija rastlin – praktične vaje. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo: 56 str.

Vodnik D. 2004. Meritve fotosinteze sadnih rastlin. V: Zbornik referatov 1.slovenskega sadjarskega kongresa z mednarodno udeležbo, Krško 24-26. Mar. 2004, Ljubljana, Biotehniška fakulteta Univerze v Ljubljani: 119-125

Vodnik D. 2011. Fiziologija rastlin: zapiski s predavanj 2010/2011. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo (neobjavljeno, osebni vir)

Zhang X., Ervin E. H. 2004. Cytokinin-Containing seaweed and humic acid extracts associated with creeping bentgrass leaf cytokinins and drought resistance. Crop Science Society, 44: 1737-1745

ZAHVALA

Za pomoč, nasvete, vodenje in potrpežljivost pri izdelavi diplomskega projekta se iskreno zahvaljujem mentorju prof. dr. Dominiku Vodniku.

Za pregled diplomskega projekta se zahvaljujem izr. prof. dr. Robertu Veberiču.

Za pomoč in podporo se zahvaljujem tudi staršem, sestram in prijateljem.

Za pregled diplomskega dela se zahvaljujem mag. Karmen Stopar.

Za pomoč pri prevajanju tujih člankov se zahvaljujem Damjani Dobnikar.