

1. Snimanje fluorescencije hlorofila tokom fotosintetičke aktivnosti i sadržaja pigmenta biljaka koje vaskrsavaju *Ramonda serbica* i *Ramonda nathaliae* tokom hidratacije i dehidratacije

(Chlorophyll fluorescence imaging of photosynthetic activity and pigment contents of the resurrection plants *Ramonda serbica* and *Ramonda nathaliae* during dehydration and rehydration)

Bekim Gashi & Fatbardha Babani & Efigjeni Kongjika

1.1. Uvod

Biljke otporne na isušivanje, *Ramonda serbica* i *Ramonda nathaliae*, su biljke vaskrsenja koje su u stanju da potpuno oporavlja svoju fiziološku funkciju nakon anabioze.

Upoređeno je snimanje fluorescencije hlorofila tokom fotosintetičke aktivnosti i sadržaj pigmenta kod *R. serbica* i *R. nathaliae* tokom hidratacije i dehidratacije. Za ovu svrhu, biljke koje su sakupljene na svojim prirodnim staništima, čuvane su sledećih 14 dana i zalivane da bi ostale u prirodnom stanju. Eksperiment je sproveden na zrelih listovima obje vrste.

Biljke *R. serbica* i *R. nathaliae* su dehidrirane do 5,88 % i 7,87 % relativnog sadržaja vode (RWC) zadržavanjem vode tokom 15 dana, a zatim su biljke rehidrirane 72 sata do 94,67 % i 97,02 % RWC.

Tokom isušivanja, biljke *R. serbica* očuvale su sadržaj hlorofila oko 84 %, a *R. nathaliae* oko 90 %. Tokom dehidracije, odnos F_v/F_m , smanjena je za oko 40 % kod biljaka *R. nathaliae*, ali je snažno smanjenje od 60 % zabeleženo kod *R. serbica*.

Nakon rehidracije, odnos F_v/F_m se brže oporavlja kod *R. nathaliae*. Veće stope fotosinteze su takođe mogle da se detektuju putem snimanja odnosa smanjenja fluorescencije hlorofila Rfd , koji je imao veće vrijednosti nakon rehidracije listova *R. nathaliae* u poređenju sa *R. serbica*. **Rezultati su pokazali da se fotosintetička aktivnost i sadržaj hlorofila nakon rehidratacije brže obnavljaju kod *R. nathaliae* u odnosu na *R. serbica*.**

Tolerancija vegetativnog tkiva vaskularnih biljaka na isušivanje dokazana je kod oko 350 vrsta, što čini manje od 0,2% ukupne flore (Porembski i Barthlott 2000), ali se lista stalno proširuje. Ove biljke koje su tolerantne na isušivanje se takođe nazivaju **biljkama uskrsnuća**, jer se mogu vaskrsnuti rehidratacijom (Toldi et al. 2009). Biljke koje su tolerantne na isušivanje su sposobne da izdrže veliki gubitak vode do skoro potpunog isušivanja, istovremeno održavajući neke metaboličke funkcije i održavajući sposobnost brzog obnavljanja normalne fiziološke aktivnosti nakon rehidratacije (Schwab et al. 1989). Biljke koje su tolerantne na uskrsnuće ili seciranje mogu se podijeliti na *homoiohlorofilne* i *poikilohlorofilne* tipove (Tuba et al. 1998).

Tokom isušivanja homoiohlorofilne biljke zadržavaju svoj sadržaj hlorofila, dok poikilohlorofilne biljke gube sadržaj hlorofila koji su i dalje u stanju da ponovo sintetišu nakon rehidratacije (Bevlei 1979; Gaff 1989;

Navari-Izzo i Rascio 1999). U **homoiohlorofilnim biljkama**, tokom dehidracije, količine hlorofila su uporedive sa onima u svježem tkivu (Navari-Izzo et al. 1994).

Poikilohidrične biljke - odlikuju se promjenjivom vlažnošću svojih ćelija i tkiva i u slučaju smanjenja vlažnosti prelaze u reverzibilno stanje mirovanja tzv. anabiozu.

Ova studija ima za cilj da dalje istraži reakcije fotosintetske aktivnosti *R. serbica* i, po prvi put, *R. nathaliae* na dehidraciju i rehidraciju. Napravljeno je poređenje slikanja fluorescencije hlorofila i odgovora sadržaja fotosintetskog pigmenta tokom dehidracije i rehidracije kako bi se istražile njihove potencijalne uloge u fenomenu uskršnuća ove dvije vrste.

1.2. Materijali i metode

Biljni materijal

Biljke *R. serbica* i *R. nathaliae* približno iste starosti sakupljene su iz njihovog prirodnog staništa zajedno sa slojem zemlje na kome su rasle. Biljke *R. serbica* sakupljene su sa Šar planine, blizu grada Prizrena (Srbija), a biljke *R. nathaliae* iz klisure rijeke Matke, blizu grada Skoplja (Makedonija). Sakupljene biljke su držane dvije nedelje uz punu vodu do početka eksperimenata. Zatim biljke su dehidrirane 15 dana zadržavanjem vode a poslije 14 dana listovi obje vrste su potpuno isušeni i biljke su bile u stanju anabioze.

Poslije 5 dana u anabiozi, biljke su rehidrirane sve dok nisu povratile svoj početni hidratizovani status. Rehidracija je postignuta prskanjem biljaka vodom.

Za analizu su uzeti uzorci listova sa potpuno hidratisanih kontrolnih biljaka (C), od biljaka u različitim fazama dehidracije, nakon 7 dana (D1), 10 dana (D2), 14 dana (D3) i 15 dana (D4), i nakon ponovnog zalivanja, nakon 6 (R1), 12 (R2), 24 (R3) i 48 (R4) sati.

Određivanje fotosintetskog pigmenta

Sa pet biljaka sa sredine rozete uzeta su tri lista slične starosti, uporedive veličine, da bi se odredio sadržaj fotosintetskih pigmenata.

Fotosintetski pigmenti, **hlorofili a i b** kao i **karotenoidi**, ekstrahovani su sa 80% acetona. Sadržaji hlorofila i karotenoida su izračunati korišćenjem vrijednosti apsorpcije na 663 nm, 644 nm i 452,5 nm (maksimalna apsorpcija hlorofila a (Chl a), hlorofila b (Chl b) i karotenoida, respektivno) mjerenih UV-vis spektrofotometrom.

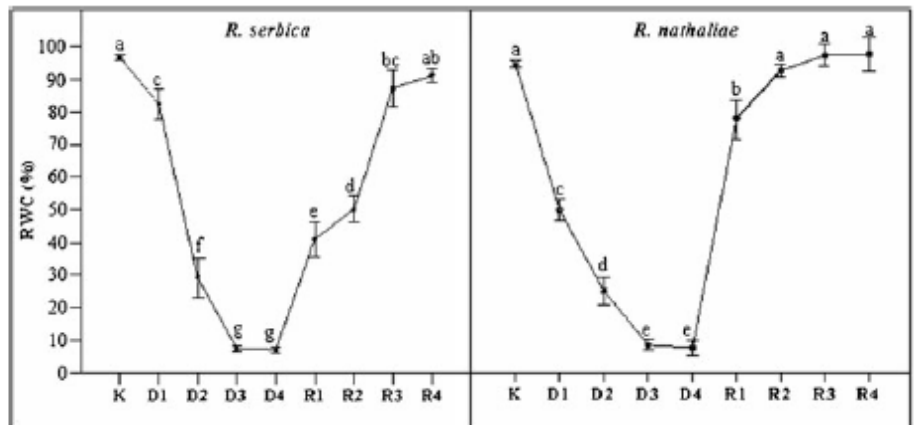
1.3. Rezultati i diskusija

Relativni sadržaj vode

Smanjenje relativnog sadržaja vode (RWC) listova *R. serbica* i *R. nathaliae* tokom isušivanja u našim eksperimentalnim uslovima prikazano je na Sl. 1. Objie vrste Ramonda na početku eksperimenta (kontrola) imale su sličan RWC (93-96 %). Nakon dehidracije zadržavanjem vode u trajanju od 15 dana (D4), RWC se smanjio na vrijednost od 5,88% kod *R. serbica* i 7,87% kod *R. nathaliae*.

Početni stadijum dehidracije (D1) je počeo poslije 7 dana, kod *R. serbica* smanjenje RWC-a na ~80% dok su se manje otporne u ranim fazama dehidracije pokazale biljke *R. nathaliae*, gde se RWC smanjio na ~50%. Posle 10 dana (D2) dehidracije RWC se smanjio na ~30% za dvije vrste Ramonda.

Fig. 1 Relative water content (RWC) of *R. serbica* and *R. nathaliae* leaves during dehydration and rehydration cycle. Different letters indicate significant differences at the P 0.05 by one-way ANOVA with Duncan multiple range tests. Control plants (C), from plants in different stages of dehydration, after 7 days (D1), 10 days (D2), 14 days (D3) and 15 days (D4), and upon re-watering, after 6 (R1), 12 (R2), 24 (R3) and 48 (R4) hours



Slika 1. Smanjenje relativnog sadržaja vode (RWC) listova *R. serbica* i *R. nathaliae*

Nakon ponovnog zalivanja, RWC je brzo obnovljen, listovi su počeli da se razvijaju u prvih 6 h nakon početne rehidracije, sa relativnim sadržajem vode koji je dostigao ~70% (R1) kod *R. nathaliae* i ~30% kod *R. serbica*. Relativni sadržaj vode (RWC) *R. nathaliae* i *R. serbica* nastavio je da raste na 95-97% (R4), u listovima ubranim nakon 48 h ponovnog zalivanja.

Ovi rezultati RWC su pokazali da je dehidracija listova *R. serbica* bila veoma spora, posebno u prvoj fazi, dok je kod *R. nathaliae* bila brža. S druge strane, rehidracija je brzo obnovljena kod *R. nathaliae* nego kod *R. serbica*. Pored toga, za razlike u prvim fazama dehidracije (D1–D2) i u R1 obje vrste, možemo pretpostaviti da su *R. serbica* i *R. nathaliae* sačuvale prirodne i molekularne mehanizme adaptacije u svojim uslovima.

U ovom slučaju, uglavnom na staništima *R. serbica* prisutnim oko rozeta, mahovine se slažu da bi očuvale vlažnost zemljišta. Mahovine efikasno upijaju vlagu, a istovremeno imaju ulogu izolacionog pufra, koji sprečava brzo isparavanje iz plitkog zemljišta (Rakić i sar. 2009). *R. serbica* obitava na vlažnijim i hladnijim staništima, prvenstveno zaklonjenim šumskim krošnjama, dok se *R. nathaliae* nalazi na otvorenijim, suvljim i toplijim staništima.

Ove ekološke razlike su pokazale da je *R. nathaliae* više kserofitna vrsta od *R. serbica* (Stevanović et al. 1991). Dakle, očuvanje RWC kod *R. serbica* više nego kod *R. nathaliae*, u prvoj fazi dehidracije (D1), može biti posljedica ovih stanja.

Fotosintetski pigmenti

Sadržaj hlorofila **a** i **b** blago se smanjio nakon isušivanja listova *R. serbica* i *R. nathaliae* i oporavio se nakon rehidracije (Tabela 1). Ukupni sadržaj hlorofila na kontroli biljaka (C) *R. serbica* bio je veći od *R. nathaliae*.

Tokom dehidracije, sadržaj ukupnog hlorofila u *R. serbica* i *R. nathaliae* nije pokazao značajne promjene sve do 14 dana nakon početka isušivanja (RWC ~30 %). Posle 15 dana dehidracije, ukupni sadržaj hlorofila je smanjen i dostigao najnižu vrijednost na RWC ~7 %.

Kod *R. nathaliae* ponovna sinteza hlorofila je započela 6 h (R1) nakon rehidracije i trebalo je samo 48 h (R4) da se povrati i premašila je kontrolne (potpuno hidratizovane biljke) vrijednosti. S druge strane, *R. serbica* ponovna sinteza hlorofila je počela 12 h (R2) nakon rehidracije i povratila kontrolne vrednosti nakon 48 h (R4). Smanjenje ukupnog sadržaja hlorofila *R. serbica* tokom anabioze iznosilo je oko 15 % (očuvano oko 85 %), dok je *R. nathaliae* sačuvala više od 89 % ukupnog sadržaja hlorofila tokom anabioze.

Slične promene tokom dehidracije-rehidracije uočene su i u sadržaju **karotenoida** *R. serbica*. Nasuprot tome, u listovima *R. nathaliae* tokom dehidracije, karotenoidi su pokazali ograničenu promenu, dok su pri rehidraciji porasli za oko 11 %.

Prema ovim rezultatima i prethodnim istraživanjima drugih autora (Dražić et al. 1999; Augusti et al. 2001; Markovska et al. 1994), **biljke *R. serbica* i *R. nathaliae* mogu se uvrstiti među homoiohlorofilne angiosperme otporne na isušivanje jer zadržavaju najveći dio njihovog sadržaja hlorofila tokom isušivanja.**

Table 1 Photosynthetic pigments content (mg g⁻¹ dry weight) of *R. serbica* and *R. nathaliae* species during dehydration and rehydration cycle

Control plants (C), from plants in different stages of dehydration, after 7 days (D1), 10 days (D2), 14 days (D3) and 15 days (D4), and upon re-watering, after 6 (R1), 12 (R2), 24 (R3) and 48 (R4) hours. The data are present by mean and standard error (±). Mean in each column followed by same letters are not significantly different at the P 0.05 by one-way ANOVA with Duncan's multiple range tests

| Parameters | Chl a | Chl b | Total Chl | Carotenoids |
|---------------------|---------------------------|----------------------------|----------------------------|---------------------------|
| <i>R. serbica</i> | | | | |
| C | 2.92 ± 0.09 ^{AB} | 1.91 ± 0.04 ^{A-C} | 4.83 ± 0.13 ^{AB} | 1.02 ± 0.02 ^{BC} |
| D1 | 3.45 ± 0.08 ^A | 2.31 ± 0.05 ^{AB} | 5.76 ± 0.12 ^A | 1.10 ± 0.04 ^B |
| D2 | 3.42 ± 0.32 ^A | 2.40 ± 0.22 ^A | 5.82 ± 0.54 ^A | 1.32 ± 0.12 ^A |
| D3 | 2.51 ± 0.27 ^B | 1.63 ± 0.28 ^C | 4.15 ± 0.55 ^B | 0.92 ± 0.09 ^{BC} |
| D4 | 2.47 ± 0.24 ^B | 1.60 ± 0.26 ^C | 4.08 ± 0.50 ^B | 0.89 ± 0.07 ^{BC} |
| R1 | 2.29 ± 0.01 ^B | 1.64 ± 0.01 ^C | 3.94 ± 0.01 ^B | 0.92 ± 0.01 ^{BC} |
| R2 | 2.44 ± 0.26 ^B | 1.51 ± 0.14 ^C | 3.95 ± 0.41 ^B | 0.84 ± 0.01 ^C |
| R3 | 2.79 ± 0.03 ^B | 1.83 ± 0.09 ^{BC} | 4.63 ± 0.12 ^B | 0.93 ± 0.01 ^{BC} |
| R4 | 2.89 ± 0.01 ^{AB} | 2.00 ± 0.01 ^{A-C} | 4.90 ± 0.01 ^{AB} | 1.00 ± 0.05 ^{BC} |
| <i>R. nathaliae</i> | | | | |
| C | 2.56 ± 0.07 ^{CD} | 1.63 ± 0.06 ^B | 4.19 ± 0.12 ^{CD} | 0.76 ± 0.01 ^D |
| D1 | 2.47 ± 0.06 ^{DE} | 1.63 ± 0.04 ^B | 4.10 ± 0.10 ^{CD} | 0.86 ± 0.02 ^C |
| D2 | 2.53 ± 0.04 ^{CD} | 1.68 ± 0.01 ^B | 4.22 ± 0.04 ^{CD} | 0.99 ± 0.02 ^B |
| D3 | 2.31 ± 0.02 ^{EF} | 1.63 ± 0.02 ^B | 3.94 ± 0.04 ^{C-E} | 0.81 ± 0.02 ^{CD} |
| D4 | 2.22 ± 0.04 ^F | 1.56 ± 0.03 ^B | 3.78 ± 0.07 ^{DE} | 0.81 ± 0.02 ^{CD} |
| R1 | 2.33 ± 0.12 ^{EF} | 1.59 ± 0.09 ^B | 3.92 ± 0.21 ^E | 0.86 ± 0.04 ^C |
| R2 | 2.67 ± 0.05 ^C | 1.57 ± 0.03 ^B | 4.24 ± 0.08 ^C | 0.82 ± 0.02 ^{CD} |
| R3 | 2.96 ± 0.01 ^B | 2.05 ± 0.01 ^A | 5.02 ± 0.01 ^B | 1.08 ± 0.01 ^A |
| R4 | 3.16 ± 0.06 ^A | 2.15 ± 0.01 ^A | 5.31 ± 0.02 ^A | 1.14 ± 0.01 ^A |

Tabela 1. Sadržaji fotosintetskih pigmenata *R. serbica* i *R. nathaliae* tokom ciklusa dehidracije i rehidracije

Odnos hlorofila **a/b** kod *R. serbica* (slika 2) bio je veći u fazi isušivanja (D3 i D4) nego kod kontrolnih biljaka (C). Za ovaj parametar, između dana dehidracije i rehidracije, uočena je statistička značajnost. S druge strane, najveći odnos hlorofila a/b kod *R. nathaliae* bio je 12 h nakon rehidracije (R2), a najmanji 14 i 15 dana (D3 i D4) nakon dehidracije (Sl. 2).

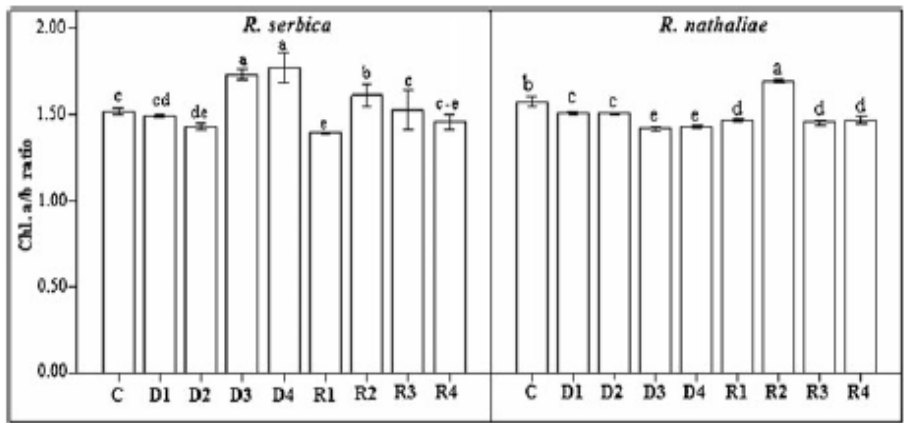


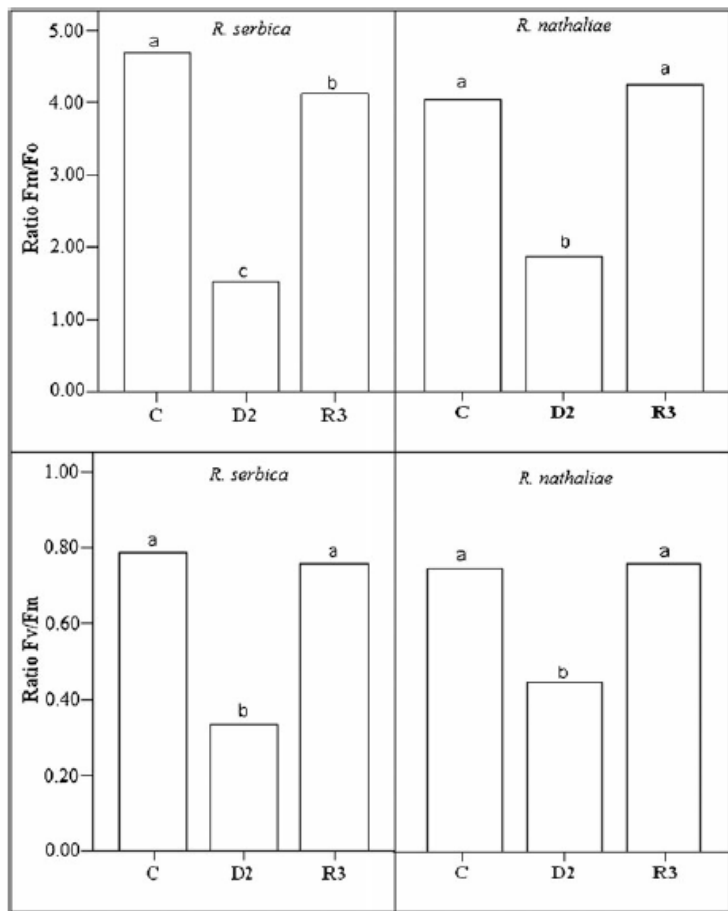
Fig. 2 Chlorophyll *a/b* ratio of *R. serbica* and *R. nathaliae* leaves during dehydration and rehydration cycle. Different letters indicate significant differences at the P 0.05 by one-way ANOVA with Duncan multiple range

tests. Control plants (C), from plants in different stages of dehydration, after 7 days (D1), 10 days (D2), 14 days (D3) and 15 days (D4), and upon re-watering, after 6 (R1), 12 (R2), 24 (R3) and 48 (R4) hours

Slika 2. Odnos hlorofila a/b kod *R. serbica* i *R. nathaliae* tokom dehidratacije i rehidratacije

***F_o (minimalna fluorescencija) *F_m (maksimalna fluorescencija) *F_v (varijabilna fluorescencija)**

Fig. 3 Image fluorescence ratios (*F_m/F_o* and *F_v/F_m*) of *R. serbica* and *R. nathaliae* leaves grown in conditions of control- full hydrated (C), dehydration after 10 days (D2) and rehydration after 24 hours (R3)



Slika 3. Odnosi fluorescencije slike (*F_m/F_o* i *F_v/F_m*) listova *R. serbica* i *R. nathaliae* uzgajanih u uslovima kontrolne hidratacije (C), dehidracije nakon 10 dana (D2) i rehidratacije nakon 24 sata (R3)

Ovi rezultati su pokazali da vodeni stres ima značajan uticaj na F_v/F_m i F_m/F_o odnos *R. nathaliae* i *R. serbica*. Tokom dehidracije (D2), odnos F_v/F_m i F_m/F_o smanjen je za oko 40 % kod *R. nathaliae*, a jače za oko 60 % kod *R. serbica*. Nakon 24 h (R3) rehidracije *R. serbica*, odnos F_v/F_m i F_m/F_o se značajno povećao, ali je i dalje bio niži od kontrole.

S druge strane, kod *R. nathaliae*, odnos F_v/F_m i F_m/F_o je nakon rehidracije povećan više nego kod kontrolnih (C1) biljaka.

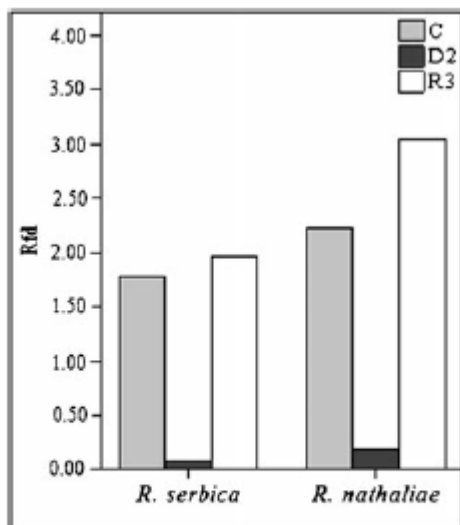


Fig. 4 Fluorescence decline ratio image Rfd of leaves of *R. serbica* and *R. nathaliae* grown in conditions of control-full hydrated (C), dehydration after 10 days (D2) and rehydration after 24 hours (R3) (pseudoscale 0–4)

Slika 4. Odnos opadanja fluorescencije listova *R. serbica* i *R. nathaliae* uzgajanih u uslovima kontrolne pune hidratacije (C), dehidratacije posle 10 dana (D2) i rehidratacije posle 24 sata (R3) (pseudoskala 0–4)

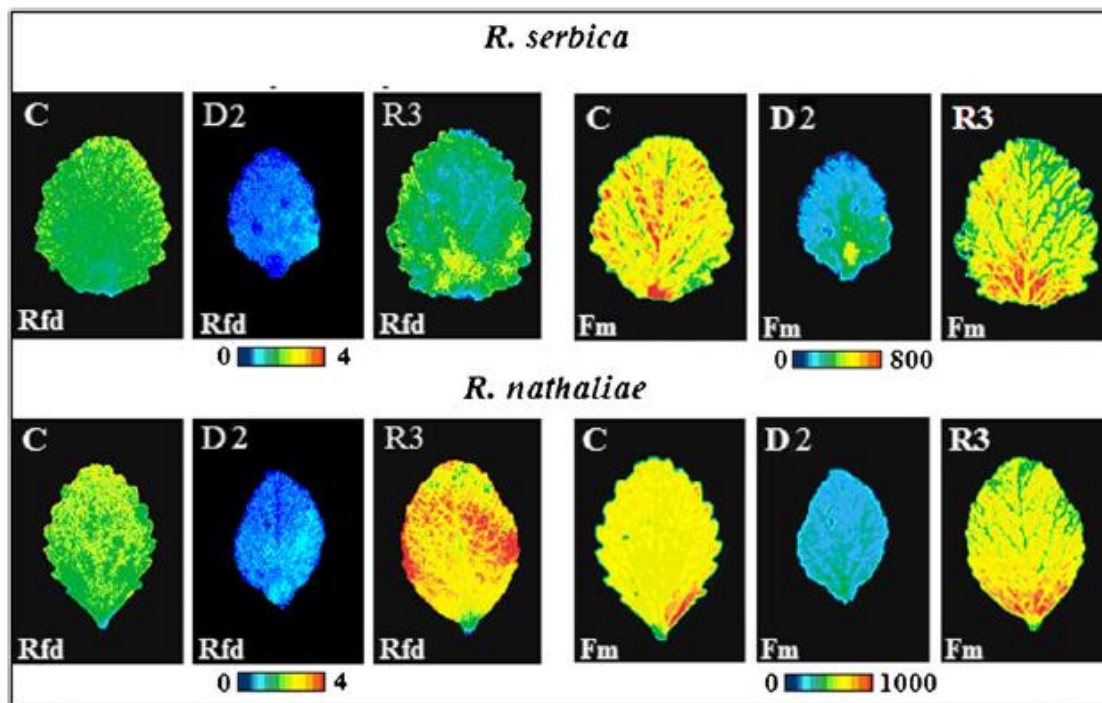


Fig. 5 The fluorescence decline ratio image *Rfd* leaves and maximum Chl fluorescence in the dark-adapted state *Fm* of *R. serbica* and *R. nathaliae* grown in conditions of control-full hydrated (C), dehydration after 10 days (D2) and rehydration after 24 hours (R3) (pseudoscale 0–4)

Slika 5. Koeficijent opadanja fluorescencije listova i maksimalne Chl fluorescencije u tamno prilagođenom stanju *Fm* *R. serbica* i *R. nathaliae* uzgajanih u uslovima kontrolne pune hidratacije (C), dehidratacije posle 10 dana (D2) i rehidratacije posle 24 sata (R3) (pseudoskala 0–4)

1.4. Zaključak

Na osnovu dobijenih rezultata, **zaključci su sljedeći:**

1) Smanjenje relativnog sadržaja vode (RWC) u listovima sa vrijednosti od 93-96 % u potpuno hidratiranim (kontrolne biljke) na vrijednosti od samo 4-7 % nakon isušivanja primjećeno je kod obje vrste Ramonda. Nakon rehidracije, biljke su pokazale brži oporavak svog sadržaja vode, vraćajući 95-97% RWC nakon 48 h. Za ovaj parametar, *R. serbica* je u prvoj fazi dehidracije bila otpornija, dok se kod *R. nathaliae* RWC brže oporavila nakon rehidracije.

2) Prema ovim rezultatima, biljke *R. serbica* i *R. nathaliae* mogu se uvrstiti među homoiohlorofilne skrivenosjemenice koje su otporne na isušivanje jer zadržavaju najveći dio svog sadržaja hlorofila tokom isušivanja (85% odnosno 89%).

3) Tokom dehidracije (D2) odnos Fv/Fm i Fm/Fo smanjen je za oko 40 % kod *R. nathaliae*, a jače za oko 60 % kod *R. serbica*. Potpuni oporavak fotosintetske aktivnosti nekoliko sati nakon rehidracije ukazuje na to da listovi *R. serbica* i *R. nathaliae* potpuno obnavljaju integritet tilakoidne membrane i aktivnost PSII, u zavisnosti od težine stresa.

Štaviše, sadašnji rezultati sugerišu da je *R. nathaliae* bila otpornija tokom isušivanja od *R. serbica* i da se brže oporavila do normalne fiziološke aktivnosti nakon ponovnog zalivanja.