

# Osjetljivost mutanata i nadekspresora za auksinske amidohidrolaze uročnjaka (*Arabidopsis thaliana*) na solni, osmotski i temperaturni stres

---

Tudor, Matko

Master's thesis / Diplomski rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:252137>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-25**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Matko Tudor

**Osjetljivost mutanata i nadekspresora za  
auksinske amidohidrolaze uročnjaka  
(*Arabidopsis thaliana*) na solni, osmotski i  
temperaturni stres**

Diplomski rad

Zagreb, 2022

Ovaj rad izrađen je u Laboratoriju za razvojnu biologiju biljaka na Zavodu za molekularnu biologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu i u Laboratoriju za kemijsku biologiju na Zavodu za molekularnu biologiju Instituta Ruđer Bošković, pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Nataše Bauer. Rad je izrađen u sklopu DAAD projekta „Uloga auksin amidohidrolaza uročnjaka (*Arabidopsis thaliana*) u toplinskom stresu“ (voditeljice: prof.dr.sc. Jutta Ludwig Muller i dr.sc. Branka Salopek Sondi). Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistar molekularne biologije.

## Zahvala

*Iskreno se zahvaljujem svojim roditeljima, bratu, sestrama, babi i didu na neizmjerne podršci tijekom svih godina studiranja. Zahvaljujem se i svim prijateljima na bodrenju i stvaranju pritiska da što prije završavam svoje studentske obveze. Ogromno hvala i svim članovima Laboratorija za kemijsku biologiju, a posebice dr. sc. Ani Smolko na vječnoj dostupnosti te podijeljenim praktičnim vještinama. Zahvaljujem se i članovima Laboratorija za razvojnu biologiju biljaka, mag. biol. mol. Mateji Jagić, mag. biol. mol. Tamari Vuk i mag. biol. mol. Mirti Tokić i tehničarki Ani na vječitoj spremnosti za pomoć studentu u nevolji. Najviše hvala izv. prof. dr. sc. Nataši Bauer na iznimnom strpljenju, toleranciji, susretljivosti i na pruženom teoretskom i praktičnom znanju. Svim članovima Laboratorija za razvojnu biologiju biljaka duboko se ispričavam na razbijenoj pipeti.*

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

---

Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Diplomski rad

## Osjetljivost mutanata i nadekspresora za auksinske amidohidrolaze uročnjaka (*Arabidopsis thaliana*) na solni, osmotski i temperaturni stres

Matko Tudor

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Za optimalni učinak, koncentracija auksina u stanicama je strogo regulirana transportom i metabolizmom auksina. Konjugati auksina predstavljaju skladišnu ili razgradnu formu auksina. Auksinske amidohidrolaze su enzimi koji hidroliziraju konjugate te oslobađaju aktivni oblik auksina. U ovom istraživanju, odredio sam relativnu ekspresiju gena za auksinske amidohidrolaze *ILR1*, *ILL2* i *IAR3* u nadekspresorskim linijama *ILR1 13.3*, *ILR1 3.1*, *ILL2 25.6*, *ILL2 27.2*, *ILL2 8.2*, *IAR3 11.5* te *IAR3 13.4* vrste *Arabidopsis thaliana*, ekotipa Wassilewskija. Istražio sam utjecaj solnog (150 mM NaCl), osmotskog (300 mM manitola) i temperaturnog stresa (38 °C) na produžni rast i razvoj korijena kod nadekspresora i mutanata (*ilr1-2*, *ill2-1*, *iar3-2*, *ill2-iar3-2* i *ilr1-2ill2-iar3-2*) auksinskih amidohidrolaza. Uz to, analizirao sam lokalizaciju rekombinantnog proteina ILL2-GFP u korijenu biljke nadekspresora *ILL2 8.2* uzgajanih u uvjetima solnog, osmotskog i temperaturnog stresa. Nadekspresorske linije *ILR1 3.1*, *ILR1 13.3* i *ILL2 27.2* imale su 731.17, 182.5 odnosno 350.93 puta veću ekspresiju odgovarajućeg gena auksinske amidohidrolaze u odnosu na divlji tip. Navedene linije su imale i značajnu promjenu u arhitekturi korijena u uvjetima solnog stresa u odnosu na divlji tip. U uvjetima solnog i osmotskog stresa nakupljanje proteina ILL2 bilo je povećano u zoni sazrijevanja korijena, dok se u vršku korijena nije mijenjalo u odnosu na kontrolne uvjete.

Ključne riječi: indol-3-octena kiselina (IAA), konjugati indol-3-octene kiseline, arhitektura korijena

(53 stranica, 11 slika, 7 tablica, 5 priloga, 62 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski).

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Mentor: izv. prof. dr. sc. Nataša Bauer

Ocjenitelji:

Rad prihvaćen: 8.9.2022.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

---

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Biology

Master thesis

### The sensitivity of *Arabidopsis thaliana* auxin amidohydrolase mutants and overexpressors on salt, osmotic and temperature stress

Matko Tudor

Rooseveltovej trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Auxins act in concentration dependant manner, that is tightly controled by auxin metabolism as well as its transportation. Auxin conjugates are storage or degradable forms of auxins. Auxin amidohydrolases are enzymes that hydrolyse conjugates and release the active form of auxin. In this research, I measured relative expression of auxin amidohydrolases *ILR1*, *ILL2* i *IAR3* in *Arabidopsis thaliana*, ecotype Wassilewskija, overexpressing lines *ILR1 13.3*, *ILR1 3.1*, *ILL2 25.6*, *ILL2 27.2*, *ILL2 8.2*, *IAR3 11.5* and *IAR3 13.4*. To reveal function of auxin amidohydrolases in plant stress response I investigated the influence of salt (150 mM NaCl), osmotic (300 mM mannitol) and temperature stress (38 °C) on growth and development of roots in overexpressing lines and auxin amidohydrolase mutants (*ilr1-2*, *ill2-1*, *iar3-2*, *ill2-liar3-2* i *ilr1-2ill2-liar3-2*). Further, I analysed localisation of recombinant protein ILL2-GFP in the overexpressing line *ILL2 8.2*, grown in conditions of salt, osmotic and temperature stress. Overexpressing lines *ILR1 3.1*, *ILR1 13.3* and *ILL2 27.2* had 731.17, 182.5 and 350.93 times higher expression of corresponding native gene compared to wild type, respectively. The root architecture of those overexpressing lines was significantly changed in salt stress condition, compared to wild type. In salt and osmotic stress, the accumulation of ILL2 was significantly increased in the root maturation zone and did not change in the root tip compared to the control conditions.

Key words: indole-3-acetic acid (IAA), conjugates of indole-3-acetic acid, root architecture (53 pages, 11 images, 7 tables, 5 supplements, 62 citations, original in: Croatian)

Thesis is deposited in Central Biological Library.

Mentor: Dr. sc. Nataša Bauer, Assoc. Prof

Reviewers:

Thesis accepted: 8.9.2022.

# SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. METABOLIZAM AUKSINA .....	2
1.1.1. Biosinteza IAA .....	2
1.1.2. Skladištenje i skladišni oblici IAA .....	5
1.1.3. Inaktivacija i razgradnja IAA.....	7
1.2. AUKSINSKA SIGNALIZACIJA .....	8
1.3. PRIJENOS AUKSINA .....	9
1.4. PRODUŽNI RAST STANICA.....	10
1.5. UTJECAJ AUKSINA NA RAZVOJ KORIJENA .....	11
1.6. ARHITEKTURA KORIJENA U STRESNIM UVJETIMA .....	13
1.6.1. Fiziološki i biokemijski odgovor biljaka na solni i osmotski stres.....	13
1.6.2. Fiziološki i biokemijski odgovor biljaka na temperaturni stres.....	14
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA .....	16
3. MATERIJALI I METODE .....	17
3.1. MATERIJALI .....	17
3.1.1. Biljni materijal.....	17
3.1.1.1. Biljke nadekspresori auksinskih amidohidrolaza .....	17
3.1.1.2. Biljke mutante auksinskih amidohidrolaza .....	18
3.1.2. Hranjivi mediji za uzgoj biljaka.....	19
3.1.3. Početnice za PCR i qPCR.....	20
3.2. METODE .....	21
3.2.1. Priprema hranjivih medija za uzgoj biljaka.....	21
3.2.2. Sterilizacija sjemenki.....	21
3.2.3. Uzgoj biljaka nadekspresora i mutanata za auksinske amidohidrolaze .....	22
3.2.3.1. Uzgoj biljaka na krutom mediju MS0 i mediju MS s dodatkom higromicina b.....	22
3.2.3.2. Uzgoj biljaka u zemlji i prikupljanje sjemenki .....	22
3.2.3.3. Uzgoj biljaka u stresnim uvjetima.....	23
3.2.4. Mjerenje duljine primarnog korijena i određivanje broja bočnog korijenja .....	24
3.2.5. Izolacija ukupne RNA .....	25
3.2.6. Reverzna transkripcija.....	26
3.2.7. Metoda PCR .....	26
3.2.8. Metoda qPCR .....	27
3.2.9. Fluorescencijska mikroskopija i kvantifikacija proteina ILL2-GFP.....	29

3.2.10. Statistička obrada podataka .....	29
4. REZULTATI .....	30
4.1. ODREĐIVANJE EKSPRESIJE GENA U TRANSGENIČNIM BILJKAMA S NADEKSPRESIJOM GENA <i>ILR1, ILL2</i> i <i>IAR3</i> .....	30
4.2. PROVJERA HOMOZIGOTNOSTI LINIJA NADEKSPRESORA I UČINAK STERILIZACIJE NA KLIJAVOST SJEMENKI .....	32
4.3. ARHITEKTURA KORIJENA BILJAKA NADEKSPRESORA I MUTANATA U UVJETIMA BEZ STRESA .....	32
4.4. UTJECAJ TEMPERATURNOG STRESA NA ARHITEKTURU KORIJENA BILJAKA NADEKSPRESORA I MUTANATA .....	32
4.5. UTJECAJ SOLNOG STRESA NA ARHITEKTURU KORIJENA BILJAKA NADEKSPRESEORA I MUTANATA .....	33
4.6. UTJECAJ OSMOTSKOG STRESA NA ARHITEKTURU KORIJENA BILJAKA NADEKSPRESORA I MUTANATA .....	37
4.7. NAKUPLJANJE PROTEINA <i>ILL2</i> U KORIJENU BILJAKA NADEKSPRESORA <i>ILL2 8.2</i> UZGAJANIH U UVJETIMA SOLNOG, OSMOTSKOG I TEMPERATURNOG STRESA .....	37
5. RASPRAVA .....	39
6. ZAKLJUČAK .....	46
7. LITERATURA .....	47
8. ŽIVOTOPIS .....	52
9. PRILOZI .....	53



## KRATICE

AUX – Auksinska permeaza

GH3 – GRETCHEN HAGEN 3

IAA – Indol-3-octena kiselina

IAA-Ala – konjugat aminokiseline alanin i IAA

IAA-Glu – konjugat aminokiseline glutamat i IAA

IAA-Leu – konjugat aminokiseline leucin i IAA

IAA-Phe – konjugat aminokiseline fenilalanin i IAA

IAA-Trp – konjugat aminokiseline triptofan i IAA

IAA-Val – konjugat aminokiseline valin i IAA

IAM – indol acetamid

IAOx – indol acetaldoksim

IAR3 – IAA-alanin rezistentan 3

IBA – indol-3-maslačna kiselina

ILL2 – sličan IAA-leucin rezistentan 2

ILR1 – IAA-leucin rezistentan 1

IPyA – indol-3-piruvatna kiselina

PCR – lančana reakcija polimerazom

PIN – PIN-formed

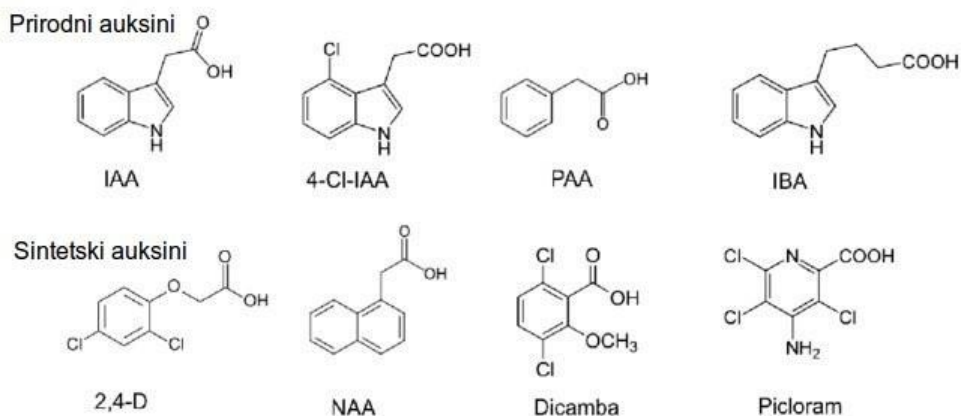
qPCR – kvantitativna lančana reakcija polimerazom

RT – reverzna transkripcija

YUC – YUCCA

## 1. UVOD

Auksini su skupina biljnih hormona koji imaju bitnu ulogu u rastu i razvoju biljaka te odgovoru biljaka na vanjske uvjete. Istraživanje auksina započelo je krajem devetnaestog stoljeća, kada su Charles i Francis Darwin istraživali fototropni odgovor trave *Phalaris canariensis*. U svojem istraživanju, Darwini su predvidjeli su postojanje kemijskog spoja u koleoptilu koja potiče produžni rast stanica na zasjenjenoj strani koleoptila trave *P. canariensis* (Darwin i Darwin, 1896). Kasnije je ova tvar izolirana, okarakterizirana i nazvana grčkom riječju *auxein*, što znači "povećati" ili "rasti" (Taiz i sur., 2015). Danas znamo da auksini ne sudjeluju samo u fototropizmu, već i u mnogim aspektima rasta i razvoja biljaka, kao što su produžni rast biljnih stanica, dioba, organogeneza stabljike i korijena, što uključuje i apikalnu dominaciju, razvoj floema i ksilema, diferencijalni rast tkiva u tropizmima itd.. Također, auksini imaju važnu ulogu u senescenciji biljaka, odgovoru na infekcije patogenima te odgovoru biljaka na abiotičke stresove i ostale vanjske uvjete (Simon i Petrášek, 2011). Auksini su kemijski raznolika skupina spojeva, no njihov utjecaj na rast, razvoj i fiziologiju bilja je sličan. Kemijska sličnost ograničena je na aromatski prsten u središtu te karboksilnu skupinu kao bočni ogranak (Enders i Strader, 2015) (Slika 1.). Poznato je da biljke sintetiziraju četiri endogena auksina: indol-3-octena kiselina (IAA), indol-3-maslačna kiselina (IBA), 4-klorindol-3-octena kiselina (4-Cl-IAA) i feniloctena kiselina (PAA) (Simon i Petrášek, 2011). Od njih, najzastupljenija je i najveći fiziološki učinak ima IAA te će se u nastavku teksta raspravljati o toj formi auksina. Ostali navedeni oblici auksina nisu zastupljeni kod svih biljaka i imaju puno slabiji auksinski učinak od IAA (Casanova-Sáez i Voš., 2019). Danas postoji i mnogo sintetskih oblika auksina, koji se često koriste u poljoprivredi u obliku gnojiva i herbicida. Neki od njih su 2,4-diklorofenoksiocetna kiselina (2,4-D), 1-naftalen octena kiselina (NAA), 2-metoksi-3,6-diklorobenzoična kiselina (dicamba) i 4-amino-3,5,6-trikloro-2-piridinekarboksilna kiselina (picloram) (Chandrasekaran, 2015).



Slika 1. Kemijske strukture prirodnih (indol-3-octena kiselina (IAA), 4-klorindol-3-octena kiselina (4-Cl-IAA), feniloctena kiselina (PAA) i indol-3-maslačna kiselina (IBA)) i sintetskih auksina (2,4-diklorofenoksiocetna kiselina (2,4-D), 1-naftalen octena kiselina (NAA), 2-metoksi-3,6-diklorobenzoična kiselina (dicamba) i 4-amino-3,5,6-trikloro-2-piridinekarboksilna kiselina (picloram)) (preuzeto od Chandrasekaran, 2015).

## 1.1. METABOLIZAM AUKSINA

Za optimalni rast, razvoj i odgovor biljaka na vanjske uvjete, koncentracija IAA u biljnim stanicama strogo je regulirana. Prevelika ili premala koncentracija IAA dovodi do poremećenog rasta, razvoja i odgovora biljaka na vanjske uvjete. Regulacija koncentracije IAA u biljnim stanicama postiže se metaboličkim procesima (sintezom, skladištenjem i razgradnjom) te transportom između različitih organa ili tkiva (Casanova- Sáez *i sur.*, 2019). Navedeni procesi ukratko su opisani u nastavku teksta.

### 1.1.1. Biosinteza IAA

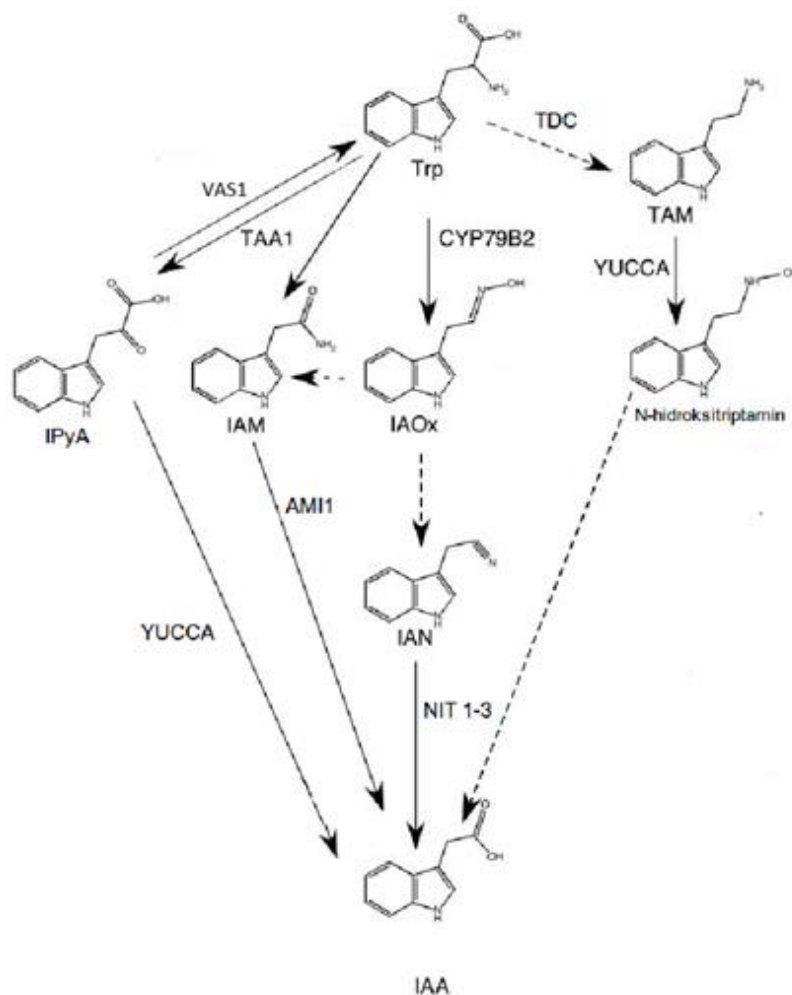
Biosinteza IAA događa se u gotovo svim biljnim tkivima, no u najvećoj mjeri se događa u lisnim primordijima i mladim listovima. IAA se može biosintetizirati na različite načine. Biosintetski putevi IAA se mogu podijeliti na triptofan ovisne i triptofan neovisne. U triptofan ovisnim biosintetskim putevima IAA glavni prekursor je triptofan, međutim ovi metabolički putevi razlikuju se prema derivatima triptofana (indol-3-piruvatna kiselina (IPyA), indol acetaldoksim (IAOx) i indol acetamid (IAM)) iz kojih se IAA sintetizira (Casanova-Sáez i Voß., 2019). Put IPyA je najbolje istražen triptofan ovisni biosintetski put IAA te se sastoji od svega dva koraka (Casanova-Sáez i Voß., 2019). U prvom koraku sudjeluju enzimi triptofan aminotransferaze TAA i homolozi TAR1 i TAR2, koji kataliziraju pretvorbu triptofana u IPyA. Ovi enzimi kataliziraju prijenos amino skupine s triptofana na piruvat te nastaju IPyA i jedna aminokiselina. Drugi korak ovisan je o molekularnom kisiku i NADPH te ga kataliziraju flavinske monooksigenaze YUCCA (YUC) koji pretvaraju IPyA u IAA (Zhao, 2012) (Slika 2.). Regulacija ovog biosintetskog puta je raznolika. Poznato je, na primjer, da se ekspresija gena iz porodica *TAA* i *YUC* uvjetovana vanjskim uvjetima, kao što su temperatura, pristupačnost hranjivih tvari, količina svjetlosti

i tako dalje. Također, put biosinteze IPyA reguliran je aminotransferazom VAS1 koja katalizira pretvorbu IPyA natrag u triptofan (Casanova-Sáez i Voß., 2019).

IPyA put biosinteze je dominantni biosintetski put IAA kod svih viših biljaka, dok su ostali biosintetski putevi ograničeni na pojedine porodice biljaka. Na primjer, IAOx biosintetski put IAA događa se samo u biljkama roda *Brassicaceae* (Kashara, 2015; Casanova-Sáez i Voß., 2019). IAOx je zajednički prekursor za sintezu IAA i sekundarnih biljnih metabolita glukobrasicina i kamaleksina (Kashara, 2015) koji sudjeluju u obrani biljaka roda *Brassicaceae* od patogena. U ovom biosintetskom putu, triptofan se pretvara u IAOx u reakciji kataliziranoj enzimima iz porodice citokrom P450 monooksigenaza, CYP79B2 i CYP79B3, enzimima prisutnim samo u biljkama roda *Brassicaceae*. Reakcija pretvorbe IAOx u IAA nije u potpunosti razjašnjena, no smatra se da se ova reakcija može odvijati direktno, katalizom pomoću enzima aldehid oksidaze AAO1, ili posredno u putevima sinteze indol glukozinolata. U posljednjem slučaju, zadnji korak uključuje pretvorbu indol-3-acetonitrila (IAN) u IAA, enzimima IAN nitrilazama (NIT 1-3) (Finet i Jaillais, 2012).

IAM biosintetski put IAA temeljito je istražen i opisan kod bakterija, ali ne i u biljkama te nije poznato događa li se u biljkama. Kod bakterija, ovaj biosintetski put uključuje pretvorbu triptofana u IAM pomoću enzima triptofan-2-monooksigenaze (*iaaM*) te pretvorbu IAM u IAA pomoću enzima indol-3-acetamid hidrolaze (*iaaH*) (Casanova-Sáez i Voß., 2019; Morffy i Strader., 2020). U biljkama nije pronađen homolog genu *iaaM* te nije poznat direktan način pretvorbe triptofana u IAM (osim preko IAOx). Enzim AMIDAZA1 (AMI1), prisutan kod viših biljaka ima istu funkciju kao *iaaH* kod bakterija te katalizira pretvorbu IAM u IAA *in vitro*, ali nije dokazana njegova uloga *in planta* (Kashara, 2015; Casanova-Sáez i Voß., 2019; Korasick *i sur.*, 2013; Morffy i Strader., 2020).

Put triptamina, najmanje je poznat put biosinteze IAA i nije potvrđeno postoji li relevantna uloga ovoga puta u biosintezi IAA u višim biljkama (Ljung, 2013). Poznato je da enzim triptofan dekarboksilaza (TDC) pretvara triptofan u TAM te da enzimi iz porodice YUCCA mogu katalizirati pretvorbu TAM u N-hidroksitriptamin, iako reakcija pretvorbe TAM u N-hidroksitriptamin nije potvrđena *in vivo* (Mano i Nemoto, 2012). Koraci reakcije pretvorbe N-hidroksitriptamina u IAA nisu poznati.



Slika 2. Putevi biosinteze indol-3-octene kiseline (IAA) ovisne o triptofanu kod viših biljaka. Sinteza se može odvijati u četiri različita biosintetska puta. Najzastupljeni od svih puteva je put indol-3-piruvatne kiseline (IPyA), dok je put indol acetaldoksima (IAOx) zastupljen samo u biljkama roda Brassicace. Put indol acetamid (IAM) je detaljno istražen kod bakterija, dok kod viših biljaka nije poznat enzim koji pretvara triptodan u IAM. Put triptamina (TAM) najmanje je poznat (preuzeto i prilagođeno od Zhao, 2010).

Iako se smatra da je triptofan najvažniji prekursor za biosintezu IAA, eksperimenti su pokazali da biljke mutante za gene odgovorne za sintezu triptofana i dalje mogu sintetizirati IAA (Kashara, 2015). Mehanizam triptofan neovisnih puteva sinteze IAA i dalje je nepoznat, no smatra se da sinteza IAA može ići iz indol-3-glicerol fosfata koji se pretvara u IAM koji se zatim pretvara u IAA uz katalizu enzimom AMI1 (Mano i Nemoto, 2012). IBA također može biti prevedena u IAA u reakcijama sličnim  $\beta$ -oksidacije masnih kiselina u peroksisomu. Pokazano je da ovaj put nastanka IAA ima specifičnu ulogu u rastu i razvoju izdanka i korijena. Naime, nastanak primordija bočnog korijena je, čini se, ovisan o

ovom putu nastanka IAA (Casanova-Sáez i Voß., 2019). Triptofan ovisni i triptofan neovisni putevi biosinteze IAA aktivni su u različitim periodima embrionalnog razvoja biljaka i u različitim abiotičkim uvjetima. Na primjer postoje dokazi da se u ranom embrionalnom razvoju mrkve IAA sintetizira primarno triptofan neovisnim putem, a nakon uspostave apikalno-bazalne osi, sinteza se nastavlja uglavnom triptofan ovisnim putem (Michalczuk i sur., 1992). Također, poznato je da je u uvjetima niskih temperatura primarno aktivan triptofan ovisni put, dok su pri visokim temperaturama aktivni triptofan neovisni putevi biosinteze IAA (Rosquete i sur., 2012).

### 1.1.2. Skladištenje i skladišni oblici IAA

Biosinteza IAA nije jedini način uspostave koncentracije slobodnog IAA u biljnim stanicama i tkivima, već ovisi i o drugim metaboličkim procesima kao što su transport IAA iz okolnih tkiva, stvaranje konjugata IAA, njihova hidroliza natrag u slobodnu IAA te degradacija IAA. Više biljke skladište IAA u obliku konjugata IAA ili u obliku IBA (Woodward i Bartel, 2005). Većina IAA u biljkama je inaktivirano te je tek 25% IAA u slobodnom obliku (Casanova-Sáez i Voß., 2019). Neki od konjugata su reverzibilni oblici te se mogu hidrolizirati pri čemu nastaje slobodna IAA (Casanova-Sáez i Voß., 2019). IAA može biti konjugirana s aminokiselinama, peptidima ili proteinima amidnom vezom, sa šećerima esterskom vezom ili pak može biti metilirana.

Najdetaljnije istraženi konjugati IAA su konjugati IAA i aminokiselina. Do danas je dokazano nekoliko konjugata auksina s aminokiselinama *in planta*, a to su: IAA-Leu, IAA-Ala, IAA-Asp, IAA-Glu i IAA-Trp. Pretpostavlja se da *in planta* postoje još i IAA-Phe i IAA-Val, zbog identifikacije njihovih oksidativnih produkata (Sanchez Carranza i sur., 2016). Konjugati IAA i aminokiselina mogu biti reverzibilni (IAA-Leu, IAA-Ala, IAA-Phe), čijom se hidrolizom oslobađa aktivna IAA, ili ireverzibilni (IAA-Glu i IAA-Asp) za koje se smatra da su prekursori za razgradnju IAA (LeClere i sur.; 2002). Ovo je dokazano u eksperimentima inhibicije rasta korijena s dodatkom konjugata IAA u medij biljaka *A. thaliana* (reverzibilni oblici konjugata se u biljkama hidroliziraju što dovodi do nakupljanja IAA i inhibicije rasta korijena, dok se ireverzibilni konjugati ne hidroliziraju te ne dolazi do inhibicije rasta korijena). LeClere i sur. (2002) pokazali su da dodatkom konjugata IAA-Glu i IAA-Asp ne dolazi do inhibicije rasta korijena, dok konjugati IAA-Leu, IAA-Ala i IAA-Phe inhibiraju rast korijena. Međutim, Hayashi i sur. (2021) pokazali su da IAA-Glu i IAA-Asp jesu razgradni oblici konjugata, ali ne i ireverzibilni. To je dokazano eksperimentima u kojima su pratili metaboličke produkte deuterijem obilježenih konjugata IAA-Asp i IAA-Glu. Ustanovili su da u biljkama divljeg tipa *A. thaliana* dolazi do pojave deuterijem obilježene slobodne IAA, dok u biljkama mutantama *ilr1ill2iar3ill3* deuterijem obilježena slobodna IAA nije detektirana (Hayashi i sur., 2021). IAA-Trp sudjeluje u mehanizmu inhibicije fizioloških procesa potaknutih s IAA, čiji mehanizam i dalje nije poznat (Sanchez Carranza i sur., 2016). Sinteza konjugata IAA i aminokiselina je posredovana enzimima iz genske porodice

*GRETCHEN HAGEN 3 (GH3)*. Ovo je velika porodica gena s 19 članova kod *A. thaliana*, od kojih najmanje njih 7 sudjeluje u konjugaciji IAA s aminokiselinama (*GH3* geni grupe II) (Ludwig-Muller, 2011). Enzimi GH3 ne sudjeluju samo u konjugaciji IAA s aminokiselinama, već mogu konjugirati aminokiseline i s auksinom PAA, jasmonskom, salicilnom i benzoičnom kiselinom (Casanova-Sáez i Voß., 2019).

Otkriće prvog gena odgovornog za hidrolizu konjugata IAA i aminokiselina otkriveno je eksperimentima izolacije biljaka mutanata vrste *A. thaliana* kod kojih dodatkom auksinskih konjugata u medij ne dolazi do morfoloških promjena, dok dodatkom slobodne IAA dolazi do morfoloških promjena karakterističnih za IAA (Bartel i Fink, 1995). Prvi otkriveni gen bio je *ILR1* te su pomoću bioinformatičkih alata predviđeni i daljnjim eksperimentima dokazani drugi geni za auksinske amidohidrolaze. Danas je poznato sedam članova porodice gena *ILR1-like* u biljci *A. thaliana*: *ILR1*, *ILL1*, *ILL2*, *ILL3*, *IAR3 (ILL4)*, *ILL5* i *ILL6* (Sanchez Carranza *i sur.*, 2016). Od navedenih gena, jedino *ILR1*, *ILL1*, *ILL2* i *IAR3* imaju hidrolitičku aktivnost *in vitro*. Auksinska amidohidrolaza ILR1 najefikasnija je u hidrolizi IAA-Leu i IAA-Phe, dok su IAR3 i ILL2 najefikasnije u hidrolizi IAA-Ala. ILL3 i ILL6 kodiraju hidrolaze koje ne hidroliziraju IAA-aminokiseline *in vitro*, dok je ILL5 pseudogen (Sanchez Carranza *i sur.*, 2016). Iako auksinske amidohidrolaze najveću katalitičku aktivnost imaju s određenim konjugatima, one također mogu hidrolizirati i ostale skladišne konjugate IAA i aminokiselina. To pokazuju istraživanja u kojima su biljke mutante *ilr1*, *ill2* i *iar3* uzgajane s dodatcima različitih konjugata IAA i aminokiselina (Rampey *i sur.*, 2004). U ovim eksperimentima praćena je duljina hipokotila i primarnog korijena biljaka *A. thaliana* te je zaključeno da je jedino ILR1 nužna za hidrolizu IAA-Leu, dok ostale auksinske amidohidrolaze mogu biti barem djelomično zamijenjene drugim auksin amidohidrolazama u prisustvu različitih konjugata IAA i aminokiselina (Rampey *i sur.*, 2004).

Pojedine auksinske amidohidrolaze eksprimiraju se u različitim tkivima te imaju specifične uloge u razvoju biljaka. Enzim ILR1 eksprimiran je u ranim stadijima razvoja biljaka u centralnim dijelovima kotiledona i hipokotila, u radikuli (klicin korijen) zrelog embrija i u klijancima starim jedan dan. Smatra se da je ILR1 glavna auksinska amidohidrolaza za hidrolizu konjugata IAA pri klijanju. Ekspresija ILR1 je niska nakon klijanja biljke u svim tkivima. ILL2, zajedno s ILR1, sudjeluje u klijanju biljaka, a lokalizira se najviše u distalnim dijelovima kotiledona. Također, ILL2 se nakuplja u hidatodama zrelih listova, te se smatra da ima ulogu u kasnijim fazama razvoja biljaka i fiziološkim odgovorima. S druge strane, IAR3 se ne eksprimira u ranim fazama razvoja, već tek kasnije u vaskularnim tkivima korijena i stabljike. Smatra se da IAR3 ima važnu ulogu u razvoju i organizaciji vaskularnih tkiva biljaka (Rampey *i sur.*, 2004).

Konjugati IAA i šećera te metilirane IAA (MeIAA) imaju važan utjecaj na embrionalni i postembrionalni razvoj biljaka. Konjugati IAA i šećera nastaju u reakciji kataliziranoj specifičnim enzimom uridin-difosfat glikoziltransferazom pronađenim kod *A. thaliana* (UGT84B1) i kod kukuruza

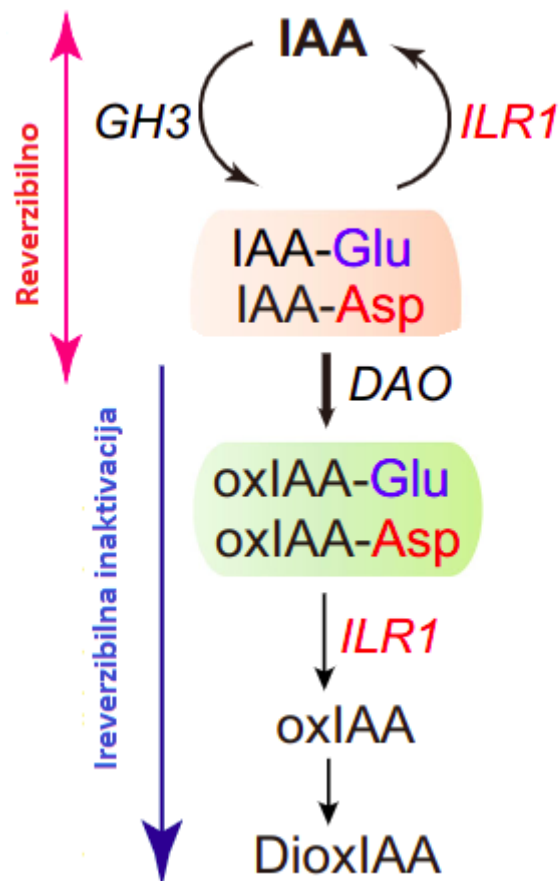
(IAGLU), dok molekularni mehanizam hidrolize esterskih konjugata i dalje nije razjašnjen (Ludwig-Mueller, 2011; Casanova-Sáez i Voß., 2019). Najčešći konjugat IAA s esterskom vezom je IAA-glukoza, koji je prisutan u velikim količinama u sjemenkama biljaka. Hidrolizom IAA-glc dolazi do stvaranja auksinskog maksimuma pri klijanju (Ludwig-Mueller, 2011). MeIAA je također važan skladišni oblik IAA. Metilacija IAA događa se u reakciji kataliziranoj enzimom IAA karboksil metiltransferaza (IAMT), dok se hidroliza događa pomoću različitih enzima metilesteraza (metilesteraza 17 (MET17) kod *A. thaliana*). Biljke mutante *iamt1* pokazuju brojne poremećaje u razvoju karakteristične za biljke s prekomjernom količinom IAA, dok biljke mutante *met17* ne pokazuju značajan fenotip zbog prisutnosti ostalih metilesteraza koje mogu katalizirati reakciju demetilacije IAA (MES1, 2,3,7,9,16,17 i 18) (Casanova-Sáez i Voß., 2019; Yang *i sur.*, 2008).

IBA je prirodni oblik auksina koji se metabolički može pretvoriti u IAA, procesom  $\beta$ -oksidacije u peroksisomima. Biljke mutante za enzime odgovorne za  $\beta$ -oksidaciju IBA, imaju značajne razvojne poremećaje, slične onima u biljkama s smanjenom količinom IAA (Damodaran i Strader, 2019). To pokazuje da je biološka aktivnost IBA najvjerojatnije usko vezana uz pretvorbu u IAA te da sama IBA nije biološki aktivna. Također, navedene biljke mutante imaju i niže koncentracije IAA, što govori da je IBA važan skladišni oblik IAA (Damodaran i Strader, 2019).

### 1.1.3. Inaktivacija i razgradnja IAA

Razgradnja IAA je uz biosintezu, prijenos i skladištenje auksina, važna karika u stvaranju optimalne koncentracija IAA za potrebe rasta i razvoja biljaka. Hayashi *i sur.* (2021) su svojim eksperimentima razlučili jedinstveni metabolički put razgradnje IAA. Također, suprotno prethodnim znanjima, pokazali su da razgradne forme IAA konjugata, IAA-Asp i IAA-Glu, nisu ireverzibilne, već se mogu hidrolizirati. Razgradnja IAA događa se pod kontrolom enzima GH3, ILR1 i DAO. Kao što je već opisano GH3 katalizira konjugaciju IAA s aminokiselinama, u slučaju razgradnje s aspartatom (Asp) i glutamatom (Glu). Enzimi DAO oksidiraju IAA-Asp i IAA-Glu do konjugata oksindol-3-octene kiseline s aminokiselinom Asp ili Glu (oxIAA-Asp i oxIAA-Glu). Auksinska amidohidrolaza ILR1 uklanja aminokiselinu s oksidiranog konjugata IAA te nastaje oxIAA koja se dodatno može oksidirati do 3'-hidroksi-oxIAA (DioxIAA) (Slika 3.). Suprotno prethodnim mišljenjima da se IAA ireverzibilno stavlja na put razgradnje konjugacijom s aminokiselinama Asp i Glu, reakcija koju kataliziraju enzimi DAO je ireverzibilna te je to ključni događaj koja usmjerava IAA u razgradnju (Hayashi *i sur.*, 2021).





Slika 3. Shematski prikaz nastanka IAA konjugata enzimima GRETCHEN HAGEN 3 (GH3) i hidrolize konjugata IAA (IAA-Glu i IAA-Asp) enzimom ILR1, te put ireverzibilne inaktivacije IAA enzimima DAO i ILR1. Kod ireverzibilne inaktivacije IAA nastaju razgradni produkti oksindol-3-octena kiselina (oxIAA) i 3'-hidroksi-oxIAA (DioxIAA) (preuzeto i prilagođeno od Hayashi *i sur.*, 2021).

## 1.2. AUKSINSKA SIGNALIZACIJA

IAA u stanici uzrokuje ekspresiju raznolikih gena uključenih u razvojne i fiziološke procese. IAA u stanici ulazi u jezgru iz endoplazmatskog retikuluma, u prijenosu facilitiranom transportnim proteinima PIN8 (Včelařová *i sur.*, 2021). Geni čija je ekspresija pod utjecajem IAA sadrže sekvencu *auxin response element* (AuxRE) u promotoru na koju se vežu transkripcijski faktori iz porodice *auxin response factors* (ARF). Transkripcijski faktori ARF vežu se na AuxRE kao homodimeri te regrutiraju proteine odgovorne za remodeliranje kromatina, što za posljedicu ima povećanje ili smanjenje razine transkripcije. U odsutstvu IAA, na ARF su vezana dva represorska proteina iz porodice AUX/IAA koji onemogućuju dimerizaciju ARF proteina te njihovo djelovanje. Receptor IAA je protein TIR1, koji se nalazi u SCF<sup>TIR1</sup> kompleksu E3 ubikvitin ligaze. IAA u stanici se veže za kompleks SCF<sup>TIR1</sup> koji regrutira represorske proteine iz porodice AUX/IAA te potiče njihovu ubikvitinizaciju i razgradnju u proteasomu

26S. Na ovaj način se u stanici smanjuje koncentracija represora te se transkripcijski faktori ARF, oslobađaju, dimeriziraju i aktiviraju (Taiz *i sur.*, 2015).

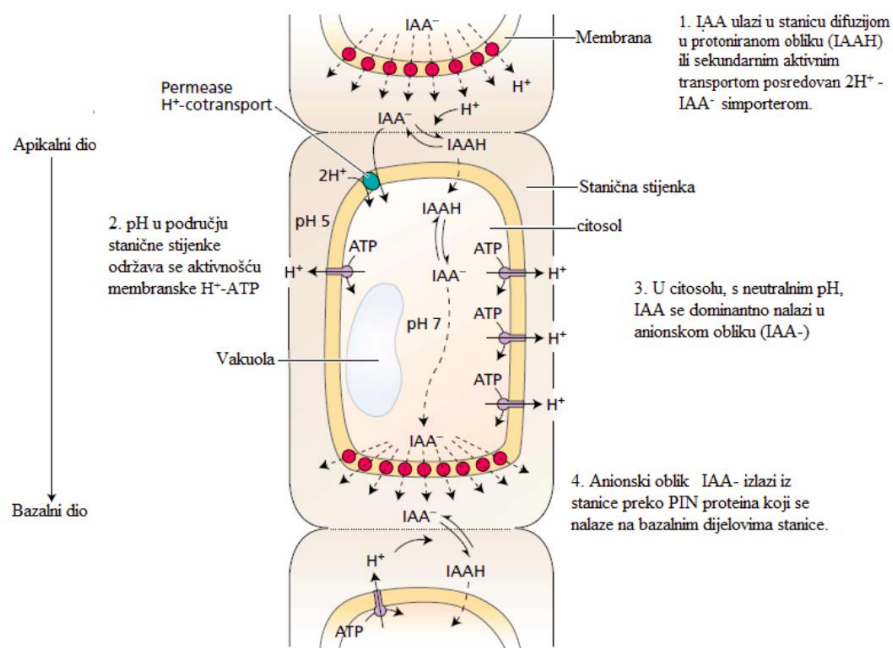
### 1.3. PRIJENOS AUKSINA

Sinteza IAA događa se u gotovo svim biljnim tkivima, a najviše u lisnim primordijima i mladim listovima. Međutim, za pravilni razvoj biljke transport IAA je ključan. Dokazano je da je transport auksina nužan za razvoj bočnog korijenja, razvoj floema i ksilema, filotaksiju, tropizme i uspostavu osi embrija (Woodward i Bartel, 2005). U izdanku, IAA se transportira bazipetalno, od vršnih dijelova biljke prema korijenu. Transport IAA u korijenu događa i bazipetalno (prema izdanku) i akropetalno (prema vršku korijena), na način da se akropetalni prijenos auksina događa u centralnom cilindru, a bazipetalni u epidermi (Woodward i Bartel, 2005). Transport IAA je strogo reguliran proces te se može podijeliti na polarni i nepolarni transport. Napolarni transport događa se floemom i služi za transport IAA od mjesta sinteze (lisni primordiji i mladi listovi) IAA do udaljenih biljnih tkiva (korijen). Ovo je brz (5-20 cm/h) i pasivan oblik transporta IAA te se događa prema koncentracijskom gradijentu IAA (Michniewicz *i sur.*, 2007). Proteini transporteri iz porodice gena *AUX1* (*AUX1* i *LAX2*) su odgovorni za ulazak IAA u floem na mjestima sinteze i za izlazak IAA iz floema u tkivima gdje je IAA potreban za razvojne procese (Marchant *i sur.*, 2002).

Nakon izlaska iz floema, IAA se između stanica prenosi polarnim oblikom transporta. Polarni transport je mnogo sporiji od nepolarnog (5-20 mm/h) te se radi o aktivnom obliku prijenosa. IAA je slaba kiselina ( $pK_a=4.75$ ) te se u području stanične stijenke ( $pH=5.5$ ), 15-20% IAA nalazi u protoniranom, lipofilnom obliku IAAH (Taiz *i sur.*, 2015). IAAH osmozom prolazi kroz membranu i ulazi u citosol čija je pH vrijednost neutralna zbog čega dolazi do disocijacije IAAH u ionski oblik ( $IAA^-$ ). Uz pasivni ulazak IAA u stanicu, IAA ulazi i putem simportera iz genske porodice *AUX1* (*AUX1* i *LAX2*). Energija za ovaj proces dobiva se ulaskom dva protona u citoplazmu uz IAA. Na ovaj način, ulazak IAA u stanicu se ubrzava. Pošto se IAA u stanici nalazi u ionskom, lipofobnom obliku, pasivni izlazak iz stanice nije moguć, već se događa transporterima iz porodice PIN (Slika 4.). Energija za izlazak IAA iz stanice dobiva se negativnim nabojem citosola. Pozicija transportera PIN nije nasumična, već je strogo regulirana i određeni oblici transportera PIN se lokaliziraju na točno određenoj strani stanice, tj. polarno su pozicionirani na staničnoj membrani. Polarnost lokalizacije PIN transportera omogućava usmjereni prijenos auksina kroz stanicu (Taiz *i sur.*, 2015). Različita tkiva ekspimiraju različite PIN transportere koji su lokalizirani različito jedni od drugih. Na primjer, PIN1 lokaliziran je akropetalno u centralnom cilindru. PIN2 transporter lokalizirani su bazipetalno u stanicama epiderme, dok PIN3 i PIN7, ekspimirani u stanicama kolumele korijena, nisu polarno lokalizirani, ali se u odgovoru na gravitaciju lokaliziraju lateralno (Rosquete *i sur.*, 2012). Ovakva lokalizacija transportera PIN

omogućava usmjereni prijenos auksina u korijenu (akropetalno kroz centralni cilindar, bazipetalno kroz epidermu). Uz transportere PIN, izlazak IAA iz stanica odvija se i putem ATP-aza ABC transportera. ABC transporteri nisu polarno lokalizirani, no onemogućuju povratak IAA natrag u stanicu. Ovi transporteri su lokalizirani i na membrani zajedno s transporterima PIN te pospješuju polarni transport IAA (Taiz i sur., 2015).

Metabolizam auksina događa se u različitim staničnim kompartmentima. Biosinteza i konjugacija IAA događa se u citoplazmi dok se njihova hidroliza događa u endoplazmatskom retikulumu, gdje su auksinske amidohidrolaze i lokalizirane, dok se auksinska signalizacija događa u jezgri. Unutarstanični transport IAA, između citoplazme, endoplazmatskog retikuluma i jezgre, događa se posredstvom transportnih proteina *PIN likes* (PILS) i PIN5 (ulazak IAA u ER) i PIN8 (izlazak IAA iz ER u citoplazmu ili jezgru) lokaliziranih na membrani endoplazmatskog retikuluma (Včelařová i sur., 2021).



Slika 4. Shematski prikaz polarnog transporta IAA. Prikazani su putevi ulaska protoniranog oblika indol-3-octene kiseline (IAAH) u stanicu, deprotonaciju u citoplazmi (IAA<sup>-</sup>) te izlazak IAA<sup>-</sup> iz stanice. Prikazana je usmjerenost prijenosa IAA kroz stanice te aktivacija protonskih pumpi na staničnoj membrani što dovodi do zakiseljavanja apoplasta (preuzeto i prilagođeno od Taiz i sur., 2015).

#### 1.4. PRODUŽNI RAST STANICA

Auksini utječu na mnogobrojne razvojne i fiziološke procese biljaka. Vjerojatno najbolje istražen i opisan mehanizam djelovanja IAA je mehanizam produžnog rasta biljnih stanica, proces poznat kao *teorija kiselinskog rasta*. IAA u citoplazmi biljnih stanica potiče aktivaciju membranskih

protonskih pumpi ( $H^+$ -ATP-aze), čija je uloga izbacivanje protona iz citoplazme van stanice u područje stanične stijenke (apoplast), zbog čega dolazi do snižavanja pH vrijednosti apoplasta (Slika 4.) (Taiz *i sur.*, 2015). Način na koji IAA aktivira protonskih pumpi je neposredan, povećanjem sinteze istih ili aktivacijom proteina ABP57 koji je nužan za aktivaciju protonskih pumpi (Kim *i sur.*, 2001). Sniženje pH apoplasta dovodi do slabljenja i pucanja vodikovih veza između celuloznih mikrofibrila stanične stijenke. Ovaj proces događa se posredstvom proteina stanične stijenke ekspanzina, koji se aktiviraju pri sniženom pH (Taiz *i sur.*, 2015). Povećani turgor (pritisak protoplasta na staničnu stijenku, uzrokovan povećanom količinom vode u stanici) razmiče celulozne mikrofibrile u staničnoj stijenci te stanica raste. Smjer u kojem stanica raste je uvjetovan paralelnom organizacijom mikrofibrila stanične stijenke te stanica može rasti samo u jednom smjeru. Sintezom i ugradnjom novih mikrofibrila i ostalih polisaharida u staničnu stijenku, stanična stijenka se obnavlja (Taiz *i sur.*, 2015).

### 1.5. UTJECAJ AUKSINA NA RAZVOJ KORIJENA

Razvoj korijena složen je proces u kojem IAA igra važnu ulogu. IAA, kao što je već spomenuto, uzrokuje različite odgovore stanica i tkiva ovisno o njegovoj koncentraciji. U procesu rasta i razvoja korijena stvara se auksinski gradijent, koji je ključan za prostornu organizaciju korijena. IAA se sintetizira u korijenu, no za rast i razvoj korijena nužan je transport većih količina IAA iz nadzemnih dijelova biljke, gdje je sinteza najveća (kotiledoni i mladi listovi). IAA se nepolarnim oblikom transporta prenosi iz nadzemnih dijelova biljke sve do vrška korijena, gdje izlazi iz floema te se polarnim načinom transporta prenosi do mirujućeg centra (*eng. Quiescent centre*). IAA se dalje, također polarnim načinom transporta, prenosi lateralno, prema epidermi, od kuda se polarnim transportom prenosi bazipetalno (prema hipokotilu). Polarnim transportom u vanjskim dijelovima korijena bazipetalno, dolazi do nastanka auksinskog gradijenta, gdje je najveća koncentracija IAA (auksinski maksimum) u vršku korijena koja se smanjuje prema hipokotilu (Clark *i sur.*, 2014). Auksinski maksimum ima izrazito važnu funkciju u organizaciji vršnog meristema korijena. Iznad određene koncentracije, IAA potiče razgradnju IAA/AUX represora te omogućuje transkripciju gena oslobađajući ARF transkripcijske faktore MONOPTEROS (MP) i NONPHOTOTROPIC HYPOCOTYL 4 (NPH4). MP i NPH4 potiču ekspresiju transkripcijskih faktora kodiranih genima *PLETHORA1* i *PLETHORA 2 (PLT)* koji pak potiču ekspresiju gena *SCARECROW (SCR)* i *SHORT-ROOT (SHR)*. Ekspresija *PLT*, *SCR* i *SHR* određuje identitet stanica mirujućeg centra te potiču ekspresiju transkripcijskog faktora *WOX5*, bitnog za održavanje matičnosti proksimalnih stanica. Stoga auksinski maksimum određuje poziciju mirujućeg centra u mladom korijenu (Taiz *i sur.*, 2015).

Poznato je da velike količine IAA utječu na produžni rast stabljike, dok inhibiraju produžni rast korijena. Male količine IAA ( $10^{-10}$  do  $10^{-9}$  M) potiču, dok veće koncentracije ( $10^{-6}$  M) inhibiraju produžni

rast korijena (Taiz *i sur.*, 2015). Ovaj proces i dalje nije u potpunosti razjašnjen te postoji nekoliko teorija kako dolazi do inhibicije produžnog rasta korijena. Jedna od njih je da IAA potiče sintezu hormona etilena, čija je poznata uloga u inhibiciji rasta korijena. Međutim i kada je sinteza etilena onemogućena, inhibicija rasta primarnog korijena i dalje postoji (Taiz *i sur.*, 2015). Još jedna teorija govori o izmijenjenom pH apoplasta korijena kod prevelikih koncentracija IAA. Barbez *i sur.* (2017) pokazali su, koristeći sol 8-hidroksipiren-1,3,6-trisulfonsku kiseline (HPTS) kao fluorescentni pH indikator u apoplastu korijena, da tretmanom biljaka s visokim koncentracijama IAA najprije dolazi do značajnog povećanja pH (alkalizacije) u apoplastu te se s vremenom pH spušta te dolazi do zakiseljavanja apoplasta. Zaključak je da ovo povećanje pH u apoplastu može inhibirati elongaciju stanica i posljedično produžni rast korijena (Barbez *i sur.*, 2017). Također, kao što je već opisano, velike koncentracije auksina pokreću kaskadu ekspresije gena koji održavaju matičnost i smanjenu mitotsku aktivnost stanica, kao što je slučaj s mirujućim centrom. Prevelika koncentracija auksina u korijenu, bilo egzogenim dodatkom ili poremećajem u metabolizmu korijena, moguće da može dovesti do poremećaja optimalnog gradijenta auksina te do zaustavljanja mitotske aktivnosti stanica u vršnom meristemu korijena (Taiz *i sur.*, 2015).

Suprotno od utjecaja na produžni rast primarnog korijena, auksin pozitivno djeluje na broj bočnog korijenja biljaka. Bočno korijenje razvija se iz stanica pericikla koje se nalaze odmah uz protoksilem koji igra važnu ulogu u inicijaciji nastanka bočnog korijena. Molekularni mehanizam nastanka bočnog korijena nije u potpunosti razjašnjen, međutim poznato je da je vjerojatno najvažniji signal za inicijaciju nastanka bočnog korijenja lokalni, prolazni auksinski maksimum u stanicama protoksilema. Naime, koncentracija auksina u protoksilemu nije konstantna, već oscilira u pravilnom vremenskom periodu te svakih 15 sati dolazi do nastanka auksinskog maksimuma. Nastanak bočnog korijena započinje asimetričnom, antiklinalnom diobom dviju stanica pericikla, pri čemu nastaju dvije manje i dvije veće stanice kćeri. Periklinalnom diobom stanica kćeri dolazi do nastanka primordija bočnog korijena, čije stanice daljnom diobom i diferencijacijom stvaraju sve strukture korijena koje postoje i u primarnom korijenu. Slijedeći ciklus nastanka bočnog korijena ne događa se sve do slijedeće pojave auksinskog maksimuma u stanicama protoksilema. U međuvremenu, primarni korijen se izduži, te slijedeći bočni korijen nastaje na određenoj udaljenosti od prethodnog. Auksin, osim u inicijaciji razvoja bočnog korijena, sudjeluje i u probijanju novog bočnog korijena kroz korteks i epidermu. Prilikom nastanka opisanog auksinskog maksimuma, u stanicama korteksa i epiderme, iznad primordija bočnog korijena, dolazi do pojačanog ulaska IAA u stanicu. Ovaj pojačani ulazak IAA u stanicu potiče ekspresiju gena za remodeliranje stanične stijenke koji uzrokuju odvajanje stanica navedenih tkiva te omogućuju novom bočnom korijenu izlazak iz primarnog korijena (Overvoorde *i sur.*, 2010).

## 1.6. ARHITEKTURA KORIJENA U STRESNIM UVJETIMA

Biljke su sesilni organizmi, sposobni prilagodbi promjenjivim okolišnim uvjetima. Prilagodba biljaka događa se u vidu biokemijskih, fizioloških i morfoloških promjena koje omogućuju bolju otpornost na okolišne stresove, kao što su visoke temperature zraka i tla, višak vode u tlu ili suša, zračenja, zagađenje tla i zraka različitim štetnim tvarima i tako dalje. Promjena klime praćena je čestim vremenskim ekstremima (izrazite vrućine, hladnoće, poplave, suše i slično) koje negativno utječu na biljke, uključujući i ekonomski važne kulture. Iz tog razloga je važno razumjeti fiziološke mehanizme kojima biljke raspoložu kako bi mogli, bilo genetičkim inženjerstvom ili križanjem, stvoriti otpornije ekonomski važne kulture. Poznato je da biljni hormoni igraju važnu ulogu u odgovoru biljaka na abiotičke stresove i da auksini sudjeluju u svim odgovorima prilagodbe. Međutim, detaljni mehanizmi kojima auksini utječu na prilagodbe u uglavnom su nepoznati. Ovo istraživanje fokusirano je na promjenu arhitekture korijena biljke *A. thaliana* ekotipa *Wassilewskija*, s mutiranim ili pojačano eksprimiranim genima za auksinske amidohidrolaze *ILR1*, *ILL2* i *IAR3*, u uvjetima solnog, osmotskog i temperaturnog stresa. Poznato je da u uvjetima solnog i osmotskog stresa rast primarnog korijena i broj bočnog korijena značajno smanjen (Koevoets *i sur.*, 2016; Cajero-Sanchez *i sur.*, 2019; Rowe *i sur.*, 2016; Salopek-Sondi *i sur.*, 2017). Promjena u arhitekturi korijena varira ovisno o koncentraciji soli ili osmolitika u tlu te promjena može biti mala ili velika. U uvjetima visokih temperatura rast primarnog korijena i broj bočnog korijenja je smanjen, međutim kod povišenih temperatura dolazi do pojave tercijarnog i kvartarnog korijena (Koevoets *i sur.*, 2016).

### 1.6.1. Fiziološki i biokemijski odgovor biljaka na solni i osmotski stres

Osmotski stres vjerojatno je najučestaliji tip stresa u biljkama koji uzrokuje značajne gubitke u poljoprivredi. Ovaj tip stresa može biti uzrokovan različitim faktorima, kao što su suša, povišen salinitet ili čak smrzavanje (Xiong i Zhu., 2002). Glavna karakteristika osmotskog stresa je gubitak vode iz stanica i tkiva biljaka. Odgovor biljke na osmotski stres uzrokuje promjenu ekspresije gena te se sintetiziraju proteini odgovorni za toleranciju na novonastale uvjete. Mehanizam tolerancije na osmotski stres uključuje povećanu sintezu različitih osmolitika, kao što su glicin betain (GB), prolin (Pro), manitol itd., ekspresiju gena za modulaciju oksidativnog stresa (superoksid dismutaza, glutation-S-transferaza, glutation reduktaza, glikozilaze itd.), ekspresiju kasnih embriogenetskih proteina (*eng. Late embryogenesis-abundant proteins*), čija je uloga u sprječavanju agregacije proteina u uvjetima stresa, te mnogih drugih transkripcijskih faktora. Osmotski stres, uz to što uzrokuje gubitak vode iz stanica, uzrokuje i promjenu metabolizma te nakupljanje reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) u stanici. Pojačana sinteza osmolitika, kao što su Pro i GB, potiče unos vode u stanicu, ili zadržavanje vode u stanici, ali imaju važnu ulogu u neutralizaciji ROS-ova. Topivi šećeri, kao što su manitol i trehaloza, sudjeluju u zaštiti stanica od oksidativnog stresa, ali ne i u zadržavanju vode u stanici (Upadhyaya *i sur.*, 2013).

Solni stres je tip osmotskog stresa jer uzrokuje gubitak vode u stanicama i tkivima te dolazi do aktivacije signalnih puteva koji potiču ekspresiju gena i adaptaciju biljke na uvjete osmotskog stresa. Uz gubitak vode, solni stres uzrokuje i nakupljanje natrija ( $\text{Na}^+$ ) u stanicama, što u velikim količinama može biti i toksično (Zhao *i sur.*, 2021). U uvjetima solnog stresa, dolazi do povećanja unutarstanične koncentracije kalcija ( $\text{Ca}^+$ ), važnog sekundarnog glasnika koji potiče signalnu kaskadu kinaza, ekspresiju gena i odgovor stanica na povećanu količinu  $\text{Na}^+$  u stanicama. Odgovor na  $\text{Na}^+$  događa se SOS signalnim putem u kojem se aktivacijom kaskade kinaza aktivira ekspresija gena za  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  pumpe, pomoću kojih se  $\text{Na}^+$  izbacuje iz stanice ili nakuplja u vakuoli (Upadhyaya *i sur.*, 2013).

Važni pokretači odgovora biljaka na solni i osmotski stres su biljni hormoni, naročito abscizinska kiselina (ABA) i IAA. Naime, dokazano je da se ABA nakuplja u velikim količinama u biljkama u uvjetima osmotskog stresa. ABA potiče ekspresiju gena koji sudjeluju u toleranciji biljaka na osmotski stres putem signalne kaskade SnRK2-AREB/ABF, kojom se aktiviraju mnogobrojni transkripcijski faktori (u najvećoj mjeri dvije porodice bZIP transkripcijskih faktora, ABI5 u sjemenkama i AREB/ABF u odraslim biljkama). Također, IAA ima važnu ulogu u odgovoru na osmotski stres. Ova dva hormona zajedno djeluju u kompleksnim interakcijama koje uzrokuju toleranciju biljaka na osmotski stres. Naime, IAA i ABA se značajno nakupljaju u korijenu u uvjetima osmotskog stresa te imaju ulogu u smanjenju gubitka vode (Upadhyaya *i sur.*, 2013). Iako još relativno slabo istraženo, poznato je da, u uvjetima osmotskog i solnog stresa, dolazi do značajne promjene u metabolizmu i prijenosu auksina. Transport auksina mijenja se promjenom ekspresije proteina iz porodice PIN, AUX1 i ABCB. Naime, PIN2 i AUX1 auksinski transporteri, lokalizirani u epidermi i korteksu korijena, internaliziraju se u citoplazmu (epiderma) ili se smanjuje njihova ekspresija (korteks). Time dolazi do smanjenja bazipetalnog polarnog transporta IAA što je jedan od razloga nakupljanja IAA u korijenu biljke u uvjetima solnog i osmotskog stresa. U kolumeli korijena pak dolazi do smanjenja ekspresije proteina PIN3 i PIN7 što također dovodi do poremećaja u polarnom transportu IAA u korijenu. Također, biosinteza i konjugacija IAA u kolumeli i meristemu korijena je smanjena, dok je u epidermi i korteksu povećana, smanjenjem, odnosno povećanjem ekspresije gena za sintezu i konjugaciju IAA (*YUC3*, 5, 8, 9 i *GH3*) (Korver *i sur.*, 2018). Također, poznato je da auksinska amidohidolaza IAR3 omogućava biljkama *A. thaliana* otpornost na solni stres te se ekspresija ovog proteina povećava u uvjetima osmotskog stresa (Kinoshita *i sur.*, 2012).

#### 1.6.2. Fiziološki i biokemijski odgovor biljaka na temperaturni stres

Temperaturni stres ima negativan utjecaj na mnogobrojne fiziološke i biokemijske procese u biljkama. Kao posljedica temperaturnog stresa u biljnim stanicama dolazi do akumulacije ROS-ova, denaturacije i pogrešnog smatanja proteina (što dovodi i do nastanka proteinskih agregata), narušava se stabilnost membrana, smanjuje se stopa fotosinteze, transpiracije te dolazi do poremećaja

osmotske regulacije (Li *i sur.*, 2021; Zhao *i sur.*, 2020). Odgovor biljaka na povišene temperature izrazito je kompleksan te nije u potpunosti razjašnjen. Kao i u svim stresovima, u stanicama dolazi do promjene u ekspresiji mnogih gena, koje rezultiraju sintezom proteina odgovornih za toleranciju biljaka na temperaturni stres (Zhao *i sur.*, 2020). Do danas, nisu poznati svi molekularni igrači niti mehanizmi u odgovoru biljaka na temperaturni stres, no smatra se da najvažniju ulogu imaju proteini HSP (*eng. heat shock proteins*) i HSF (*eng. heat shock transcription factors*). HSP su velika porodica proteina šaperona čija je uloga osiguravanje pravilnog smatanja proteina u normalnim uvjetima te resolubilizacija proteinskih agregata. U uvjetima temperaturnog stresa važnu ulogu igraju proteini iz skupina Hsp20, 70 i 90 koji su snažno ekspimirani u uvjetima temperaturnog stresa, uz ostale skupine proteina HSP (Bourgine i Guihur, 2021). HSF proteini su transkripcijski faktori odgovorni za ekspresiju proteina HSP i ostalih proteina odgovornih za odgovor biljaka na temperaturni stres (Kotak *i sur.* 2007). Slično kao i kod solnog i osmotskog stresa, kod temperaturnog stresa dolazi do oksidativnog stresa i sinteze tvari odgovornih za neutralizaciju ROS-ova (Kotak *i sur.*, 2007). U odgovoru na temperaturni stres i na indukciju termomorfogeneze (morfološke promjene biljke uslijed temperaturnog stresa) sudjeluju različiti biljni hormoni, uključujući i auksine. Poznato je da u uvjetima povećanih temperatura dolazi do pojačanja auksinske signalizacije smanjenjem ekspresije termoosjetljivog proteina PIL6, koji pripada porodici proteina PIL uključenih u transport IAA i lokaliziranih na membrani endoplazmatskog retikuluma (Li *i sur.*, 2021). Koncentracija slobodnog auksina se povećava pri visokim temperaturama što je posljedica pojačane ekspresije gena za biosintezu IAA (npr. *YUC*). Također, u uvjetima visokih temperatura, dolazi do promijene u polarnom transportu auksina povećanjem ekspresije proteina PIN2 te pojačanja bazipetalnog polarnog transporta IAA u korijenu (Lu *i sur.*, 2021).



## 2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Poznata je uloga IAA u rastu i razvoju korijena i smatra se da IAA, uz ostale biljne hormone, ima važnu ulogu u odgovoru biljaka na stresne uvjete. Mehanizam kojim biljke raspolažu s IAA u uvjetima abiotičkog stresa slabo je poznat. Cilj ovog istraživanja je istražiti kako solni, osmotski i temperaturni stres utječu na arhitekturu korijena mutanata i nadekspresora uročnjaka *A. thaliana* s poremećenom ekspresijom gena za auksinske amidohidrolaze *ILL1*, *ILL2* i *IAR3*, utvrditi razinu nadekspresije gena *ILL1*, *ILL2* i *IAR3* u transgeničnim biljkama, te odrediti kako stresni uvjeti utječu na nakupljanje i lokalizaciju auksin amidohidrolaze *ILL2* u vršku korijena.

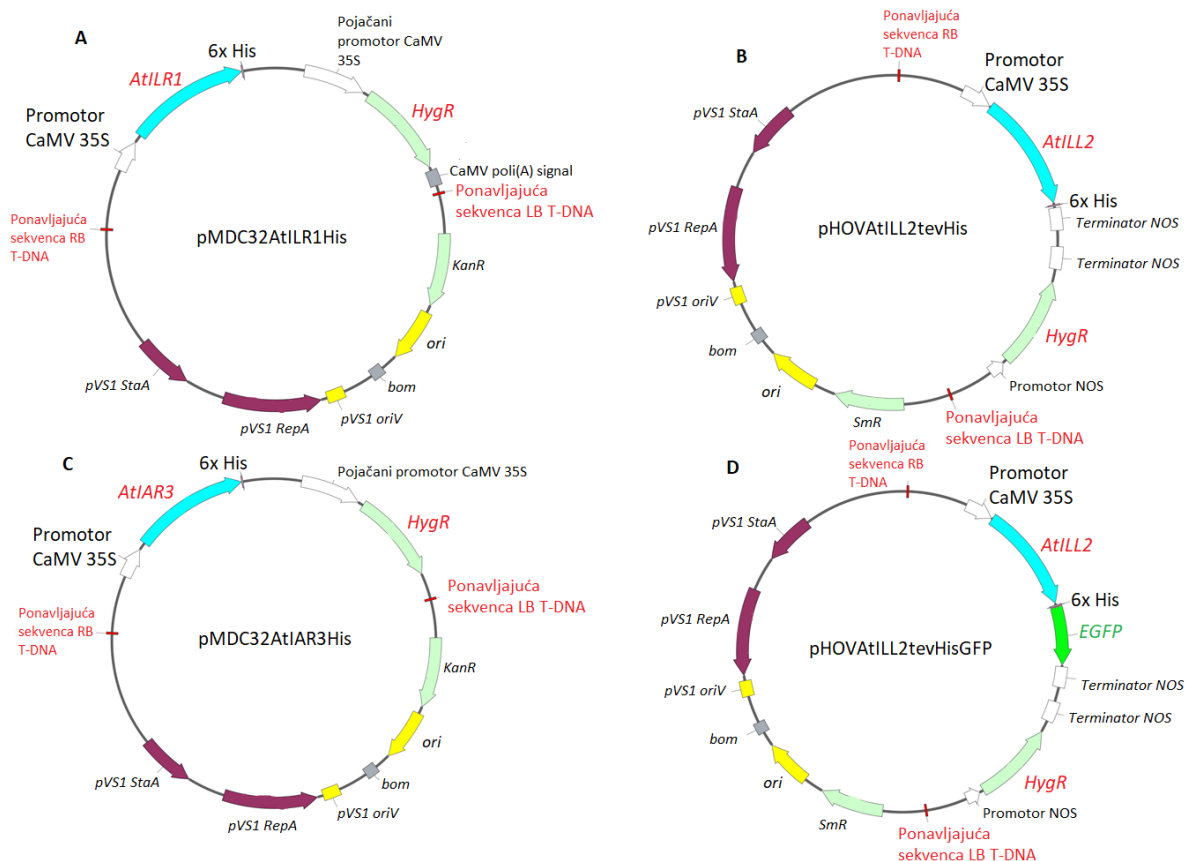
### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. MATERIJALI

##### 3.1.1. BILJNI MATERIJAL

###### 3.1.1.1. Biljke nadekspresori auksinskih amidohidrolaza

Na raspolaganju sam imao sjemenke divljeg tipa biljke *Arabidopsis thaliana*, ekotipa Wassilewskija te sedam biljaka nadekspresora iste vrste i ekotipa nazvanih prema genu za auksinsku amidohidrolazu koju prekomjerno ekspimiraju (*ILR1 13.3*, *ILR1 3.1*, *ILL2 25.6*, *ILL2 27.2*, *ILL2 8.2*, *IAR3 11.5* te *IAR3 13.4*). Biljke nadekspresori imaju u genom ugrađenu T-DNA s genima za auksinsku amidohidrolazu i za rezistenciju na higromicin b, koji su pod kontrolom konstitutivnog promotora. Sve navedene biljke nadekspresori imaju samo jednu inserciju i homozigotne su za transgen. Insercija je napravljena transformacijom biljaka *A. thaliana*, ekotipa *Wassilewskija*, bakterijom *Agrobacterium tumefaciens* metodom *floral dip*, s binarnim vektorima prikazanih na Slici 5. Transgeni *ILR1*, *ILL2* i *IAR3* u nadekspresorskim linijama na 3' kraju imaju sekvencu za histidinski privjesak (Slika 5., A, B, C), a transgen *ILL2* u liniji *ILL2 8.2* ima, uz histidinski privjesak, i sekvencu zelenog fluorescirajućeg proteina (*GFP*), također na 3' kraju sekvence (Slika 5., D).



Slika 5. Prikazi binarnih vektora, napravljenih u programu *SnapGene®Viewer*, korištenih za dobivanje biljaka nadekspresora vrste *Arabidopsis thaliana*, ekotipa Wassilewskija. Pomoću vektora pMDC32AtILR1His (A), dobivene su biljke nadekspresori *ILR1* 13.3 i *ILR1* 3.1, pomoću pHOVAtILL2tevHIS (B), dobiveni su *ILL2* 25.6 i *ILL2* 27.2, pomoću pMDC32AtIAR3His (C), *IAR3* 11.5 i *IAR3* 13.4, a pomoću pHOVAtILL2tevHisGFP (D) dobivena je biljka nadekspresor *ILL2* 8.2. T-DNA sekvenca u svakom prikazanom vektoru sadrži gen za rezistenciju na antibiotik higromicin b i gen za auksinsku amidohidrolazu, koja na 3' kraju sadrži histidinski privjesak (A, B, C) ili histidinski privjesak i GFP (D).

### 3.1.1.2. Biljke mutante auksinskih amidohidrolaza

Na raspolaganju sam imao sjemenke pet homozigotnih biljaka mutanata vrste *A. thaliana*, ekotipa *Wassilewskija*. Biljke mutante imenovane su prema mutiranim genima za auksinske amidohidrolaze (*ilr1-2*, *ill2-1*, *iar3-2*, dvostruka mutanta *ill2-1iar3-2* i trostruka mutanta *ilr1-2ill2-1iar3-2*). Biljke mutante *ilr1-2* i *iar3-2* imaju mutacije krivog smisla (eng. *Missense mutations*), napravljene primjenom etil metansulfonata (EMS). Biljke mutante *ilr1-2* imaju mutaciju u genu *ILR1* na poziciji 69 (Glu69Lys), a biljke mutante *iar3-2* u genu *IAR3* na poziciji 124 (Gly124Glu) (Bartel *i sur.*, 1995; Davies

*i sur.*, 1999). Biljke mutante *ill2-1* sadrže insercijsku mutaciju u genu *AtILL2* na 3' kraju drugog egzona. Ovom insercijom nastaje i delecija (42 pb) u sekvenci spoja drugog egzona i drugog introna što čini ovaj alel nefunkcionalnim (Rampey *i sur.*, 2004). Ugrađena insercija sadrži gen za rezistenciju na antibiotik kanamicin te je linija *ill2-1* rezistentna na kanamicin (Rampey *i sur.*, 2004). Biljke mutante *ill2-1iar3-2* i *ilr1-2ill2-1iar3-2* sadrže iste mutacije kao i jednostruki mutanti (Rampey *i sur.*, 2004). Navedene mutacije uzrokuju gubitak ili značajno smanjenu funkciju gena (Bertel *i sur.*, 1995; Davies *i sur.*, 1999; Rampey *i sur.*, 2004).

### 3.1.2. Hranjivi mediji za uzgoj biljaka

Hranjivi medij koji sam koristio za isključivanje biljaka nadekspresora (*ILR1 13.3*, *ILR1 3.1*, *ILL2 25.6*, *ILL2 27.2*, *ILL2 8.2*, *IAR3 11.5* te *IAR3 13.4*) i mutanata (*ilr1-2*, *ill2-1*, *iar3-2*, *ill2-1iar3-2* i *ilr1-2ill2-1iar3-2*) vrste *A. thaliana*, ekotipa *Wassilewskija*, kruti je medij Murashige i Skoog (MSO) (Murashige i Skoog, 1962). U svrhu postizanja uvjeta solnog stresa, u medij MS sam dodavao natrijev klorid (150 mM). Za postizanje uvjeta osmotskog stresa, u medij MS sam dodavao D-manitol (300 mM). Za provjeru homozigotnosti biljaka nadekspresora, u medij MS sam dodavao antibiotik higromicin b (30 mg/L). Sastav medija MSO i dodatci navedeni su u Tablici 1.

Tablica 1. Sastav medija MS (pH 5,7) za uzgoj biljaka divljeg tipa, nadekspresora i mutanata u kontrolnim uvjetima i dodatci mediju MS za uzgoj u uvjetima solnog, osmotskog i temperaturnog stresa.

Sastojci medija MSO	Koncentracija (g/L)
<b>MS medij u prahu s dodanim vitaminima (Duchefa)</b>	4.4
<b>Saharoza (Kemika, Zagreb)</b>	10
<b>2-(N-Morpholino) ethanesulfonska kiselina (MES) monohidrat (Duchefa)</b>	0.5
<b>Agar za biljne kulture (<i>plant agar</i>; Duchefa)</b>	10
Dodatci mediju MS	Koncentracija
<b>Natrijev klorid (Kemika, Zagreb)</b>	150 mM
<b>D-manitol (Kemika, Zagreb)</b>	300 mM
<b>Higromicin B (Sigma-Aldrich)</b>	30 mg/L

### 3.1.3. Početnice za PCR i qPCR

Početnice koje sam koristio u metodi *kvantitativna lančana reakcija polimerazom* (qPCR) služe za umnažanje referentnih gena (*OGIO* i *TIP41*) te nativnih gena i transgena (*ILR1*, *ILL2*, *IAR3*). Slijed nukleotida početnica i veličina fragmenata koje umnažaju navedene su u Tablici 2. Početnice koje sam koristio u metodi *lančana reakcija polimerazom* (PCR) umnažaju fragment gena *Aktin 3* (*ACT3*). Veličina produkta reakcije PCR s ovim početnicama nije isti ako je kalup cDNA ili genomska DNA. Slijed nukleotida ovih početnica i veličina fragmenata koje umnažaju navedene su u Tablici 3.

Tablica 2. Početnice za umnažanje gena *ILR1*, *ILL2*, *IAR3*, *OGIO* i *TIP41*.

Gen	Nazivi početnica	Nukleotidni slijed (5' -> 3')	Očekivana veličina fragmenta (pb)
<i>ILR1</i>	AtILR1_fw	TGCTATGCTTCTTGGTGCTGC	102
	AtILR1_rev	CCTGCATAACCTTCCTCGCCT	
<i>ILL2</i>	AtILL2_fw	TGGTTACGAAGAACTCGAGACCAG	183
	AtILL2_rev	TCCCACTCAACACCTTCCTGAAT	
<i>IAR3</i>	AtIAR3_fw	GCTTGCCTTGTGATAACCTGCTC	121
	AtIAR3_rev	GCGGTGGTGCTTTCAATGTGATTC	
<i>OGIO</i>	OGIO_fw	ATCCAAGAGCAGTTCAAGCAAG	130
	OGIO_rev	GAGAGCCATACCTTCCACTG	
<i>TIP41</i>	TIP41_fw	GCAGCACAATGGAAATTCAGG	122
	TIP41_rev	GCCTCAACCGTTTCTTTGTC	

Tablica 3. Početnice za umnažanje fragmenta gena *ACT3*.

Gen	Naziv početnice	Nukleotidni slijed (5' -> 3')	Očekivana veličina fragmenta (kaup genomska DNA) (pb)	Očekivana veličina fragmenta (kalup cDNA) (pb)
<i>ACT3</i>	ACT3_fw	CTGGCATCATACTTTC TACAATG	733	650
	ACT3_rev	CACCACTGAGCACAA TGTTAC		

## 3.2. METODE

### 3.2.1. Priprema hranjivih medija za uzgoj biljaka

Kruti hranjivi medij koji sam koristio za isključavanje biljaka je medij Murashige i Skoog (MSO). Medij MSO sam pripremao u staklenoj čaši dodavanjem komponenti navedenih u Tablici 1. u destiliranu vodu (dH<sub>2</sub>O), uz miješanje na magnetnoj miješalici. pH vrijednost sam podesio s 1 mM otopinom KOH na 5.7. Nakon pripreme, medije sam sterilizirao u autoklavu i izlio u sterilne petrijeve zdjelice. Nakon sterilizacije u autoklavu, svi postupci s medijima se rade u laminaru. Uz kruti medij MSO, pripremao sam i medije MS s dodatkom natrijeva klorida (NaCl; konačne koncentracije 150 mM), s dodatkom D-manitola (Man; konačne koncentracije 300 mM) i s dodatkom antibiotika higromicina b (konačne koncentracije 30 mg/L; higromicin b se dodaje nakon autoklaviranja i djelomičnog hlađenja medija). Za isključavanje sjemenki i ispitivanje homozigotnosti biljaka, medij sam izlio u okrugle petrijeve zdjelice, promjera 9 cm. Za uzgoj biljaka u stresnim uvjetima, medije sam izlijevao u kvadratne petrijeve zdjelice, 12 x 12 cm. Nakon izlijevanja medija, petrijevke sam ostavio otvorene uz plamenik u laminaru sve dok mediji nisu polimerizirali.

### 3.2.2. Sterilizacija sjemenki

Sterilizaciju sjemenki biljaka nadekspresora (*ILR1 13.3*, *ILR1 3.1*, *ILL2 25.6*, *ILL2 27.2*, *ILL2 8.2*, *IAR3 11.5* te *IAR3 13.4*) i mutanata (*ilr1-2*, *ill2-1*, *iar3-2*, *ill2-1iar3-2* i *ilr1-2ill2-1iar3-2*) vrste *A. thaliana*, ekotipa *Wassilewskija*, radio sam na dva načina. Prvi način sterilizacije sjemenki je sterilizacija otopinom izosana, a drugi etanolom. Za sterilizaciju otopinom izosana, najprije sam pripremio sterilizacijsku otopinu sastava 1% Izosan G (Pliva) i 0.1% mukazol (Sigma) u destiliranoj vodi (dH<sub>2</sub>O). Na sjemenke sam prvo dodao 1 mL 70% etanola te ih inkubirao jednu minutu uz miješanje rukom. Supernatant sam zatim uklonio te sam na sjemenke dodao 1 mL sterilizacijske otopine. Sjemenke sam ostavio deset minuta da se miješaju na rotoru u sterilizacijskoj otopini. Ostatak protokola sam radio u laminaru. Nakon inkubacije, uklonio sam sterilizacijsku otopinu i započeo s ispiranjem sjemenki dodatkom 1 mL sterilne dH<sub>2</sub>O. Sjemenke u dH<sub>2</sub>O sam miješao 1 minutu, nakon čega sam ih odložio na stalak i pričekao da se sjemenke stalože na dno epruvete pa sam uklonio dH<sub>2</sub>O. Postupak ispiranja u destiliranoj vodi sam ponovio tri puta. Nakon završenog postupka, sjemenke sam ostavio u destiliranoj vodi.

Postupak sterilizacije sjemenki etanolom započeo sam s pripremom 10 mL 70% etanola u koji sam dodao kap deterdženta *Tween*<sup>®</sup>20 (Sigma). Na sjemenke sam dodao 1 mL navedene otopine te sam ih inkubirao 20 minuta uz miješanje na rotoru. Nakon inkubacije sam uklonio supernatant te sam na sjemenke dodao 96% etanol i promiješao. Nakon što su se sjemenke staložile na dno epruvete, uklonio sam supernatant. Ovaj postupak sam ponovio tri puta te sam, nakon posljednjeg ispiranja,

uklonio sav etanol iz epruveta. Epruvete sa sjemenkama sam ostavio otvorene uz plamenik dok sav etanol nije ispario, a sjemenke se osušile.

### 3.2.3. Uzgoj biljaka nadekspresora i mutanata za auksinske amidohidrolaze

Na mediju MS0 i medijima MS s dodatkom NaCl, manitola ili higromicina b uzgajao sam biljke divljeg tipa, nadekspresora (*ILR1 13.3*, *ILR1 3.1*, *ILL2 25.6*, *ILL2 27.2*, *IAR3 11.5* te *IAR3 13.4*) i mutanata (*ilr1-2*, *ill2-1*, *iar3-2*, *ill2-1iar3-2* i *ilr1-2ill2-1iar3-2*) vrste *A. thaliana*, ekotipa Wassilewskija, za istraživanje rasta korijena i određivanja tkivne lokalizacije proteinskog konstrukta ILL2-GFP (u biljaka nadekspresora *ILL2 8.2*) u uvjetima solnog, osmotskog i temperaturnog stresa. Također, biljke nadekspresore uzgajane na navedenim medijima koristio sam za određivanje nadekspresije gena za auksinske amidohidrolaze (*ILR1*, *ILL2* i *IAR3*) metodom qPCR te za određivanje klijavosti i homozigotnosti biljaka. Biljke uzgajane u zemlji koristio sam za prikupljanje sjemenki.

#### 3.2.3.1. Uzgoj biljaka na krutom mediju MS0 i mediju MS s dodatkom higromicina b

Sterilizirane sjemenke biljaka divljeg tipa, nadekspresora (*ILR1 13.3*, *ILR1 3.1*, *ILL2 25.6*, *ILL2 27.2*, *ILL2 8.2*, *IAR3 11.5* te *IAR3 13.4*) i mutanata (*ilr1-2*, *ill2-1*, *iar3-2*, *ill2-1iar3-2* i *ilr1-2ill2-1iar3-2*) vrste *A. thaliana*, ekotipa Wassilewskija, posijao sam u petrijeve zdjelice s krutim medijem MS0 i medijem MS s dodatkom antibiotika higromicina b (30 mg/L). Sjemenke sterilizirane otopinom izosana se nalaze u dH<sub>2</sub>O te sam ih posijao na medij pomoću pipete s odrezanim vrškom nastavka. Petrijeve zdjelice s tako posijanim sjemenkama sam ostavio otvorene u laminaru uz plamenik kako bi se posušio višak dH<sub>2</sub>O. Sjemenke sterilizirane etanolom sam jednostavno stresao na kruti medij. Ploče sa sjemenkama sam zatim zamotao parafilmom te sam ih stavio na stratifikaciju (+4 °C). Nakon dva dana stratifikacije, ploče sam prebacio u inkubator s uvjetima kratkog dana (8 h dan, 16 h noć) na temperaturi od 21 °C.

#### 3.2.3.2. Uzgoj biljaka u zemlji i prikupljanje sjemenki

Biljke nadekspresore (*ILR1 13.3*, *ILR1 3.1*, *ILL2 25.6*, *ILL2 27.2*, *ILL2 8.2*, *IAR3 11.5* te *IAR3 13.4*) i mutanate (*ilr1-2*, *ill2-1*, *iar3-2*, *ill2-1iar3-2* i *ilr1-2ill2-1iar3-2*) vrste *A. thaliana*, ekotipa Wassilewskija, uzgajane 12 dana na mediju MS0 sam presadio u zemlju obrađenu na 60 °C, 30 min (*Steckmedium*, *Klassman-Deilmann GmbH*). U zemlju sam posadio po 4 biljke nadekspresora, mutanata i divljeg tipa (svaki klijanac u svoju posudu). Biljke sam najprije uzgajao u inkubatoru u uvjetima kratkog dana (8 h dan, 16 h noć, 21 °C) te sam ih nakon 10 dana prebacio u uvjete dugog dana (16 h dan, 8 h noć; 24 °C) kako bih inducirao cvjetanje. Biljke sam redovno zalijevao vodovodnom vodom. Tijekom uzgoja biljaka u uvjetima dugog dana biljke procvjetaju i s vremenom razviju komuške sa sjemenkama. Nakon razvoja komuški biljke više nisam zalijevao te sam ih pustio da se osuše kako bih prikupio sjemenke. Sjemenke sam prikupio na način da sam osušene cvjetne stapke s komuškama nježno stisnuo rukom, pri čemu se komuške otvaraju i oslobađaju sjemenke. Sjemenke sam prosijao i očistio od ostalog suhog biljnog

materijala te sam ih spremio u epruvete. Između prikupljanja sjemenki jedne linije i početka prikupljanja sjemenki druge linije, detaljno sam počistio radni prostor kako ne bih pomiješao sjemenke različitih linija.

### 3.2.3.3. Uzgoj biljaka u stresnim uvjetima

Biljke divljeg tipa, nadekspresora (*ILR1 13.3*, *ILR1 3.1*, *ILL2 25.6*, *ILL2 27.2*, *ILL2 8.2*, *IAR3 11.5* te *IAR3 13.4*) i mutanata (*ilr1-2*, *ill2-1*, *iar3-2*, *ill2-1iar3-2* i *ilr1-2ill2-1iar3-2*), vrste *A. thaliana*, ekotipa *Wassilewskija*, uzgajao sam u kvadratnim petrijevim zdjelicama s krutim medijem MS0 (kontrola), s krutim medijem MS s dodatkom NaCl (150 mM; solni stres) i s krutim medijem MS0 s dodatkom d-manitola (300 mM; osmotski stres). Biljke namijenjene ispitivanju utjecaja temperaturnog stresa na rast i razvoj korijena sam nasadio u kvadratnu petrijevu zdjelicu s krutim medijem MS0 te ih inkubirao u posebnom temperaturnom režimu (od 8.00h do 12.00h na 28 °C, od 12.00h do 16.30h na 38 °C, od 16.30h do 22.00h na 24 °C te od 22.00h do 8.00h ponovno 24 °C; od 6.00h do 22.00h dan, a od 22.00h do 6.00h noć). Za ovaj eksperiment koristio sam sjemenke sterilizirane u etanolu. Za isključivanje sjemenki, sjemenke sam najprije posijao u okrugle petrijeve zdjelice s krutim medijem MS0 na način da sam ih jednostavno stresao iz epruvete na ploču, pazeći da padnu na medij sa što više razmaka jedna od druge. Ploče sa sjemenkama sam zamotao parafilmom ili trakom leukopor te ih stavio dva dana u hladnjak na stratifikaciju (+4 °C). Nakon stratifikacije, ploče sa sjemenkama sam inkubirao 5 dana u uvjetima kratkog dana (8 h dan, 16 h noć; 21 °C) nakon čega sam biljke presadio u kvadratne petrijeve zdjelice s medijima namjenjenim stresnim uvjetima. Biljke sam oprezno izvadio iz okrugle petrijeve s krutim medijem MS0 pomoću pincete, spustio korijen na medij za izlaganje stresu, te povukao korijen po mediju prema gornjem rubu kvadratne ploče kako bi korijen bio ravan. Na ovaj način sam na svaku ploču posadio 4 biljke iste linije. Na donjem dijelu ploče sam tankim markerom označio početak i kraj korijena. Zatim sam ploče s medijima MS0 (kontrola), ploče s medijem MS i dodatkom 150 mM NaCl i ploče s medijem MS i dodatkom 300 mM manitola sam zatim okomito postavio u inkubator u uvjete kratkog dana (pazeći da vršak korijena bude prema dolje). Ploče s medijem MS0, namijenjene za istraživanje učinka temperaturnog stresa sam postavio okomito u posebnu klima komoru s navedenim temperaturnim režimom. Svaka linija nasadena je u 5 replika (ukupno 20 klijanaca po tretmanu) te sam biljke uzgajao u stresnim uvjetima 8 dana. Po završetku uzgoja, petrijeve zdjelice s klijancima su fotografirane ili skenirane, a slike korištene za određivanje rasta korijena.

Za istraživanje učinka stresa na substaničnu lokalizaciju i nakupljanja proteina ILL2-GFP u korijenu biljaka linije *ILL2 8.2*, sjemenke navedene linije sam prvo nasadio u okrugle petrijeve zdjelice (9 cm) s medijem MS0. Ploče sam zatim stavio na stratifikaciju 2 dana te ih nakon stratifikacije uzgajao 5 dana u uvjetima kratkog dana. Nakon uzgoja u uvjetima kratkog dana, klijance sam presadio u



petrijeve zdjelice s medijem MS0 i na podloge s dodatcima 150 mM NaCl i 300 mM manitola. Biljke su uzgajane vertikalno, 8 dana u uvjetima stresa. U svaku petrijevu zdjelicu s krutim medijem nasadio sam po 10 biljaka te sam napravio 3 nezavisne replike. Biljke su uzgajane vertikalno, 8 dana u uvjetima stresa. Za istraživanje učinka temperaturnog stresa, 8 dana stare klijance uzgajane na krutom mediju MS0, u uvjetima kratkog dana, sam 3 sata inkubirao na 37 °C.

#### 3.2.4. Mjerenje duljine primarnog korijena i određivanje broja bočnog korijenja

Mjerenje duljine primarnog korijena i određivanje broja bočnog korijenja biljaka nadekspresora (*ILR1 13.3*, *ILR1 3.1*, *ILL2 25.6*, *ILL2 27.2*, *IAR3 11.5* te *IAR3 13.4*) i mutanata (*ilr1-2*, *ill2-1*, *iar3-2*, *ill2-1iar3-2* i *ilr1-2ill2-1iar3-2*) vrste *A. thaliana*, ekotipa *Wassilewskija*, radio sam na temelju fotografija biljaka izloženih 8 dana kontrolnim uvjetima te solnom, osmotskom ili temperaturnom stresu. Svako biljčici sam prebrojao broj bočnog korijenja, a duljinu primarnog korijena mjerio sam pomoću programa *ImageJ*. Prije samog mjerenja, program sam kalibrirao opcijom *set scale*, pomoću poznate duljine kvadratne petrijeve zdjelice (12 cm) (Prilog 4.). U slučaju skeniranih slika, u istom izborniku sam označio i opciju *global*, što omogućuje da program ostaje kalibriran za svaku učitane fotografiju. Za fotografije snimljene mobilnim telefonom, za svaku fotografiju sam ponavljao postupak kalibriranja programa. Duljinu primarnog korijena sam mjerio s alatom *segmented line* pri čemu sam povlačio više ravnih linija po korijenu kako bih zabilježio potpunu duljinu te sam zabilježio rezultat (Prilog 5.). Svaki korijen sam mjerio dva puta. Jednom kako bih izmjerio početnu duljinu korijena, prije uzgoja u uvjetima stresa (prema oznaci nacrtanoj na petrijevoj zdjelici; vidi Prilog 5.), i drugi put kako bih izmjerio konačnu duljinu primarnog korijena. Izračun srednje vrijednosti duljine primarnog korijena i broja bočnih korijenja radio sam u programu "Microsoft Excel". Prirast primarnog korijena odredio sam prema formuli:

$$\text{prirast primarnog korijena} = \frac{(kd - pd)}{kd} \times 100,$$

gdje *kd* predstavlja konačnu duljinu primarnog korijena, a *pd* početnu duljinu primarnog korijena. Za dobivene vrijednosti broja bočnog korijenja i prirasta primarnog korijena odredio sam srednju vrijednost za sve klijance svake linije na pojedinom tretmanu. Klijance kod kojih je došlo do potpune inhibicije rasta korijena nisam uključio u izračun prirasta primarnog korijena, zato što nisam u svim slučajevima mogao odrediti jesu li ti klijanci uginuli zbog stresnog okoliša ili je zaista došlo do potpune inhibicije rasta korijena. Također, prirast primarnog korijena kod klijanaca s potpunom inhibicijom rasta korijena, izračunat prema formuli gore, je nula te znatno mijenjaju srednju vrijednost prirasta primarnog korijena i povećavaju standardnu devijaciju.

### 3.2.5. Izolacija ukupne RNA

Izolaciju RNA sam radio iz 12 dana starih biljaka divljeg tipa i nadekspresora (*ILR1 13.3*, *ILR1 3.1*, *ILL2 25.6*, *ILL2 27.2*, *ILL2 8.2*, *IAR3 11.5* te *IAR3 13.4*) vrste *A. thaliana*, ekotipa *Wassilewskija*, uzgajanih na krutom mediju MS0. Izolaciju RNA sam radio pomoću komercijalnog paketa *MagMAX™ Plant RNA Isolation Kit*. Postupak sam započeo homogenizacijom biljnog tkiva. Po tri biljke svake linije prebacio sam s krutog medija u epruvete u koje sam prethodno dodao staklene kuglice. Epruvete s biljnim tkivom sam zatim zamrznuo u tekućem dušiku i postavio ih na silamat (GC 19163 SilverMix 90 Mixer Machine, GC EUROPE N.V., C.M.F. SRL). Uređaj sam podesio na frekvenciju od 30 Hz te sam svaki uzorak obrađivao osam sekundi. Postupak sam ponovio dva puta za svaki uzorak. Između dvije obrade, epruvete s uzorcima sam čuvao u tekućem dušiku. Nakon homogenizacije, prema uputama iz komercijalnog paketa, pripremio sam otopinu za razbijanje (lizu) biljnih stanica (dodatak 2 M ditiotreitola (DTT) u pufer za lizu, konačne koncentracije 0.04 M DTT-a) i dodao po 600 µL u svaku epruvetu s homogeniziranim biljnim tkivom. Liza stanica odvijala se 5 minuta na 56 °C. Nakon toga, u svaku epruvetu sam dodao 25 µL RNA vezajućih kuglica (*RNA binding beads*). Zatim slijede dva ciklusa inkubacije uzoraka u otopini za ispiranje 1 (“wash solution 1”) na magnetnom stalku (2 minute), u kojima se ukupna RNA iz lizata ispire od nečistoća. Zatim sam pripremio otopinu s DN-azom, sastava prikazanog u Tablici 4.

Tablica 4. Sastava otopine s DN-azom. Sve komponente su dostupne u radnim koncentracijama u komercijalnom paketu *MagMAX™ Plant RNA Isolation Kit*, s tim da je otopina DN-aze I unaprijed pripremljena prema uputama proizvođača.

Komponenta	Volumen po uzorku (µL)
<b>2X pufer za DNazu I</b>	100
<b>Otopina DNaze I</b>	4
<b>Otopina MnCl<sub>2</sub></b>	20
<b>Voda bez nukleaza</b>	76

Na lizate biljnog tkiva sam dodao po 200 µL otopine s DN-azom nakon čega slijedi inkubacija u termomikseru (30 minuta na 37 °C, 350 rpm). Nakon inkubacije, slijedi korak ponovnog povezivanja RNA u uzorku na RNA vezujuće kuglice, dodavanjem 150 µL pufera za povezivanje (*Rebinding Buffer*) i 400 µL 96% etanola. Uzorci se zatim ponovno inkubiraju 2 minute na magnetnom stalku. Nakon ponovnog povezivanja ukupne RNA na RNA vezujuće kuglice, slijede još 3 serije ispiranja nečistoća s inkubacijama na magnetnom stalku, jednom s otopinom za ispiranje 1 i dva puta s otopinom za ispiranje 2 (*wash solution 2*). Na kraju slijedi elucija izolirane ukupne RNA s RNA vezujućih kuglica prema protokolu proizvođača. Detaljni postupak izolacije RNA opisan je u *MagMAX plant RNA*

*Isolation Kit* (2016). Postupak izolacije RNA, nakon homogenizacije i razbijanja biljnih stanica, radio sam prema protokolu proizvođača od poglavlja *Purify RNA manually*. Cijeli postupak radi se s opremom očišćenom od RNaza. Radni prostor se prije postupka opere s vodom i sapunom te prebriše s otopinom za neutralizaciju RNaza (*RNaseZap™*, Invitrogen). Pipete i magnetni stalci se također prebrišu s “RNaseZap”. Tijekom izolacije se redovito peru ruke i mijenjaju rukavice kako ne bi došlo do kontaminacije uzoraka RNazama.

Koncentraciju RNA nakon izolacije iz biljnog tkiva odredio sam pomoću uređaja *NanoDrop One* (Thermo scientific). Mjerio sam i omjer apsorbancija  $A_{260/280}$ , što predstavlja čistoću uzorka od ostatka fenola, proteina i ostalih kontaminanata koji absorbiraju zračenje od 280 nm. Također, uređaj određuje i omjer apsorbancija  $A_{260/230}$  koji predstavlja čistoću uzorka od ostataka ugljikohidrata, fenola i ostalih kontaminanata koji apsorbiraju na 230 nm. Za uzorke RNA, idealna vrijednost omjera  $A_{260/280}$  je 2.0, a za  $A_{260/230}$  idealna vrijednost je između 2.0 i 2.2 (Brian Matlock, 2022).

### 3.2.6. Reverzna transkripcija

Ukupnu RNA iz klijanaca divljeg tipa i nadekspresora (*ILR1 13.3*, *ILR1 3.1*, *ILL2 25.6*, *ILL2 27.2*, *ILL2 8.2*, *IAR3 11.5* te *IAR3 13.4*) vrste *A. thaliana*, ekotipa *Wassilewskija*, sam pretvorio u komplementarnu DNA (cDNA) metodom reverzne transkripcije (RT). Prije samog postupka RT, uzorke ukupne RNA sam razrijedio s dH<sub>2</sub>O s ciljem da u svakom uzorku imam jednaku masu RNA. Pripremio sam reakcijsku smjesu ukupnog volumena 12.5 µL, koja je sadržavala je 1 µg RNA, otopinu početnica *Oligo(dT) Primer* (Thermo scientific), konačne koncentracije 15 ng/µL, otopinu deoksiribonukleotida konačne koncentracije 0.02 mM i dH<sub>2</sub>O. Također, pripremio sam i otopinu s reverznom transkriptazom, koja je sadržavala reakcijski pufer (*1× Reaction Buffer*; Thermo Scientific, 4 µL), otopinu reverzne transkriptaze (200 U/µL *RevertAid H Minus Reverse Transcriptase*; Thermo Scientific; konačne koncentracije 26.67 U/µL), otopinu inhibitora RN-aza (40 U/µL *RiboLock RNase Inhibitor*; Thermo Scientific; konačne koncentracije 2.67 U/µL) i dH<sub>2</sub>O, ukupnog volumena 7.5 µL za svaki uzorak. Uzorci su inkubirani pet minuta na 65 °C pa ohlađeni na 4 °C. Tijekom hlađenja, u uzorke sam dodao 7.5 µL otopine s reverznom transkriptazom. Reakciju reverzne transkripcije proveo sam na 42 °C tijekom 45 minuta, nakon čega sam reverznu transkriptazu inaktivirao na 70 °C tijekom 15 minuta. Dobivenu otopinu cDNA (50 ng/µL) sam razrijedio s dH<sub>2</sub>O na 10 ng/µL i pospremio na 4 °C. Reakcija RT provedena je na uređaju *GeneAmp® PCR System 2700* (Applied Biosystems).

### 3.2.7. Metoda PCR

Za provjeru kvalitete i čistoće izolirane RNA iz biljaka nadekspresora (*ILR1 13.3*, *ILR1 3.1*, *ILL2 25.6*, *ILL2 27.2*, *ILL2 8.2*, *IAR3 11.5* te *IAR3 13.4*), napravio sam reakciju PCR. Reakciju sam radio s početnicama ACT3\_fw i ACT3\_rev, opisanim u Tablici 2. Najprije sam razrijedio otopinu početnica (početne koncentracije 100 pM) u omjeru 1:10. Reakcijska smjesa za PCR sadržavala je 2 µL cDNA (10

ng/ $\mu$ L), 10  $\mu$ L *EmeraldAmp Max PCR Master Mix* (2x premix), 0.5  $\mu$ L otopine svake početnice te 7  $\mu$ L dH<sub>2</sub>O. Negativna kontrola sadržavala je dH<sub>2</sub>O umjesto uzorka cDNA. PCR reakciju sam proveo na uređaju *GeneAmp® PCR System 2700* (Applied Biosystems) prema protokolu opisanom u Tablici 5.

Tablica 5. Temperaturni režim za umnažanje gena *ACT3* lančanom reakcijom polimeraze u uređaju *GeneAmp® PCR System 2700* (Applied Biosystems).

	Temperatura (°C)	Vrijeme (s)	
Početna denaturacija	98	180	
Denaturacija	98	10	40 ciklusa
Prijanjanje početnica	56	30	
Elongacija	72	60	
Završna elongacija	72	420	

Za provjeru uspješnosti reakcije PCR, pripremio sam agarozni gelove s 1.5% agaroze (Sigma) otopljene u 1x TBE puferu (90 mM Tris, 90 mM borne kiseline, 2 mM Na<sub>2</sub>EDTA; pH 8). Kao standard veličine, koristio sam komercijalni marker za detekciju nukleinskih kiselina do 1000 pb (*GeneRuler 1kb DNA ladder*, 0.5  $\mu$ g/ $\mu$ L; ThermoScientific). U jažice na gelu sam nanosio po 10  $\mu$ L produkta reakcije PCR i 3  $\mu$ L otopine markera. Elektroforeza je provedena na 20 V, 5 minuta (dok boja nije izašla iz jažica), i zatim sam povećao napon na 100 V (sve dok žuta boja nije došla do donjeg ruba gela). Gel sam zatim obojao u otopini etidijevog bromida (koncentracije 0.2 mg/ml) te sam gel slikao pod UV svjetlom na transiluminatoru.

### 3.2.8. Metoda qPCR

Za određivanje relativne ekspresije gena za auksinske amidohidrolaze u biljkama nadekspresora (*ILR1 13.3*, *ILR1 3.1*, *ILL2 25.6*, *ILL2 27.2*, *ILL2 8.2*, *IAR3 11.5* te *IAR3 13.4*) vrste *A. thaliana*, ekotipa *Wassilewskija*, koristio sam metodu qPCR. Reakciju qPCR sam radio pomoću uređaja *Magnetic Induction Cycler (Mic) PCR Machine* (*Bio Molecular Systems*) i programom za praćenje amplifikacije u realnom vremenu (*micPCR*). U qPCR reakcijama sam koristio početnice za umnažanje gena za auksinske amidohidrolaze navedenih u Tablici 2. Detekcija amplifikacije postignuta je interkalirajućom bojom *SYBR Green*, prisutnoj u otopini *GoTaq®qPCR Master Mix* (2X; promega). Reakcijsku otopinu pripremio sam u sastavu navedenom u Tablici 6.

Tablica 6. Sastav reakcijske otopine za reakciju qPCR.

Naziv reagensa	Volumen ( $\mu\text{L}$ )	Koncentracija
GoTaq®qPCR <i>Master Mix</i>	7.5	2X
“forward” početnica	0.2	0.2 $\mu\text{M}$
“reverse” početnica	0.2	0.2 $\mu\text{M}$
cDNA	2	10 ng/ $\mu\text{L}$
dH <sub>2</sub> O	5.1	
<b>Konačni volumen</b>	<b>15</b>	

Kako bih ujednačio proces pripreme reakcijskih otopina, napravio sam radnu otopinu početnica, koja je sadržavala dH<sub>2</sub>O i obje početnice u volumenima navedenim u Tablici 6. Također, napravio sam i radne otopine uzoraka cDNA, koje su sadržavale *GoTaq®qPCR Master Mix* i cDNA u volumenima navedenim u Tablici 6. Zatim sam obje radne otopine prebacio u epruvete za qPCR (5.5  $\mu\text{L}$  radne otopine početnica i 9.5  $\mu\text{L}$  radne otopine cDNA). Reakcija qPCR se odvijala prema režimu navedenom u Tablici 7.

Tablica 7. Postavke programa uređaja *Magnetic Induction Cycler (Mic) PCR Machine (Bio Molecular Systems)* za reakciju qPCR.

	Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )	Vrijeme (s)	
Početna denaturacija	95	300	
Denaturacija	95	5	} 40 ciklusa
Prijanjanje početnica i elongacija	60	10	
	Raspon temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )	Brzina zagrijavanja ( $^{\circ}\text{C}/\text{s}$ )	
Postavke za izradu krivulje taljenja	45-95	0.3	

Metodom qPCR sam za svaki uzorak odredio efikasnost početnica i vrijednost Ct (broj ciklusa umnažanja u kojem je zabilježen fluorescentni signal iznad pozadinske fluorescencije). Iz dobivenih podataka izračunao sam relativne ekspresije gena *ILR1*, *ILL2* i *IAR3* u linijama nadekspresora u odnosu na divlji tip. Primijenio sam metodu  $\Delta\Delta\text{Ct}$  (Livak i Schmittgen, 2001). Za rezultate tehničkih replika izračunao sam srednju vrijednost i pripadajuću standardnu pogrešku. Za usporedbu Ct vrijednosti dobivenih za gene auksinskih amidohidrolaza i referentnih gena, koristio sam vrijednost  $\Delta\text{Ct}$ . Ova vrijednost izračunata je prema formuli:

$$\Delta Ct = Ct(aa) - Ct(rg),$$

gdje je  $Ct(aa)$  prosječna vrijednost  $Ct$  dviju bioloških replika umnažanih s početnicama za auksinske amidohidrolaze, dok je  $Ct(rg)$  prosječna vrijednost  $Ct$  referentnih gena *OGIO* i gena *TIP41*.

### 3.2.9. Fluorescencijska mikroskopija i kvantifikacija proteina ILL2-GFP

Za kvantifikaciju proteina ILL2-GFP u korijenu biljaka nadekspresora *ILL2 8.2* uzgajanih u kontrolnim ili stresnim uvjetima, koristio sam metodu fluorescentnu mikroskopiju. Koristio sam fluorescencijski mikroskop BX51 (Olympus), objektiv *UplanFI 20x NA 0,25* (Olympus) i filter FITC (ekscitacijske valne duljine 467 – 498 nm i emisijske valne duljine 513 – 536 nm), a za izvor svjetlosti koristio sam izvor UV lampu U-RFL-T (Olympus). Na mikroskop je ugrađena kamera *Olympus DP70*, pomoću koje sam bilježio fluorescenciju u vršku korijena i zoni sazrijevanja korijena. Ekspoziciju sam podesio na 4.5 sekundi, a osjetljivost kamere na svjetlost, ISO, na 200. Kvantifikaciju proteina ILL2-GFP u korijenu određivao sam prema intenzitetu fluorescencije, koju sam mjerio s fotografija u programu *ImageJ* (*Mean gray value*) (Prilog 3.). Kako bih označio područje od interesa na fotografiji korijena, nacrtao sam kvadrat (opcija *Rectangle*) na vršku korijena ili u zoni sazrijevanja te sam zabilježio rezultat mjerenja. Postupak sam ponovio na još dva mjesta u vršku korijena ili u zoni sazrijevanja i tri puta na pozadini. Zatim sam izračunao srednje vrijednosti fluorescencije u području korijena od kojih sam oduzeo srednju vrijednost intenziteta fluorescencije pozadine kako bih dobio stvarni intenzitet fluorescencije u korijenu. Kvantifikaciju sam radio na 3 klijanca sa svakog tretmana. Srednje vrijednosti intenziteta fluorescencije u vršku korijena ili zoni sazrijevanja, dobivene iz pojedinih klijanaca, usporedio sam sa srednjom vrijednosti intenziteta fluorescencije u vršku korijena ili zoni sazrijevanja svih klijanaca uzgajanih u kontrolnim uvjetima. Iz dobivenih rezultata izračunao sam srednju vrijednost.

### 3.2.10. Statistička obrada podataka

Statističku obradu podataka radio sam u programu *Microsoft Excel*. Standardnu devijaciju uzorka računao sam pomoću ugrađene funkcije *STDEV.S*, a standardnu pogrešku (SE) formulom:

$SE = \frac{\sigma}{\sqrt{n}}$ , gdje  $\sigma$  predstavlja standardnu devijaciju, a  $n$  predstavlja broj uzoraka. Statističku značajnost određivao sam analizom jednosmjerna ANOVA s *post-hoc* dvokrakim Studentovim T-testovima s pretpostavljenom različitom varijancom između setova podataka. Statistički značajnom razlikom između setova podataka smatrao sam sve p-vrijednosti manje ili jednake od  $\alpha$  vrijednosti dobivene

*Bonferronijevom korekcijom  $\alpha$  vrijednosti  $\alpha(korigirana) = \frac{0.05}{m}$* , gdje  $m$  predstavlja broj izvršenih T-

testova na istim setovima podataka. Kako bih na ovaj način uspoređivao i setove podataka prirasta primarnog korijena (0%-100%), podatke prirasta sam korigirao formulom:

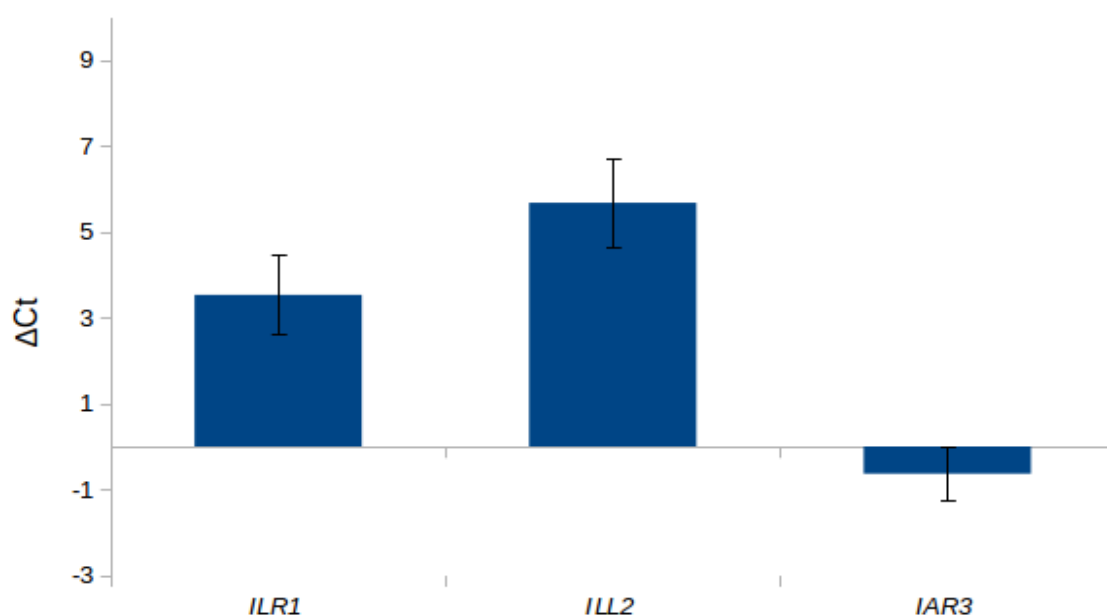
*prirast primarnog korijena (korigiran) =  $\ln\left(\frac{postotak}{100-postotak}\right)$ .*

## 4. REZULTATI

### 4.1. ODREĐIVANJE EKSPRESIJE GENA U TRANSGENIČNIM BILJKAMA S NADEKSPRESIJOM GENA *ILR1*, *ILL2* I *IAR3*

Kako bih utvrdio razinu ekspresije gena *ILR1*, *ILL2* i *IAR3* u biljkama nadekspresora (*ILR1* 13.3, *ILR1* 3.1, *ILL2* 25.6, *ILL2* 27.2, *ILL2* 8.2, *IAR3* 11.5 te *IAR3* 13.4), izolirao sam RNA iz klijanaca, odredio njenu koncentraciju i čistoću (Prilog 1.) te sam proveo reakciju qPCR. Za dodatnu provjeru kvalitete cDNA i odsutnosti genomske DNA u uzorcima, proveo sam umnažanje gena *ACT3* na kalupu cDNA i genomske DNA metodom PCR (Prilog 2).

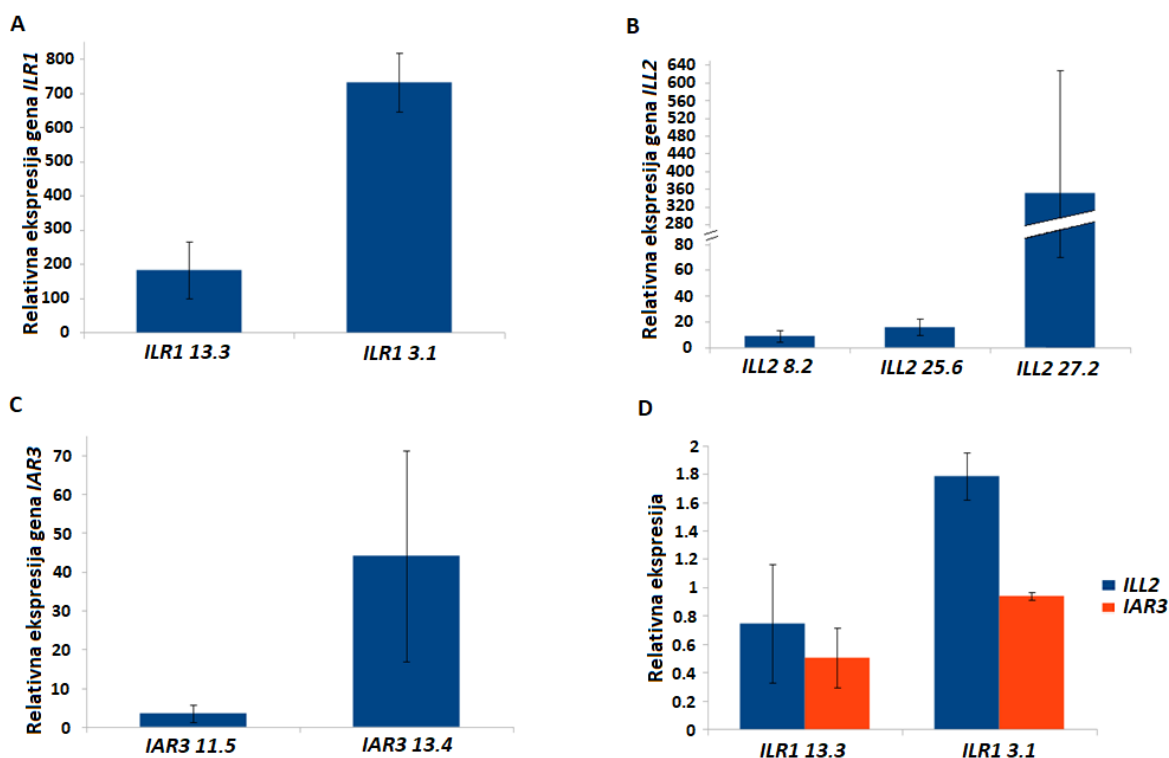
Metodom qPCR odredio sam razine ekspresije gena *ILR1*, *ILL2* i *IAR3* u biljkama nadekspresora i divljem tipu. Rezultati su prikazani (Slika 6.) kao srednja vrijednost nezavisnih replika (osim za biljke nadekspresore *ILR1* 3.1, za koju su rezultati prikazani kao srednja vrijednost tehničkih replika). Razine ekspresija gena *ILR1* i *ILL2* u biljkama divljeg tipa bila je manja od razine ekspresije referentnih gena, to jest, vrijednosti  $\Delta Ct$  bile su pozitivne ( $\Delta Ct=3.53$  i  $\Delta Ct=5.68$ ), dok je razina ekspresije gena *IAR3* bila veća te je vrijednost  $\Delta Ct$  bila negativna ( $\Delta Ct = -0.64$ ).



Slika 6. Relativna ekspresija ( $\Delta Ct$ ) gena *ILR1*, *ILL2* i *IAR3* u biljkama divljeg tipa *Arabidopsis thaliana*, ekotipa Wassilewskija.

U svim linijama nadekspresora izmjerena je veća relativna ekspresija gena za koji posjeduju transgen od ekspresije istog gena u biljkama divljeg tipa. U biljkama nadekspresora *ILR1* 13.3 i *ILR1* 3.1 relativna ekspresija gena *ILR1* bila je veća za 182.5, odnosno 731.17 puta u odnosu na divlji tip (Slika 7., A). U biljkama nadekspresora *ILL2* 8.2 relativna ekspresija gena *ILL2* bila je veća za 8.87 puta, a u

biljkama nadekspresora *ILL2* 25.6 i *ILL2* 27.2 za 15.7 i 350.93 puta u odnosu na relativnu ekspresiju istog gena u biljkama divljeg tipa (Slika 7., B). U biljkama nadekspresora *IAR3* 11.5 i *IAR3* 13.4, relativna ekspresija gena *IAR3* bila je 3.48 odnosno 44.12 puta veća od ekspresije istog gena u biljkama divljeg tipa (Slika 7., C). Relativna ekspresija gena *ILL2* u liniji *ILR1* 13.3 bila je 74.5%, a u liniji *ILR1* 3.1 178% u odnosu na biljke divljeg tipa (Slika 7., D). Relativna ekspresija gena *IAR3* u liniji *ILR1* 13.3 bila je 50%, a u liniji *ILR1* 3.1 94% u odnosu na relativnu ekspresiju istog gena u biljkama divljeg tipa (Slika 7., D).



Slika 7. Relativne ekspresije ( $\Delta\Delta C_t$ ) gena *ILR1* u biljkama nadekspresora *ILR1* 13.3 i *ILR1* 3.1 (A), gena *ILL2* u biljkama nadekspresora *ILL2* 8.2, *ILL2* 25.6, *ILL2* 27.2 (B), gena *IAR3* u biljkama nadekspresora *IAR3* 11.5 i *IAR3* 13.4 (C) i gena *ILL2* i *IAR3* u biljkama nadekspresora *ILR1* 13.3 i *ILR1* 3.1. Razina ekspresije mjerena je metodom qPCR na biljkama nadekspresora i divljem tipu u dvije biološke i dvije tehničke replike (linija nadekspresora *ILR1* 3.1 u jednoj biološkoj i dvije tehničke replike), a relativna ekspresija određena je metodom  $\Delta\Delta C_t$ . Rezultati su prikazani kao odnos razine ekspresije nadekspresorskih linija i divljeg tipa.

#### 4.2. PROVJERA HOMOZIGOTNOSTI LINIJA NADEKSPRESORA I UČINAK STERILIZACIJE NA KLIJAVOST SJEMENKI

Nakon uzgoja biljaka divljeg tipa, nadekspresora (*ILR1* 13.3, *ILR1* 3.1, *ILL2* 25.6, *ILL2* 27.2, *ILL2* 8.2, *IAR3* 11.5 te *IAR3* 13.4) i mutanata (*ilr1-2*, *ill2-1*, *iar3-2*, *ill2-1iar3-2* i *ilr1-2ill2-1iar3-2*) vrste A.



*thaliana*, ekotipa *Wassilewskija*, u zemlji i prikupljanja sjemenki, testirana je klijavost i homozigotnost. Sjemenke svake linije sam sterilizirao na dva načina i nasadio na istu ploču s medijem MS0 (za utvrđivanje efikasnosti sterilizacije dvijema metodama) te na podlogu MS uz dodatak higromicina b za određivanje homozigotnosti. Sve linije nadekspresora su, uzgajane na podlogama s dodatkom higromicina b, proklijale i rasle kao i na kontrolnim podlogama. Biljke divljeg tipa i mutante uzgajane na mediju MS s dodatkom higromicina b su proklijale, ali rast im je bio zaustavljen.

#### 4.3. ARHITEKTURA KORIJENA BILJAKA NADEKSPRESORA I MUTANATA U UVJETIMA BEZ STRESA

Kako bih istražio razlike u arhitekturi korijena između linija nadekspresora (*ILR1 13.3*, *ILR1 3.1*, *ILL2 25.6*, *ILL2 27.2*, *IAR3 11.5* i *IAR3 13.4*) i između mutanata (*ilr1-2*, *ill2-1*, *iar3-2*, *ill2-iar3-2* i *ilr1-2ill2-iar3-2*) s divljim tipom i međusobno, biljke sam 15 dana uzgajao na mediju MS0. Prirast primarnog korijena i broj bočnog korijenja kod biljaka nadekspresora nije se razlikovao od prirasta primarnog korijena niti broja bočnog korijenja biljaka divljeg tipa (Slika 8.). Primijećena je razlika između linija nadekspresora *ILR1 13.3* i *ILL2 27.2*, gdje je linija nadekspresora *ILL2 27.2* imala značajno veći broj bočnog korijenja (Slika 9.).

Prirast primarnog korijena kod svih linija mutanata, osim kod linije *ilr1-2*, nije se razlikovao od prirasta primarnog korijena divljeg tipa. Prirast primarnog korijena linije *ilr1-2* bio je značajno manji od prirasta primarnog korijena divljeg tipa. Također, biljna linija mutanta *ilr1-2* imala je značajno manji prirast primarnog korijena u odnosu na liniju *ilr1-2ill2-iar3-2*, ali razlika nije zabilježena usporedbom s ostalim linijama mutanata (Slika 8.). Broj bočnog korijenja kod biljaka mutanata također se nije značajno razlikovao od broja bočnog korijenja kod divljeg tipa, osim kod biljne linije mutante *ill2-iar3-2* koja je imala značajno manji broj bočnog korijenja u odnosu na divlji tip, ali i liniju *ilr1-2* (Slika 9.).

#### 4.4. UTJECAJ TEMPERATURNOG STRESA NA ARHITEKTURU KORIJENA BILJAKA NADEKSPRESORA I MUTANATA

Kako bih istražio utjecaj temperaturnog stresa na arhitekturu korijena biljaka divljeg tipa, nadekspresora (*ILR1 13.3*, *ILR1 3.1*, *ILL2 25.6*, *ILL2 27.2*, *IAR3 11.5* i *IAR3 13.4*) i mutanata (*ilr1-2*, *ill2-1*, *iar3-2*, *ill2-iar3-2* i *ilr1-2ill2-iar3-2*), biljke sam uzgajao 8 dana na mediju MS0 u posebnom temperaturnom režimu izložene do 38 °C (opisanom u poglavlju 3.2.3.3.). Biljke divljeg tipa uzgajane su u uvjetima temperaturnog stresa u dva zasebna eksperimenta (provedena identično u različitim vremenskim periodima, s razlikom u materijalu s kojim su petrijeve zdjelice bile zamotane) te su dobiveni različiti rezultati usporedbom s biljkama divljeg tipa uzgajanih na mediju MS0 u kontrolnim uvjetima. U jednom slučaju prirast primarnog korijena je značajno manji u uvjetima temperaturnog stresa u odnosu na kontrolu, dok u drugom slučaju nije zabilježena značajna razlika. Prirast primarnog

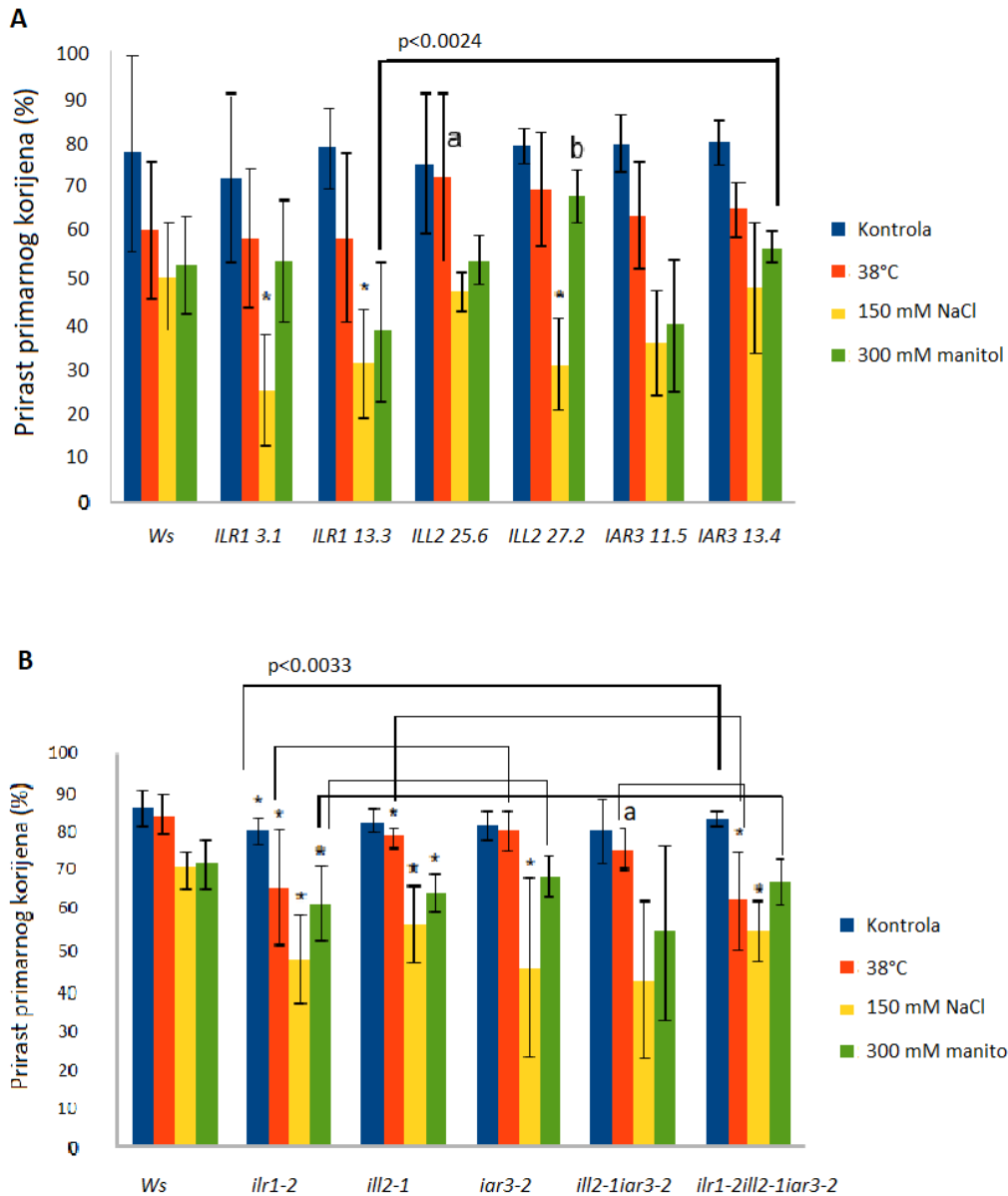
korijena u uvjetima temperaturnog stresa kod svih linija nadekspresora bio je značajno manji od prirasta primarnog korijena na kontrolnom mediju, osim kod biljne linije nadekspresora *ILL2 25.6*, gdje nije zabilježena značajna razlika (Slika 8.). Također, broj bočnog korijenja kod linija nadekspresora, uzgajanih u uvjetima temperaturnog stresa, bio je značajno manji od broja korijenja linija nadekspresora uzgajanih na mediju MS0. Usporedbom prirasta primarnog korijena biljaka nadekspresora i biljaka divljeg tipa, uzgajanih u uvjetima temperaturnog stresa, nije zabilježena značajna razlika (Slika 9.).

U slučaju biljaka mutanata, značajno manji prirast primarnog korijena u uvjetima temperaturnog stresa zabilježen je kod svih linija mutanata, osim kod linije *ill2-1iar3-2* kod koje nije zabilježena značajna razlika od biljaka uzgajanih na mediju MS0. Usporedbom biljaka mutanata i biljaka divljeg tipa, značajno manji prirast zabilježen je kod linija *ilr1-2*, *ill2-1*, *ill2-1iar3-2* i *ilr1-2ill2-1iar3-2*. Također, linija mutanta *ill2-1* imala je značajno veći prirast od linija mutanata *ilr1-2* i *ilr1-2ill2-1iar3-2*, a linija *ill2-1iar3-2* značajno veći prirast od linije *ilr1-2ill2-1iar3-2*, ali ne i od *ilr1-2* (Slika 8.). Linija mutanta *ill2-1* imala je značajno veći broj bočnog korijenja od divljeg tipa. Broj bočnog korijenja kod linije mutante *ill2-1iar3-2* bio je značajno veći od broja bočnog korijenja iste linije uzgajane na mediju MS0, a broj bočnog korijenja kod linija mutanata *ilr1-2ill2-1iar3-2* i *iar3-2* nije se značajno razlikovao od broja bočnog korijenja u biljkama istih linija uzgajanih u kontrolnim uvjetima. Kod ostalih linija mutanata zabilježen značajno manji broj bočnog korijenja u odnosu na biljke istih linija uzgajanih u kontrolnim uvjetima. Također, linija mutanta *ill2-1* imala je i značajno veći broj bočnog korijenja od linija mutanata *ilr1-2* i *ilr1-2ill2-1iar3-2* uzgajanih u istim uvjetima. Linija mutanta *ilr1-2ill2-1iar3-2*, imala je značajno manji broj bočnog korijenja od biljnih linija *ill2-1*, *iar3-2* i *ill2-1iar3-2* (Slika 9.).

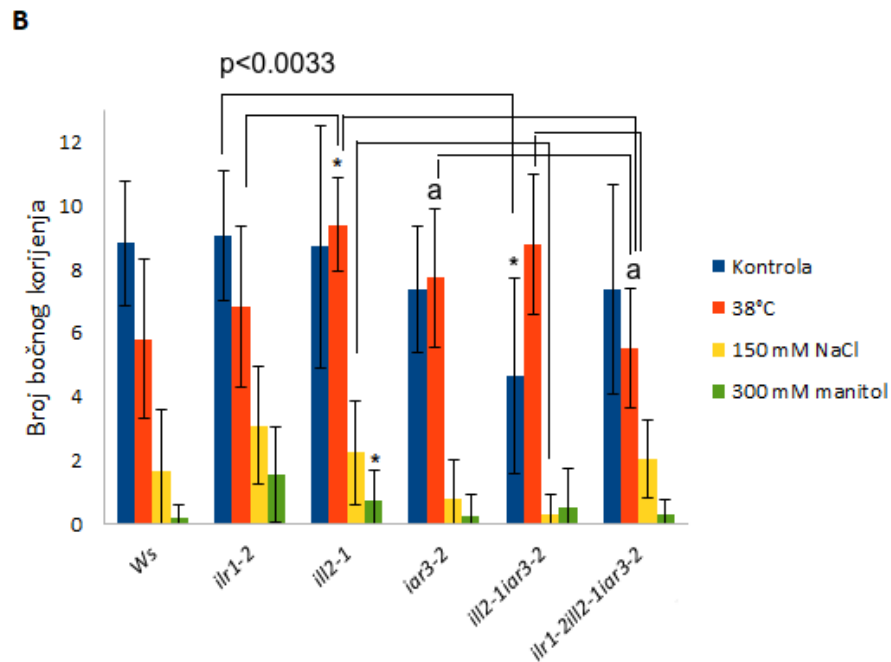
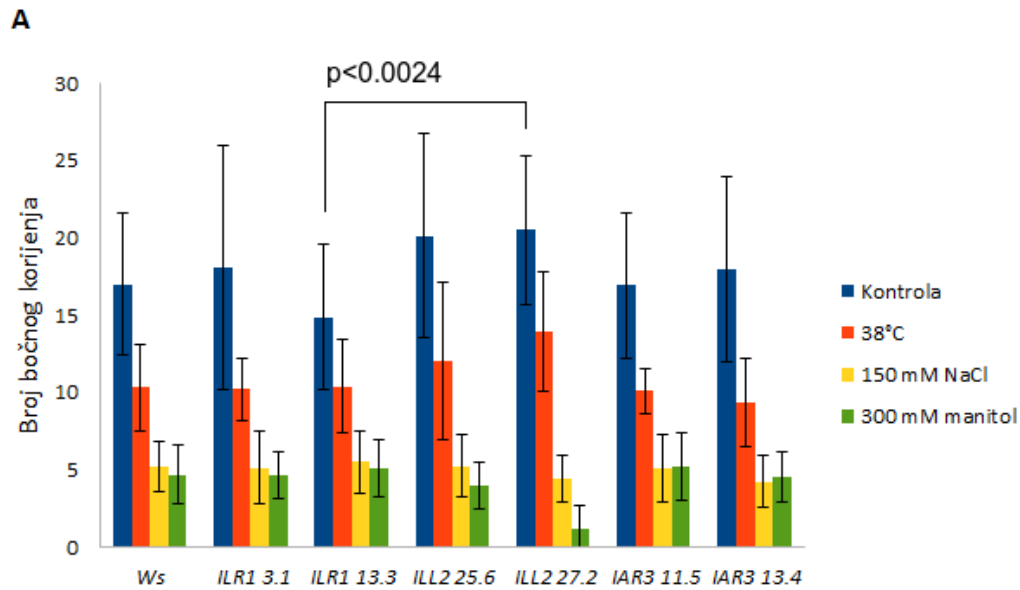
#### 4.5. UTJECAJ SOLNOG STRESA NA ARHITEKTURU KORIJENA BILJAKA NADEKSPRESEORA I MUTANATA

Kako bih istražio utjecaj solnog stresa na arhitekturu korijena biljaka divljeg tipa, nadekspresora (*ILR1 13.3*, *ILR1 3.1*, *ILL2 25.6*, *ILL2 27.2*, *IAR3 11.5* i *IAR3 13.4*) i mutanata (*ilr1-2*, *ill2-1*, *iar3-2*, *ill2-1iar3-2* i *ilr1-2ill2-1iar3-2*), biljke sam uzgajao 8 dana na mediju MS s dodatkom 150 mM NaCl. Prirast primarnog korijena u svim linijama nadekspresora bio je značajno manji od prirasta korijena istih linija uzgajanih na mediju MS0. Usporedbom s biljkama divljeg tipa zabilježeno je da biljke nadekspresori *ILR1 3.1*, *ILR1 13.3* i *ILL2 27.2* imaju značajno manji prirast primarnog korijena, ali međusobna razlika između tih biljnih linija nadekspreora nije bila statistički značajna (Slika 8.). Broj bočnog korijenja linija nadekspresora u svim slučajevima bio je manji od broja bočnog korijenja biljaka istih linija uzgajanih na mediju MS0 i biljaka divljeg tipa (Slika 9.).

Prirast primarnog korijena svih biljnih linija mutanata bio je značajno manji od prirasta primarnog korijena biljaka divljeg tipa, osim kod biljne linije mutanata *ill2-1iar3-2*, gdje nije zabilježena značajna razlika. Razlike u prirastu primarnog korijena u uvjetima solnog stresa nisu zabilježene između biljnih linija mutanata (Slika 8.). Broj bočnog korijenja linija mutanata u svim slučajevima bio je manji od broja bočnog korijenja biljaka istih linija uzgajanih na mediju MS0. Broj bočnog korijenja linija mutanata se također nije razlikovao od broja bočnog korijenja divljeg tipa. Jedina primijećena razlika u broju bočnog korijenja je između biljnih linija *ill2-1iar3-2* i *ilr2-1*, gdje je *ill2-1iar3-2* imala značajno manji broj bočnog korijenja (Slika 9.).



Slika 8. Prirast primarnog korijena biljaka nadekspresora (A) i mutanata (B) uzgajanih na mediju MSO u kratkom danu (kontrola) ili u temperaturnom režimu (38 °C) ili na medijima s dodatkom 150 mM NaCl ili 300 mM manitol. Eksperiment je proveden na 5 bioloških replika od kojih je svaka sadržavala 4 klijanca. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ( $\pm$ SD) prirasta primarnog korijena (%) za svaku liniju nadekspresora ili mutanata. Zvezdice označavaju značajnu razliku u prirastu korijena nadekspresora (A;  $p \leq 0.0024$ ) ili mutanta (B;  $p \leq 0.0033$ ) uzgajanih u uvjetima stresa od biljaka divljeg tipa uzgajanih u istim uvjetima. Kvadratne zagrade označuju statističku značajnu razliku u prirastu između linija nadekspresora (A;  $p \leq 0.0024$ ) ili mutanta (B;  $p \leq 0.0033$ ). Prirasti primarnih korijena kod svih biljnih linija, u svim tipovima stresa, značajno su bili manji od prirasta primarnog korijena biljaka iste linije uzgajanih u kontrolnim uvjetima, osim kod stupaca označenih slovom *a* koji se nisu značajno razlikovali od prirasta primarnog korijena biljaka uzgajanih u kontrolnim uvjetima ( $p \leq 0.05$ ). Slovom *b* označen je stupac koji se razlikovao od svih ostalih linija uzgajanih na istom stresnom uvjetu ( $p \leq 0.0024$ ).



Slika 9. Broj bočnog korijenja biljaka nadekspresora (A) i mutanata (B) nakon 8 dana uzgoja na mediju MSO u kratkom danu (kontrola) ili u temperaturnom režimu (38 °C) ili na medijima s dodatkom 150 mM NaCl (solni stres) ili 300 mM manitola (osmotski stres). Eksperiment je proveden na 5 bioloških replika od kojih je svaka sadržavala 4 biljaka. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ( $\pm$ SD) broja bočnog korijenja za svaku liniju nadekspresora ili mutanata. Zvezdice označavaju statistički značajnu razliku u broju bočnog korijenja biljne linije nadekspresora (A;  $p \leq 0.0024$ ) ili mutanata (B;  $p \leq 0.0033$ ) uzgajanih u uvjetima stresa od biljaka divljeg tipa uzgajanih u istim uvjetima. Kvadratne zagrade označuju statističku značajnu razliku u broju bočnog korijenja između linija nadekspresora (A;  $p \leq 0.0024$ ) ili mutanata (B;  $p \leq 0.0033$ ). Slovom *a* označeni su stupci s prirastom primarnog korijena u uvjetima stresa koji se nisu značajno razlikovali od prirasta primarnog korijena u kontrolnim uvjetima ( $p \leq 0.05$ ).

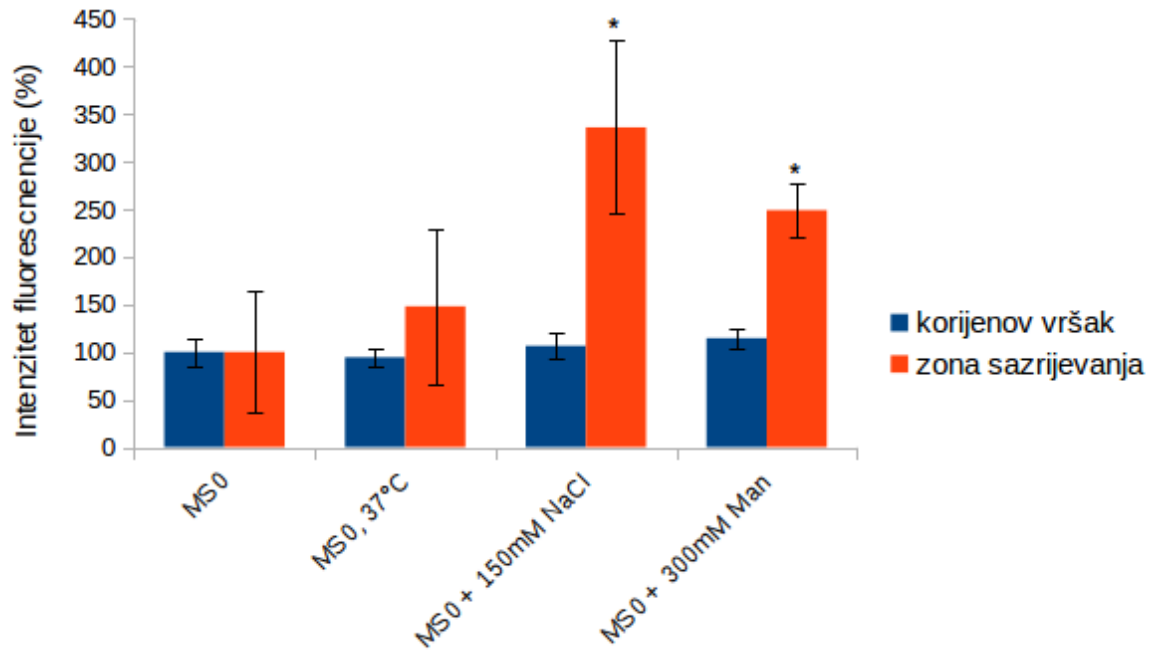
#### 4.6. UTJECAJ OSMOTSKOG STRESA NA ARHITEKTURU KORIJENA BILJAKA NADEKSPRESORA I MUTANATA

Kako bih istražio utjecaj osmotskog stresa na arhitekturu korijena biljaka divljeg tipa, nadekspresora (*ILR1 13.3*, *ILR1 3.1*, *ILL2 25.6*, *ILL2 27.2*, *IAR3 11.5* i *IAR3 13.4*) i mutanata (*ilr1-2*, *ill2-1*, *iar3-2*, *ill2-1iar3-2* i *ilr1-2ill2-1iar3-2*), biljke sam uzgajao 8 dana na mediju MS s dodatkom 300 mM manitola. Kod svih biljnih linija nadekspresora zabilježen je značajno manji prirast primarnog korijena i broj bočnog korijenja u odnosu na biljke iste biljne linije uzgajane na mediju MS0 (Slika 8. i Slika 9.). Niti jedna biljna linija nadekspresora nije imala značajno različit prirast primarnog korijena u odnosu na divlji tip, no biljna linija nadekspresora *IAR3 13.4* imala je značajno veći prirast od linije *ILR1 13.3* (Slika 8.).

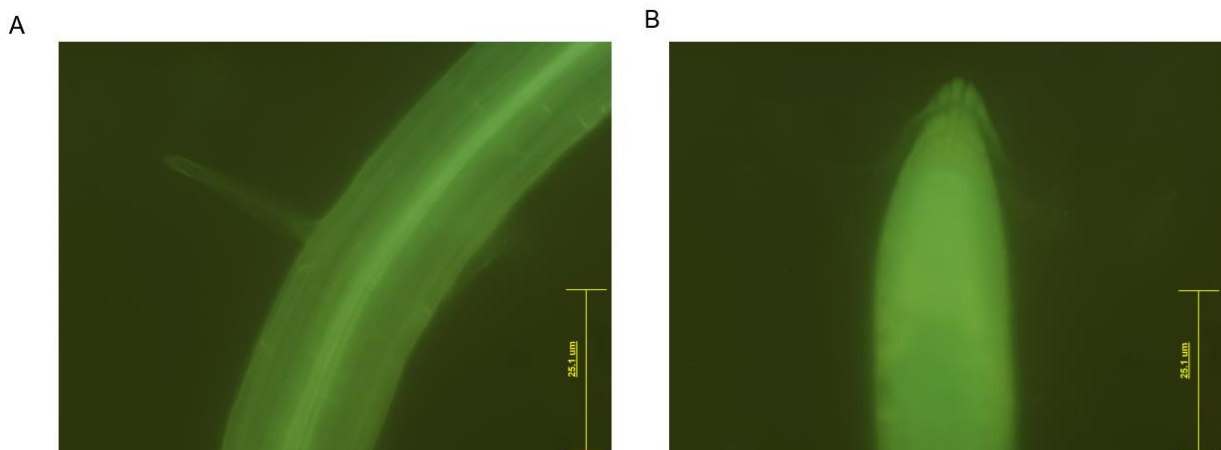
Kod svih biljnih linija mutanata zabilježen je značajno manji prirast primarnog korijena i broj bočnog korijenja u odnosu na biljke iste biljne linije uzgajane na mediju MS0. Biljne linije mutante *ilr1-2* i *ill2-1* imale su značajno manji prirast primarnog korijena od biljaka divljeg tipa, dok kod ostalih linija mutanata nije zabilježena značajna razlika u odnosu na divlji tip. Razlika u prirastu između linija mutanata nije zabilježena (Slika 8.). *ilr1-2* je jedina biljna linija koja je imala značajno veći broj bočnog korijenja od divljeg tipa, ali i od linija *iar3-2* i *ilr1-2ill2-1iar3-2*, koje su uzgajane u istim uvjetima (Slika 9.).

#### 4.7. NAKUPLJANJE PROTEINA ILL2 U KORIJENU BILJAKA NADEKSPRESORA ILL2 8.2 UZGAJANIH U UVJETIMA SOLNOG, OSMOTSKOG I TEMPERATURNOG STRESA

Biljke nadekspresore *ILL2 8.2* vrste *A. thaliana*, ekotipa *Wassilewskija*, uzgajao sam u petrijevim zdjelicama s krutim medij MS0 u kontrolnim uvjetima, u uvjetima toplinskog stresa (37 °C), na mediju MS s dodatkom NaCl (150 mM; solni stres) i na mediju MS s dodatkom d-manitola (300 mM; osmotski stres) prema protokolu (opisanom u poglavlju 3.2.3.3.). Fluorescentnom mikroskopijom sam zabilježio fluorescenciju aksinamidohiolaze ILL2-GFP u području vrška korijena i zoni sazrijevanja korijena (Slika 10. i Slika 11.), te sam kvantificirao prisutnost proteina. Intenzitet fluorescencije u vršku korijena linije nadekspresora *ILL2 8.2* nije se značajno razlikovao u biljkama uzgajanih na solnom, osmotskom i temperaturnom stresu od onih uzgajanih u kontrolnim uvjetima. U zoni sazrijevanja, značajna razlika zabilježena je u biljkama uzgajanih na solnom i osmotskom stresu, dok u biljkama uzgajanih na temperaturnom stresu nije primijećena statistički značajna razlika u odnosu na biljke uzgajane na mediju MS0 (Slika 11.).



Slika 10. Intenzitet fluorescencije proteinskog konstrukta ILL2-GFP u korijenovom vršku ili u zoni sazrijevanja korijena biljke nadekspresora ILL2 8.2. Biljke su uzgajane 8 dana na mediju MS0 u uvjetima kratkog dana (kontrola), na mediju MS0 uzgajanih u uvjetima kratkog dana i izloženih 3 sata temperaturi od 37 °C, ili 8 dana na medijima MS s dodatkom 150 mM NaCl ili 300 mM manitola. Eksperiment je proveden u 2 biološke replike od kojih je svaka sadržavala po 3 biljke. Rezultati su prikazani kao odnos (%) intenziteta fluorescencije u korijenu biljaka uzgajanih u uvjetima stresa (MS0 na 37, s 150 mM NaCl ili 300 mM manitolom) i intenziteta fluorescencije biljaka uzgajanih na mediju MS0. Zvezdice predstavljaju značajnu razliku u intenzitetu fluorescencije u korijenu biljaka uzgajanih na stresnim uvjetima od kontrole ( $p \leq 0.05$ ).



Slika 11. Korijen biljke nadekspresora ILL2 8.2, vrste *Arabidopsis thaliana*, ekotip Wassilewskija, uzgajane 15 dana na krutom mediju MS0 u uvjetima kratkog dana, pod fluorescencijskim mikroskopom. A- fluorescencija proteina ILL2-GFP u zoni sazrijevanja; B- fluorescencija proteina ILL2-GFP u vršku korijena.

## 5. RASPRAVA

Eksperimenti istraživanja uloge gena u organizmima s umjetno stvorenom nadekspresijom nekog gena, zahtijevaju provjeru razine ekspresije gena od interesa (Moriya, 2015). Razlog tome je što različite količine proteina mogu uzrokovati različit fenotip. U ovom eksperimentu korištene su linije nadekspresori *ILR1 13.3*, *ILR1 3.1*, *ILL2 25.6*, *ILL2 27.2*, *ILL2 8.2*, *IAR3 11.5* i *IAR3 13.4* te im je određena razina ekspresije auksinske amidohidolaze za koji posjeduju transgen. Budući da sam koristio univerzalne početnice koje umnažaju nativni gen i transgen izmjerio sam kumulativnu ekspresija ciljanog gena. Najprije je izolirana ukupna RNA iz biljaka nadekspresora i divljeg tipa te je određena koncentracija RNA i čistoća uzoraka. Prema protokolu proizvođača paketa za izolaciju ukupne RNA, prinos RNA iz 50 mg listova biljke *A. thaliana* je između 4 i 6 µg. Pošto je u ovom eksperimentu izolacija ukupne RNA rađena iz cijelih biljaka prinos je, očekivano, bio puno veći (između 9.8 i 30.5 µg). Količinu ukupne RNA potrebno je odrediti zbog toga što se u metodi qPCR mora koristiti ista količina kalupa u svim uzorcima kako bi se mogla pravilno odrediti količina mRNA od interesa u uzorku. Uspješnost eksperimenata kvantifikacije ekspresije gena uvjetovana je čistoćom uzoraka ukupne RNA (koja je određena omjerima absorbancija  $A_{260/280}$  i  $A_{260/230}$ ) iz razloga što zaostale tvari u uzorcima, kao što su fenoli, proteini ili šećeri, mogu umanjiti efikasnost reakcija RT i qPCR. Čistoće uzoraka u mojem eksperimentu bile su zadovoljavajuće za nastavak procedure kvantifikacije ekspresije gena.

Metodom PCR s početnicama ACT3\_fw i ACT3\_rev te agaroznom gel elektroforezom potvrđeno je da su uzorci cDNA oslobođeni od dijelova genomske DNA koji često mogu zaostati u izolatima RNA, što znači da je korak tretmana uzoraka ukupne RNA s DNazom bio uspješan. Korištene početnice (ACT3\_fw i ACT3\_rev) specijalno su dizajnirane kako bi produkti reakcije PCR s kalupom cDNA ili s genomskom DNA bili različite veličine. Početnica ACT3\_fw je komplementarna sa sekvencom u drugom egzonu, a početnica ACT3\_rev sa sekvencom trećeg egzona gena *ACT3*. Stoga se umnažanjem s kalupa genomske DNA s ovim početnicama umnaža dio drugog i trećeg egzona i cijeli drugi intron. Radi takvog dizajna početnica nastaju fragmenti različite duljine ako se reakcija PCR izvodi na uzorku genomske DNA (733 pb) ili na uzorku cDNA (650 pb), koja nema sekvence introna. Stoga, produkti reakcije PCR s ovim početnicama stvaraju jedinstvene vrpce na agaroznom gelu, ovisno koristi li se za kalup cDNA ili genomaska DNA.

Uzorci cDNA, dobiveni reakcijom RT s uzorcima ukupne RNA biljaka nadekspresora i divljeg tipa, korišteni su u reakciji qPCR. Ct vrijednosti tehničkih replika svih uzoraka cDNA razlikovale su se za manje od 1 ciklus, što pokazuje da je u svaku reakcijsku otopinu dodana približno jednaka količina kalupa cDNA (Udvardi *i sur.*, 2008). Međutim, izmjerene su različite relativne ekspresije gena za auksinske amidohidrolaze između dvije biološke replike (eksperimenta). To može biti uzrokovano



različitom efikasnošću reakcije RT između bioloških replika, što dovodi do različitih količina kalupa cDNA za qPCR (Schwaber *i sur.*, 2019), ili različitim fiziološkim statusom biljaka, što može biti posljedica suptilnih razlika u uvjetima uzgoja biljaka ili u postupanju sa svježim biljnim materijalom tijekom dva nezavisna eksperimenta. Različite efikasnosti reakcije RT može uzrokovati neefikasno vezanje oligo-dT početnica na kalup, degradacija samih početnica ili djelomično raspadanje samog kalupa. Moguće je i da je zbog nejednolikog postupanja sa svježim biljnim materijalom došlo do razlike u ekspresiji gena od interesa, na primjer, zbog mehaničkog stresa stvorenom pri prebacivanju biljaka s hranjivih medija u epruvete za homogenizaciju. Potencijalno objašnjenje je i da je zbog nedovoljno brzog postupanja pri homogenizaciji biljnog tkiva došlo do otapanja tkiva između dva ciklusa homogenizacije (detaljno opisano u poglavlju 3.2.5) te da je to utjecalo na količinu mRNA od interesa u izolatu ukupne RNA. Razina ekspresije gena *ILR1*, *ILL2* i *IAR3* izmjerena je u biljkama divljeg tipa i pokazano je da je u biljkama divljeg tipa najjače ekspimiran gen *IAR3* ( $\Delta Ct = -0.64$ ) pa onda *ILR1* ( $\Delta Ct = 3.53$ ), a najslabije gen *ILL2* ( $\Delta Ct = 5.68$ ), u odnosu na prosjek vrijednosti Ct referentnih gena. Također, ovim eksperimentom potvrđena je povećana ekspresija transgena auksinskih amidohidrolaza u biljkama nadekspresora u odnosu na divlji tip, i to za 182.5 i 731.17 puta u linijama *ILR1 13.3* i *ILR1 3.1*, u linijama *ILL2 8.2*, *ILL2 25.6* i *ILL2 27.2* za 8.87, 15.7 i 350.93 puta, a u linijama *IAR3 11.5* i *IAR3 13.4* za 3.48 odnosno 44.12 puta. U dostupnoj literaturi nema puno objavljenih rezultata mjerenja razina ekspresije u biljkama nadekspresora za auksinske amidohidrolaze. Jedinu dostupni rezultati su razine ekspresije gena *IAR3* i *ILL6* u biljkama nadekspresora vrste *A. thaliana*, ekotipa Columbia. Zhang *i sur.* (2016) u svom istraživanju su konstruirali linije nadekspresore *IAR3-OE* i *ILL6-OE* s transgenima za *IAR3* i *ILL6* pod kontrolom konstitutivnog promotora 35S CaMV. Biljke nadekspresori *IAR3-OE* i *ILL6-OE* napravljene su transformacijom pomoću bakterije *Agrobacterium tumefaciens*, metodom *floral dip*, te su dobili više biljnih linija s nasumično ugrađenim transgenima u genomu s različitim razinama ekspresije transgena. Početnice koje su koristili umnažaju i nativni gen i transgen, kao što je slučaj i u mojem istraživanju. U nadekspresorskim linijama *IAR3-OE* koje su dobili relativne ekspresije, naspram referentnog gena *AKTIN8*, kreću se između 50% i 300%, u nadekspresorskim linijama *ILL6-OE* vrijednosti relativnih ekspresija variraju između 50% i 250%, dok u biljkama divljeg tipa nije detektirana ekspresija ni gena *IAR3* niti *ILL6* (Zhang *i sur.*, 2016). Zhang *i sur.* (2016) mjerenje ekspresije radili su na 9 dana starim klijancima, dok sam ja radio na 12 dana starim klijancima. U oba slučaja biljke su transformirane metodom *floral dip*, metodom u kojoj dolazi do nasumične pozicije ugradnje transgena u genom, što za posljedicu može imati različitu razinu ekspresije transgena.

Prema trenutačnim spoznajama o učincima auksina na arhitekturu korijena, poznato je da velike količine aktivnog oblika auksina uzrokuju smanjeni rast primarnog korijena i povećan broj bočnog korijenja. S druge strane, male količine auksina uzrokuju jak produžni rast korijena i smanjeni

broj bočnog korijenja (Woodward i Bartel., 2005). Prema tome, biljke nadekspresori za auksinske amidohidrolaze trebale bi imati povećanu količinu aktivnog oblika auksina te kraći primarni korijen i veći broj bočnog korijenja, a biljke mutante za auksinske amidohidrolaze obrnuto. Međutim, u istraživanju predstavljenom u ovom radu, duljina primarnog korijena biljaka nadekspresora i mutanata, uzgajanih u uvjetima bez stresa, nije se razlikovala od duljine primarnog korijena biljaka divljeg tipa, a duljina primarnog korijena biljka mutanata *ilr1-2* je bila čak i manja u odnosu na biljke divljeg tipa. Broj bočnog korijenja u biljkama nadekspresora uzgajanih u uvjetima bez stresa, također se nije razlikovao od broja bočnog korijenja biljaka divljeg tipa, što nije u skladu s očekivanjima. U biljkama mutantama, broj bočnog korijenja bio je manji od biljaka divljeg tipa jedino u slučaju linije mutante *ill2-1iar3-2*. Mogući razlog ovakvih rezultata je aktivacija nekog drugog metaboličkog puta koji povećava ili smanjuje količinu aktivnog oblika auksina. U slučaju arhitekture korijena biljaka nadekspresora, moguće je da se snažno aktivira put konjugacije auksina što zamaskira utjecaj prekomjerno eksprimiranih auksinskih amidohidrolaza. U korist ove pretpostavke ide i činjenica da je ekspresija gena *WES1* (IAA-amido sintaza iz porodice *GH3* koja katalizira konjugaciju IAA s aminokiselinom Asp) pozitivno regulirana količinom auksina (Park *i sur.*, 2007). U slučaju arhitekture korijena biljaka mutanata, moguće je da uslijed smanjene količine aktivnog auksina kod ovih biljnih linija, dolazi do pojačanja u sintezi auksina. U skladu s ovom pretpostavkom je i činjenica da su geni *YUC*, koji sudjeluju u procesu sinteze IAA, regulirani negativnom povratnom spregom s auksinom (Cao *i sur.*, 2019). Slične rezultate su dobili i Rampey *i sur.* (2004), čiji rezultati pokazuju da jednostruke mutante (*ilr1*, *ill2* i *iar3*) biljke *A. thaliana* (ekotip *Columbia*) i dvostruke mutante (*ilr1ill2*, *ilr1iar3* i *ill2iar3*) imaju podjednak broj bočnog korijenja kao i biljke divljeg tipa, no trostruka mutanta (*ilr1ill2iar3*) ima značajno manji broj bočnog korijenja. Također Hayashi *i sur.* 2021 pokazuju da biljne linije mutante *ilr1-1*, *ill2-1* i *iar3-2* imaju podjednaku duljinu primarnog korijena nakon 7 dana uzgoja u uvjetima bez stresa. Rezultati mojeg istraživanja ne podudaraju se u potpunosti s rezultatima istraživanja od Rampey *i sur.* (2004) i Hayashi *i sur.* (2021). U sklopu ovog rada, broj bočnog korijenja jednostrukih mutanata, uzgajanih u kontrolnim uvjetima, uistinu je bio podjednak broju bočnog korijenja divljeg tipa, međutim isto vrijedi i za trostruku mutantu (*ilr1-2ill2-1iar3-2*). Također, suprotno istraživanjima od Rampey *i sur.* (2004) i Hayashi *i sur.* (2021), dvostruka mutanta (*ill2-1iar3-2*) imala je značajno manji broj bočnog korijenja od biljaka divljeg tipa.

Kao što je već opisano u poglavlju 1.6., arhitektura korijena značajno se mijenja u uvjetima solnog i osmotskog stresa. Smolko *i sur.* (2021) su u svom istraživanju na biljci *A. thaliana*, ekotip *Columbia*, pokazali da dolazi do smanjenog rasta primarnog korijena i broja bočnog korijenja u uvjetima solnog (100 mM NaCl) i osmotskog stresa (200 mM manitol). Pokazano je i da je duljina primarnog korijena i broj bočnog korijenja veći u biljkama izloženih solnom stresu nego u biljkama

izloženih osmotskom stresu (Smolko *i sur.* 2021). U mojem istraživanju također je pokazan smanjen prirast primarnog korijena i broj bočnog korijenja u uvjetima solnog i osmotskog stresa, međutim, duljina primarnog korijena bila je veća u biljkama uzgajanih u uvjetima osmotskog stresa u odnosu na one uzgajane u uvjetima solnog stresa, dok je broj bočnog korijenja bio veći u biljkama uzgajanih u uvjetima solnog stresa. Razlike u rezultatima između mog istraživanja i istraživanja od Smolko *i sur.* (2021), uz to što su korištene biljke različitih ekotipova, vjerojatno su posljedica razlika u korištenim koncentracijama soli i manitola. U mojem istraživanju koncentracija NaCl bila je 150 mM, dok je koncentracija manitola bila 300 mM, a u istraživanju od Smolko *i sur.* (2021), koncentracija NaCl-a bila je 100 mM, a manitola 200 mM. Moguće je da razlika između 100 i 150 mM NaCl-a izaziva mnogo veći stres te zaustavljanje rasta primarnog korijena u odnosu na razliku između 200 i 300 mM manitola. Nadalje, prije presađivanja biljaka na stresne medije, u mojem istraživanju su biljke prethodno rasle 7 dana na MS0 mediju, dok su u istraživanju od Smolko *i sur.* (2021) biljke rasle 4 dana, što je velika razlika u razvojnom stadiju biljke (kotiledoni se otvaraju tek ~6 dan od klijanja) (Boyes *i sur.*, 2001). Također, mjerenje duljine primarnog korijenja i broja bočnog korijenja u mojem istraživanju napravljeno je 8. dan od presađivanja biljaka na stresni medij, dok je u istraživanju od Smolko *i sur.* (2021) konačno mjerenje napravljeno 13. dan (iako je u mjerenju i 7. pokazan sličan omjer biljaka uzgajanih na solnom i biljaka uzgajanih na osmotskom stresu).

Poznato je da u uvjetima abiotskih stresova, dolazi do značajne promjene u aktivnosti gena za sintezu, transport i detekciju auksina (Naser i Shani., 2016). Dosadašnja istraživanja utjecaja gena auksinskih amidohidrolaza *ILR1*, *ILL2* i *IAR3* uglavnom su se bazirala na uzgoju biljaka mutanata za navedene gene na podlogama s dodatkom IAA konjugata u svrhu karakterizacije supstrata za auksinske amidohidrolaze (Woodward i Bartel., 2005; Bartel i Fink, 1995; Rampey *i sur.*, 2004). Malo je objavljenih rezultata istraživanja arhitekture korijena u biljkama nadekspresora i mutanata gena auksinskih amidohidrolaza (*ILR1*, *ILL2* i *IAR3*) uzgajanih u uvjetima stresa. Iz tog razloga, utjecaj abiotskih stresova na ekspresiju auksinskih amidohidrolaza slabo je poznat, a također postoji malo podataka o ulozi istih u odgovoru biljaka na stresne uvjete. U istraživanju od Kinoshita *i sur.* (2012) pokazano je da se ekspresija gena *IAR3*, kod divljeg tipa biljke *A. thaliana*, ekotipa Columbia-0, značajno povećava i omogućava veću otpornost na osmotski stres te da povećana ekspresija gena *IAR3* uzrokuje zaustavljanje rasta primarnog korijena i povećanje broja bočnog korijenja u biljkama uzgajanih u uvjetima osmotskog stresa. Također, u istraživanju od Kinoshita *i sur.* (2012) pokazano je da biljke mutante za gen *IAR3* (*iar3-5* i *iar3-6*), uzgajane u uvjetima osmotskog stresa, imaju veću duljinu primarnog korijena i manji broj bočnog korijenja od biljaka divljeg tipa. Nadalje, Junghans *i sur.* (2006) koristili su transgenične biljke *A. thaliana*, s pojačanom ekspresijom gena *ILL3* iz biljaka roda *Populus* (pod konstitutivnim promotorom CaMV 35S), te je pokazano da prekomjerna ekspresija gena

*ILL3* omogućuje otpornost biljaka na solni stres. Također, u istraživanju od Junghans *i sur.* (2006) pokazan je povećan rast primarnog korijena u uvjetima solnog stresa u biljkama s pojačanom ekspresijom gena *ILL3*. Suprotni rezultati ovog istraživanja daju naslutiti da različite auksinske amidohidrolaze mogu imati različit utjecaj na arhitekturu korijena. Također, iz rezultata mojeg istraživanja ne može se zaključiti da je gen *IAR3* odgovoran za zaustavljanje rasta korijena u uvjetima osmotskog stresa, jer niti kod nadekspresorskih linija za ovaj gen nije primijećen smanjen prirast primarnog korijenja, niti je kod mutantnih linija primijećen veći prirast primarnog korijena u odnosu na divlji tip. Međutim, smanjeni prirast primarnog korijena primijećen je u biljkama nadekspresora *ILR1 3.1*, *ILR1 13.3* i *ILL2 27.2* uzgajanih u uvjetima solnog stresa. Ovo bi se moglo objasniti na način da je konstitutivna ekspresija gena *ILR1* i *ILL2* snažno utjecala na količinu auksinskih konjugata te da je došlo do dovoljno velikog povećanja količine aktivnog oblika auksina koji je potom inhibirao rast primarnog korijena. Ovu pretpostavku podupiru i rezultati kvantifikacije ekspresije gena *ILR1* u biljkama nadekspresora *ILR1 3.1* i *ILR1 13.3* te gena *ILL2* u biljci nadekspresora *ILL2 27.2*. Naime, kod ovih linija nadekspresora zabilježena je velika relativna ekspresija navedenih gena u odnosu na biljke divljeg tipa, za razliku od ostalih linija nadekspresora čija je relativna ekspresija bila mnogo manja. Međutim, broj bočnog korijenja kod ovih biljnih linija nadekspresora nije bio značajno različit od broja bočnog korijenja biljaka divljeg tipa, kao što bi se očekivalo prema rezultatima od Kinoshita *i sur.* (2012). Nadalje, suprotno od očekivanog, kod gotovo svih linija biljaka mutanata, uzgajanih u stresnim uvjetima, došlo je do smanjenog rasta primarnog korijenja u odnosu na divlji tip, osim kod mutantne linije *ill2-1iar3-2* u svim uvjetima i kod linija *iar3-2* i *ilr1-2ill2-1iar3-2* u uvjetima osmotskog stresa kod kojih nije zabilježena razlika u odnosu na divlji tip. Prema Kinoshita *i sur.* (2012), biljke s mutiranim genom *IAR3* trebala bi imati veći prirast primarnog korijena od biljaka divljeg tipa uzgajanih na mediju s 150 mM NaCl, međutim, u mojem eksperimentu nije došlo do pojačanog rasta korijena mutante *iar3-2*. Općenito, za očekivati je bilo da će duljina primarnog korijena biti veća u biljkama mutantama uzgajanih u stresnim uvjetima, zbog smanjene količine aktivnog oblika auksina (Woodward i Bartel, 2005). Broj bočnog korijenja u biljkama linija mutanata, uzgajanih u uvjetima stresa, u većini slučajeva se ne razlikuje od broja bočnog korijenja biljaka divljeg tipa. Međutim, mutantna linija *ill2-1*, u uvjetima temperaturnog i osmotskog stresa, ima veći broj bočnog korijenja u odnosu na biljke divljeg tipa, što je neočekivan rezultat.

Treba naglasiti da postoje razlike u provedbi mojeg istraživanja i istraživanja od Kinoshita *i sur.* (2012) i Junghans *i sur.* (2006). Naime, u istraživanju od Kinoshita *i sur.* (2012), u eksperimentima uzgoja biljaka u uvjetima stresa, korišten je slabi medij MS (eng. *Half strength MS medium*) s 2.2 g/L MS praška, 0.6 g/L MES i 5 g/L s 0.6% agara i 250 mM manitola, dok je u mojem istraživanju korišten puni medij MS s 1% agara i 300 mM manitola (detaljno opisano u poglavlju 3.2.1.). Kinoshita *i sur.*

(2012) koristili su biljke divljeg tipa *A. thaliana*, ekotipa Columbia, te linije mutante *iar3-5* i *iar3-6*, dok su u mojem istraživanju korištene biljke iste vrste, no ekotipa Wassilewskija, te liniju mutantu *iar3-2*. Vremenski periodi mjerenja duljine primarnog korijena i broja bočnog korijenja su se također razlikovali. U istraživanju od Kinoshita *i sur.* (2012) konačno mjerenje duljine primarnog korijena napravljeno je četvrti dan, dok sam ja mjerenje radio osmi dan od nasađivanja na stresne podloge. Junghans *i sur.* (2006) utjecaj solnog stresa na rast korijena istražili su uzgojem biljaka na slabom mediju MS s dodatkom 50 mM NaCl, dok je utjecaj solnog stresa u mojem istraživanju ispitan je na punom mediju MS s dodatkom 150 mM NaCl. Također, Junghans *i sur.* (2006) istražuju utjecaj solnog stresa na transgenične biljke *A. thaliana* s transgenom *ILL3* iz biljaka roda *Populus*, dok su u mojem istraživanju korištene transgenične biljke s homolognom nadekspresijom (genima *ILR1*, *ILL2* *IAR3* biljke *A. thaliana*). Junghans *i sur.* (2006) mjerenje rasta primarnog korijena napravili su jedanaesti dan od nasađivanja biljaka na stresne podloge.

Valja naglasiti da su eksperimenti uzgoja biljaka u uvjetima stresa u mojem istraživanju napravljeni u dva navrata i da uvjeti nisu bili u potpunosti jednaki za uzgoj biljaka nadekspresora i mutanata. Naime, nakon nasađivanja biljaka nadekspresora u petrijeve zdjelice sa stresnim podlogama, petrijeve zdjelice zamotane su trakom leukopor, a u slučaju uzgoja biljaka mutanata parafilmom. U petrijevim zdjelicama zamotanim parafilmom najvjerojatnije nije bilo dovoljno cirkulacije zraka te je došlo do nakupljanja tekuće vode na stresnim podlogama. Ova razlika značajno može utjecati na ishod eksperimenta, pogotovo u slučaju ispitivanja utjecaja solnog i osmotskog stresa na arhitekturu korijena. Međutim, trend manjeg prirasta primarnog korijena i broja bočnog korijenja biljaka divljeg tipa u uvjetima solnog i osmotskog stresa prisutan je u rezultatima oba eksperimenta, što pokazuje da su željeni uvjeti za uzgoj biljaka barem donekle bili očuvani.

U dostupnoj literaturi, nema podataka o nakupljanju i lokalizaciji proteina *ILL2* u korijenu biljaka *A. thaliana* uzgajanih u uvjetima solnog, temperaturnog i osmotskog stresa. Rezultati ovog eksperimenta pokazuju da se protein *ILL2* u biljkama nadekspresora *ILL2 8.2*, uzgajanih u uvjetima solnog i osmotskog stresa, značajno više nakuplja u zoni sazrijevanja u odnosu na vršak korijena, iako je proteinski konstrukt konstitutivno eksprimiran. Ovakav rezultat može ukazivati na diferencijalnu post-translacijsku regulaciju proteina *ILL2* između različitih dijelova korijena u uvjetima abiotskog stresa. Kako znamo da povećana količina aktivnog oblika IAA značajno povećava inicijaciju bočnog korijenja te utječe na njihov broj (Woodward i Bartel, 2005), za očekivati je da bi takve biljke imale povećani broj bočnog korijenja od biljaka uzgajanih na kontrolnom mediju (MS0). No broj bočnog korijenja i duljina primarnog korijenja kod ove biljne linije nije određena te predlažem da se navedeno mjerenje uključi u buduća istraživanja arhitekture korijena ove biljne linije u stresnim uvjetima.

Međutim, broj bočnog korijenja ostalih linija nadekspresora za gen *ILL2* (*ILL2* 25.6 i *ILL2* 27.2) nije bio značajno različit u odnosu na biljke iste linije uzgajane na kontrolnom mediju (MS0).

U ovom istraživanju napravljena je i usporedba metoda sterilizacije sjemenki otopinom izosana i mukazola te 96% etanolom. Oba načina sterilizacije sjemenki pokazala su se dobra u sprječavanju kontaminacije biljaka mikroorganizmima te je klijavost sjemenki steriliziranih jednom ili drugom metodom bila vrlo visoka. Prednost sterilizacije sjemenki sa 70% etanolom je u tome što su sterilizirane sjemenke posve suhe te se mogu čuvati dulje vrijeme i koristiti za više eksperimenata bez da prokliju. Također, suhe sjemenke je jednostavnije i brže nasijavati od sjemenki steriliziranih otopinom izosana i mukazola.

## 6. ZAKLJUČAK

Utvrđena je razina nadekspresije gena auksinskih amidohidrolaza u transgeničnim biljkama *Arabidopsis thaliana*, ekotipa Wassilewskija. U svim linijama nadekspresora potvrđena je pojačana ekspresija auksinskih amidohidrolaza za koje posjeduju transgen. Najveća relativna ekspresija gena *ILR1* izmjerena je u linijama nadekspresora *ILR1 3.1* i *ILR1 13.3*, a gena *ILL2* u liniji nadekspresora *ILL2 27.2*. Kod linija s nadekspresijom gena za auksinske amidohidrolaze i u mutantama za gene *ILR1*, *ILL2* i *IAR3* (*ilr1-2*, *ill2-1*, *iar3-2*, dvostruka mutanta *ill2-1iar3-2* i trostruka mutanta *ilr1-2ill2-1iar3-2*) utvrđena je arhitektura korijena klijanaca uzgajanih u kontrolnim uvjetima, te u uvjetima solnog, osmotskog i temperaturnog stresa. Pokazao sam moguć utjecaj pojačano eksprimiranih gena *ILR1* i *ILL2* u rastu i razvoju korijena u uvjetima solnog stresa. Takav zaključak proizlazi iz dobivenog podatka da biljke nadekspresori *ILR1 3.1*, *ILR1 13.3* i *ILL2 27.2*, kod kojih sam pokazao i veliku relativnu ekspresiju navedenih gena u odnosu na divlji tip, imaju značajno smanjen prirast primarnog korijena u uvjetima solnog stresa. Eksperimentima određivanja tkivne lokalizacije proteinskog konstrukta *ILL2-GFP* pokazao sam povećano nakupljanje proteina *ILL2* u zoni sazrijevanja korijena u odnosu na vršak korijena. Time je pokazano da su geni *ILR1* i *ILL2* dobri kandidati za buduća istraživanja njihova utjecaja na arhitekturu korijena u solnom stresu te potencijalno dobri kandidati za stvaranje genetički modificiranih biljaka s većom otpornošću na salinizaciju tla.

## 7. LITERATURA

Barbez, E., Dünser, K., Gaidora, A., Lendl, T. i Busch, W. (2017). Auxin steers root cell expansion via apoplastic pH regulation in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(24), 4884-4893.

Bartel, B i Fink, G. (1995). ILR1, an amidohydrolase that releases active indole-3-acetic acid from conjugates. *Science*, 268(5218), 1745–1748.

Boyes, D. C., Zayed, A. M., Ascenzi, R., McCaskill, A. J., Hoffman, N. E., Davis, K. R. i Gorlach, J. (2001). Growth stage–based phenotypic analysis of *Arabidopsis*: a model for high throughput functional genomics in plants. *The Plant Cell*, 13(7), 1499-1510.

Cajero-Sanchez, W., Aceves-Garcia, P., Fernández-Marcos, M., Gutiérrez, C., Rosas, U., García-Ponce, B., Álvarez-Buylla, E.R., Sánchez, M.d.l.P. i Garay-Arroyo (2019). Natural root cellular variation in responses to osmotic stress in *arabidopsis thaliana* accessions. *Genes*, 10(12), 983.

Cao, X., Yang, H., Shang, C., Ma, S., Liu, L. i Cheng, J. (2019). The roles of auxin biosynthesis YUCCA gene family in plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(24), 6343.

Casanova-Sáez, R. i Voß, U. (2019). Auxin metabolism controls developmental decisions in land plants. *Trends in Plant Science*, 24(8), 741-754.

Clark, N. M., de Luis Balaguer, M. A. i Sozzani, R. (2014). Experimental data and computational modeling link auxin gradient and development in the *Arabidopsis* root. *Frontiers in Plant Science*, 5, 328.

Murashige, T. i Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15, 473-497.

Damodaran, S. i Strader, L. C. (2019). Indole 3-butyric acid metabolism and transport in *Arabidopsis thaliana*. *Frontiers in Plant Science*, 10, 851.

Darwin, C. i Darwin, F. (1896). *The power of movement in plants*. D. Appleton.

Davies, R. T., Goetz, D. H., Lasswell, J., Anderson, M. N. i Bartel, B. (1999). IAR3 encodes an auxin conjugate hydrolase from *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 11(3), 365-376.

Dhurvas Chandrasekaran, D. (2015). High-resolution NMR structure and functional studies of the oligomerization domain of PsIAA4, an auxin-inducible transcriptional repressor from pea (*Pisum sativum*) (Doktorska dizertacija, Halle (Saale), Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Diss.).



- Enders, T. A. i Strader, L. C. (2015). Auxin activity: Past, present, and future. *American Journal of Botany*, 102(2), 180-196.
- Finet, C. i Jaillais, Y. (2012). Auxology: when auxin meets plant evo-devo. *Developmental Biology*, 369(1), 19-31.
- Hayashi, K., Arai, K., Aoi, Y., Tanaka, Y., Hira, H., Guo, R., Hu, Y., Ge, C., Zhao, Y., Kasahara, H. i Fukui, K. (2021). The main oxidative inactivation pathway of the plant hormone auxin. *Nature Communications*, 12(1), 1-11.
- Junghans, U., Polle, A., Düchting, P., Weiler, E., Kuhlman, B., Gruber, F. i Teichmann, T. (2006). Adaptation to high salinity in poplar involves changes in xylem anatomy and auxin physiology. *Plant, Cell & Environment*, 29(8), 1519-1531.
- Kasahara, H. (2016). Current aspects of auxin biosynthesis in plants. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 80(1), 34-42.
- Kim, Y. S., Min, J. K., Kim, D. i Jung, J. (2001). A soluble auxin-binding protein, ABP57: Purification with anti-bovine serum albumin antibody and characterization of its mechanistic role in the auxin effect on plant plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase. *Journal of Biological Chemistry*, 276(14), 10730–10736.
- Kinoshita, N., Wang, H., Kasahara, H., Liu, J., Macpherson, C., Machida, Y., Kamiya, Y., Hannah, M.A. i Chua, N.H. (2012). IAA-Ala Resistant3, an evolutionarily conserved target of miR167, mediates Arabidopsis root architecture changes during high osmotic stress. *The Plant Cell*, 24(9), 3590-3602.
- Koevoets, I. T., Venema, J. H., Elzenga, J. T. M. i Testerink, C. (2016). Roots withstanding their environment: exploiting root system architecture responses to abiotic stress to improve crop tolerance. *Frontiers in Plant Science*, 7, 1335.
- Korasick, D. A., Enders, T. A. i Strader, L. C. (2013). Auxin biosynthesis and storage forms. *Journal of Experimental Botany*, 64(9), 2541-2555.
- Korver, R. A., Koevoets, I. T. i Testerink, C. (2018). Out of shape during stress: a key role for auxin. *Trends in Plant Science*, 23(9), 783-793.
- Kotak, S., Larkindale, J., Lee, U., von Koskull-Döring, P., Vierling, E. i Scharf, K. D. (2007). Complexity of the heat stress response in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 10(3), 310-316.
- LeClere, S., Tellez, R., Rampey, R. A., Matsuda, S. P. i Bartel, B. (2002). Characterization of a family of IAA-amino acid conjugate hydrolases from Arabidopsis. *Journal of Biological Chemistry*, 277(23), 20446-20452.

Li, N., Euring, D., Cha, J. Y., Lin, Z., Lu, M., Huang, L. J. i Kim, W. Y. (2021). Plant hormone-mediated regulation of heat tolerance in response to global climate change. *Frontiers in Plant Science*, *11*, 627969.

Livak, K. J. i Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. *Methods*, *25*(4), 402-408.

Lu, H. P., Wang, J. J., Wang, M. J. i Liu, J. X. (2021). Roles of plant hormones in thermomorphogenesis. *Stress Biology*, *1*(1), 1-10.

Ludwig-Muller, J. (2011). Auxin conjugates: their role for plant development and in the evolution of land plants. *Journal of Experimental Botany*, *62*(6), 1757–1773.

Ljung, K. (2013). Auxin metabolism and homeostasis during plant development. *Development*, *140*(5), 943-950.

Mano, Y. i Nemoto, K. (2012). The pathway of auxin biosynthesis in plants. *Journal of Experimental Botany*, *63*(8), 2853-2872.

Marchant, A., Bhalerao, R., Casimiro, I., Eklöf, J., Casero, P. J., Bennett, M. i Sandberg, G. (2002). AUX1 promotes lateral root formation by facilitating indole-3-acetic acid distribution between sink and source tissues in the Arabidopsis seedling. *The Plant Cell*, *14*(3), 589-597.

Michalczyk, L., Ribnicky, D. M., Cooke, T. J. i Cohen, J. D. (1992) Regulation of indole-3- acetic acid biosynthetic pathways in carrot cell cultures. *Plant Physiology*, *100*(3), 1346– 1353.

Michniewicz, M., Brewer, P. B. i Friml, J. (2007). Polar auxin transport and asymmetric auxin distribution. *The Arabidopsis Book/American Society of Plant Biologists*, *5*.

Morffy, N. i Strader, L. C. (2020). Old Town Roads: routes of auxin biosynthesis across kingdoms. *Current Opinion in Plant Biology*, *55*, 21-27.

Moriya, Hisao. "Quantitative nature of overexpression experiments." *Molecular Biology of the Cell* *26*.22 (2015): 3932-3939.

Naser, V. i Shani, E. (2016). Auxin response under osmotic stress. *Plant Molecular Biology*, *91*(6), 661-672.

Overvoorde, P., Fukaki, H. i Beeckman, T. (2010). Auxin control of root development. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *2*(6), a001537.

Park, J. E., Park, J. Y., Kim, Y. S., Staswick, P. E., Jeon, J., Yun, J., Kim, S. Y., Kim, J., Lee, Y. H. i Park, C. M. (2007). GH3-mediated auxin homeostasis links growth regulation with stress adaptation response in Arabidopsis. *Journal of Biological Chemistry*, *282*(13), 10036-10046.

Rampey, R. A., LeClere, S., Kowalczyk, M., Ljung, K., Sandberg, G. i Bartel, B. (2004). A family of auxin-conjugate hydrolases that contributes to free indole-3-acetic acid levels during Arabidopsis germination. *Plant Physiology*, 135(2), 978-988.

Rosquete, M. R., Barbez, E. i Kleine-Vehn, J. (2012). Cellular auxin homeostasis: gatekeeping is housekeeping. *Molecular Plant*, 5(4), 772-786.

Rowe, J. H., Topping, J. F., Liu, J. i Lindsey, K. (2016). Abscisic acid regulates root growth under osmotic stress conditions via an interacting hormonal network with cytokinin, ethylene and auxin. *New Phytologist*, 211(1), 225-239.

Salopek-Sondi, B., Pavlović, I., Smolko, A. i Šamec, D. (2017). Auxin as a mediator of abiotic stress responses. *Mechanism of Plant Hormone Signaling under Stress*, 1, 1-36.

Sanchez Carranza, A. P., Singh, A., Steinberger, K., Panigrahi, K., Palme, K., Dovzhenko, A. i Dal Bosco, C. (2016). Hydrolases of the ILR1-like family of Arabidopsis thaliana modulate auxin response by regulating auxin homeostasis in the endoplasmic reticulum. *Scientific Reports*, 6(1), 1-11.

Schneider, C. A., Rasband, W. S. i Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 671–675.

Schwaber, J., Andersen, S. i Nielsen, L. (2019). Shedding light: the importance of reverse transcription efficiency standards in data interpretation. *Biomolecular Detection and Quantification*, 17, 100077.

Simon, S. i Petrášek, J. (2011). Why plants need more than one type of auxin. *Plant Science*, 180(3), 454-460.

Smolko, A., Bauer, N., Pavlović, I., Pěňčík, A., Novák, O. i Salopek-Sondi, B. (2021). Altered root growth, auxin metabolism and distribution in Arabidopsis thaliana exposed to salt and osmotic stress. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(15), 7993.

Svec, D., Tichopad, A., Novosadova, V., Pfaffl, M. W. i Kubista, M. (2015). How good is a PCR efficiency estimate: Recommendations for precise and robust qPCR efficiency assessments. *Biomolecular Detection and Quantification*, 3, 9-16.

Taiz, L., Zeiger, E., Møller, I. M. i Murphy, A. (2015). *Plant physiology and development* (No. Ed. 6). Sinauer Associates Incorporated.

Udvardi, M. K., Czechowski, T. i Scheible, W. R. (2008). Eleven golden rules of quantitative RT-PCR. *The Plant Cell*, 20(7), 1736-1737.

Upadhyaya, H., Sahoo, L. i Panda, S. K. (2013). Molecular physiology of osmotic stress in plants. *In Molecular Stress Physiology of Plants*, Springer, India, 179-192.

Včelařová, L., Skalický, V., Chamrád, I., Lenobel, R., Kubeš, M. F., Pěňčík, A. i Novák, O. (2021). Auxin metabolome profiling in the Arabidopsis endoplasmic reticulum using an optimised organelle isolation protocol. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(17), 9370.

Woodward, A. W. i Bartel, B. (2005). Auxin: regulation, action, and interaction. *Annals of botany*, 95(5), 707-735.

Xiong, L. i Zhu, J. K. (2002). Molecular and genetic aspects of plant responses to osmotic stress. *Plant, Cell & Environment*, 25(2), 131-139.

Yang, Y., Xu, R., Ma, C. J., Vlot, A. C., Klessig, D. F. i Pichersky, E. (2008). Inactive methyl indole-3-acetic acid ester can be hydrolyzed and activated by several esterases belonging to the At MES esterase family of Arabidopsis. *Plant physiology*, 147(3), 1034-1045.

Zhang, T., Poudel, A. N., Jewell, J. B., Kitaoka, N., Staswick, P., Matsuura, H. i Koo, A. J. (2016). Hormone crosstalk in wound stress response: wound-inducible amidohydrolases can simultaneously regulate jasmonate and auxin homeostasis in Arabidopsis thaliana. *Journal of Experimental Botany*, 67(7), 2107-2120.

Zhao, J., Lu, Z., Wang, L. i Jin, B. (2020). Plant responses to heat stress: physiology, transcription, noncoding RNAs, and epigenetics. *International journal of Molecular Sciences*, 22(1), 117.

Zhao, S., Zhang, Q., Liu, M., Zhou, H., Ma, C. i Wang, P. (2021). Regulation of plant responses to salt stress. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(9), 4609.

Zhao, Y. (2010). Auxin biosynthesis and its role in plant development. *Annual Review of Plant Biology*, 61, 49.

Zhao, Y. (2012). Auxin biosynthesis: a simple two-step pathway converts tryptophan to indole-3-acetic acid in plants. *Molecular Plant*, 5(2), 334-338.

*MagMAX plant RNA Isolation Kit - ThermoFisher Scientific* (2016). Pristupljeno 16. studenog 2021., na [https://assets.fishersci.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0016311\\_MagMAX\\_PlantRNA\\_Isol\\_UG.pdf?\\_ga=2.13836279.1117384871.1633878624-1896419659.1633878624](https://assets.fishersci.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0016311_MagMAX_PlantRNA_Isol_UG.pdf?_ga=2.13836279.1117384871.1633878624-1896419659.1633878624)

Matlock, B. (2015). *Assessment of nucleic acid purity*. Pristupljeno 20. Lipnja 2022., na <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CAD/Product-Bulletins/TN52646-E-0215M-NucleicAcid.pdf>

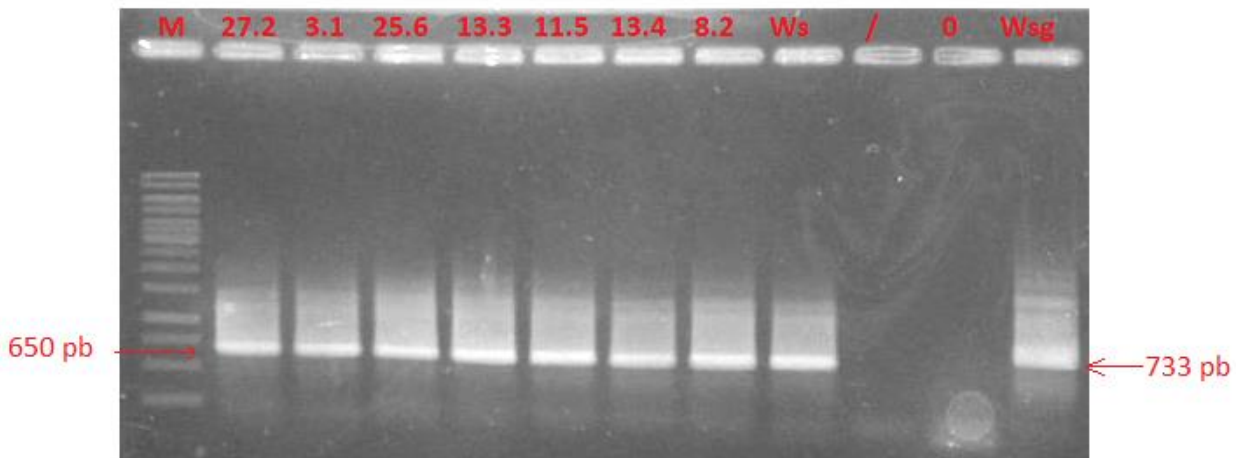
## 8. ŽIVOTOPIS

Rođen sam u Rijeci 1996. godine, gdje sam završio Osnovnu školu Trsat, pripremni program za klavir Glazbene škole Ivan Matetić Ronjgov Rijeka i Gimnaziju Andrije Mohorovičića Rijeka. 2014. godine upisao sam preddiplomski studij biologije mora na Sveučilišnom odjelu za studije mora Sveučilišta u Splitu gdje sam završio prvu godinu studija. 2015. godine studij sam nastavio na preddiplomskom studiju molekularne biologije, Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Nakon preddiplomskog studija, nastavio sam s obrazovanjem na diplomskom studiju molekularne biologije na istom fakultetu. U akademskoj godini 2020/21 bio sam na erasmus razmjeni studenata na Sveučilištu u Gironi, Španjolska, gdje sam odslušao i položio ispite jednog semestra. Tijekom studija, odradio sam nekoliko laboratorijskih stručnih praksi, na Zoologijskom zavodu Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, u Laboratoriju za molekularnu genetiku na Institutu Ruđer Bošković i u Laboratoriju za mineralizirana tkiva na Medicinskom fakultetu sveučilišta u Zagrebu.

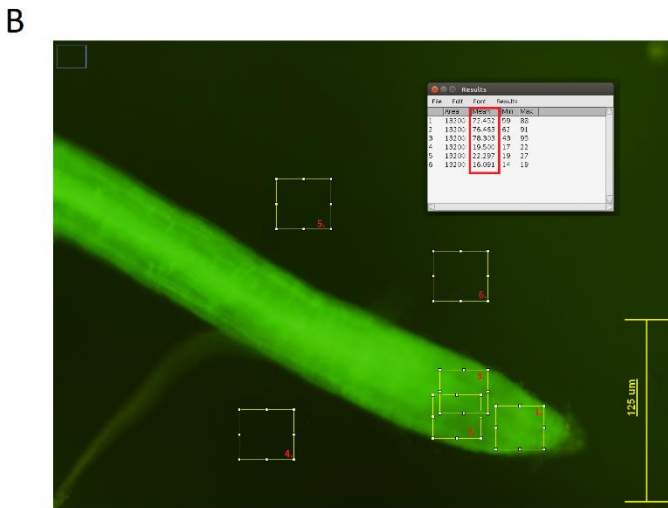
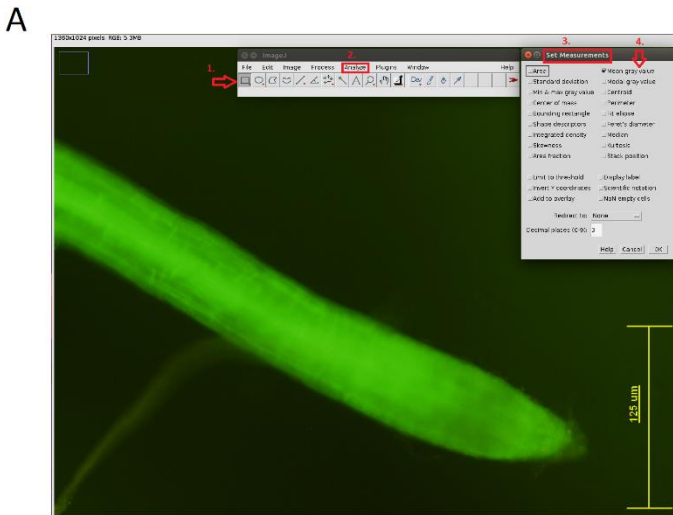
## 9. PRILOZI

Prilog 1. Rezultati mjerenja koncentracije i čistoće (omjer  $A_{260/280}$  i  $A_{260/230}$ ) izolirane ukupne RNA za dvije nezavisne replike (R1 i R2) iz uzoraka biljaka divljeg tipa (WS) nadekspresora (*ILR1 13.3*, *ILR1 3.1*, *ILL2 25.6*, *ILL2 27.2*, *ILL2 8.2*, *IAR3 11.5* te *IAR3 13.4*) vrste *A. thaliana*, ekotipa Wassilewskija.

Naziv linije	Koncentracija (ng/ $\mu$ L)	$A_{260/280}$	$A_{260/230}$
<i>IAR3 11.9 R1</i>	292.4	2.18	2.32
<i>IAR3 11.9 R2</i>	180.7	2.16	2.10
<i>IAR3 13.4 R1</i>	273.7	2.14	2.30
<i>IAR3 13.4 R2</i>	190.7	2.14	2.35
<i>ILL2 25.6 R1</i>	165.7	2.17	2.37
<i>ILL2 25.6 R2</i>	170.8	2.14	2.11
<i>ILL2 27.2 R1</i>	287.7	2.18	2.33
<i>ILL2 27.2 R2</i>	110.1	2.14	2.07
<i>ILL2 8.2 R1</i>	305.1	2.17	2.33
<i>ILL2 8.2 R2</i>	120.8	2.14	2.36
<i>ILR1 13.3 R1</i>	170.5	2.18	2.25
<i>ILR1 13.3 R2</i>	98.4	2.13	2.31
<i>ILR1 3.1 R1</i>	260.2	2.16	2.3
<i>Ws R1</i>	255.6	2.17	2.33
<i>Ws R2</i>	105.0	2.15	2.33



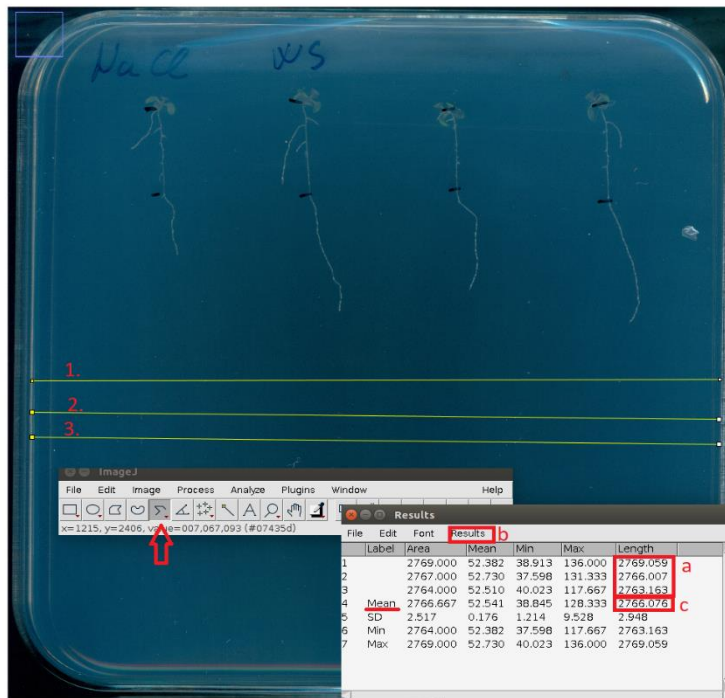
Prilog 2. Umnažanje fragmenata gena *ACT3* metodom PCR. Kao kalup za umnažanje korišteni su uzorci cDNA dobivenih iz izolata ukupne RNA nadekspresorskih biljaka *A. thaliana*, ekotipa Wassilewskija, *IAR3 11.5 (11.5)*, *IAR3 13.4 (13.4)*, *ILL2 27.2 (27.2)*, *ILL2 25.6 (25.6)*, *ILL2 8.2 (8.2)*, *ILR1 13.3 (13.3)*, dH<sub>2</sub>O je negativna kontrola (0), a genomska DNA biljke *A. thaliana*, ekotip Wassilewskija (*Wsg*) pozitivna kontrola. Kao marker (M) za određivanje veličine umnoženih fragmenata gena *ACT3* korišten je GeneRuler 1kb DNA ladder, 0.5 μg/μL; ThermoScientific.



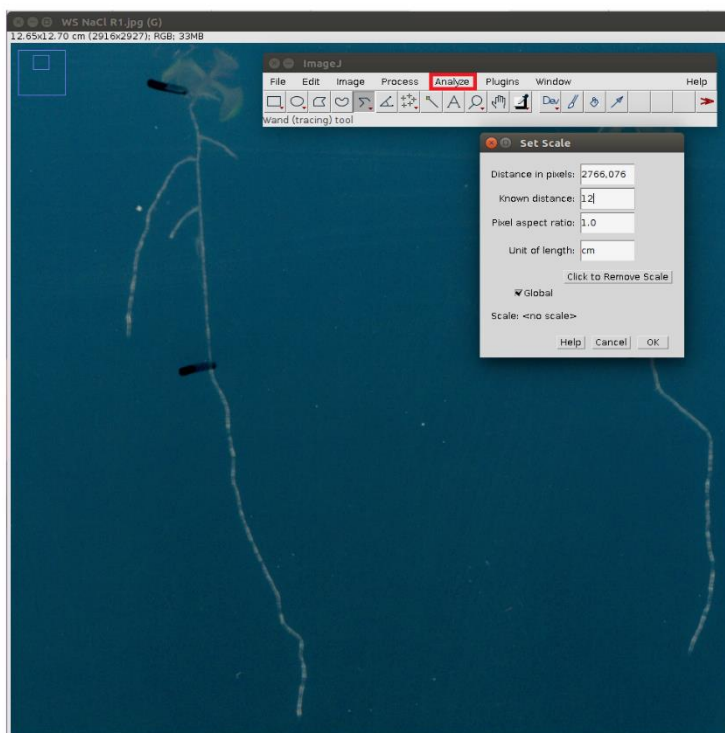
Prilog 3. Postupak mjerenja intenziteta fluorescencije u vršku korijena i zoni diferencijacije. Na slici A prikazan je postupak podešavanja programa *ImageJ* za mjerenje intenziteta fluorescencije. Najprije sam odabrao opciju *rectangle* (na slici označno s 1.) te sam zatim klikom na opciju *analyze* (2.) u padajućem izborniku odabrao opciju *set measurements*, nakon čega se otvorio izbornik prikazan na slici (3.). U izborniku *set measurements* (3.) odabrao sam samo opciju *mean gray value* (4.). Na slici B i C prikazan je postupak mjerenja intenziteta fluorescencije u vršku korijena i zoni diferencijacije. Prvo sam žutim pravokutnikom (opcija *rectangle*) označio površinu u vršku korijena (B) ili u zoni diferencijacije (C) (1.) nakon čega sam na tipkovnici pritisnuo tipku *m* kojom su se rezultati zabilježili (označeno crvenim pravokutnikom). Nakon toga sam žuti pravokutnik potezom pokazivača premjestio na još dva mjesta u području korijena (2. i 3.) i još tri puta u području pozadine. Nakon svakog premještanja žutog pravokutnika sam zabilježio intenzitet fluorescencije tipkom *m*.



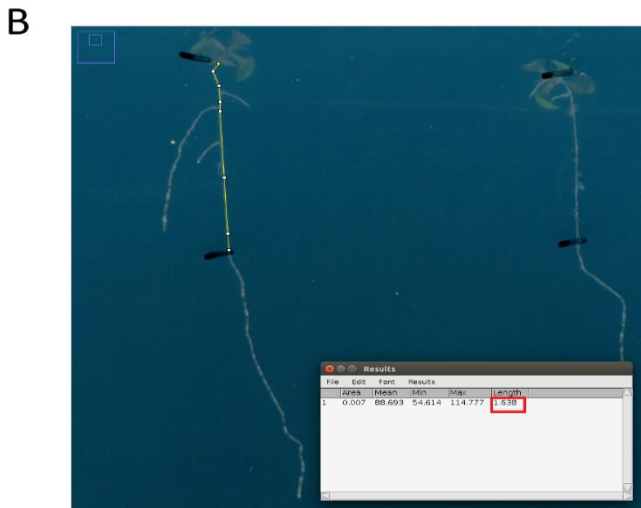
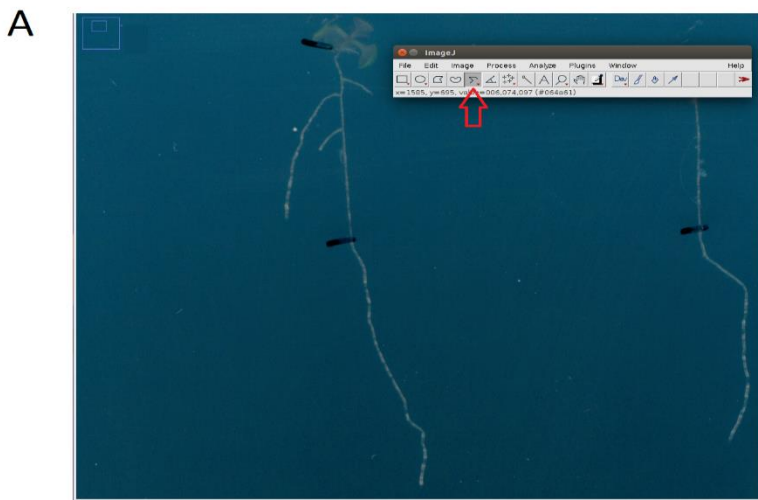
A



B



Prilog 4. Na slikama A i B prikazan je postupak kalibriranja programa *ImageJ* za mjerenje duljine primarnog korijena. (A) Najprije sam odabrao opciju *straight line* te sam povukao tri ravne crte od jednog pa do drugog kraja petrijeve zdjelice (12 cm). Nakon svakog povlačenja crte se na tipkovnici pritisne tipka *m* kako bi se zabilježio broj piksela u crti (rezultati mjerenja duljine crta su označeni slovom *a*). Zatim sam u prozoru s rezultatima odabrao opciju *results* (b) čime sam dobio srednju vrijednost rezultata mjerenja (c). (B) Zatim sam odabrao opciju *analyze* (označena crvenim pravokutnikom) pod kojom sam odabrao opciju *set scale* te se otvorio padajući izbornik. U padajućem izborniku sam pod opcijom *Distance in pixels* upisao srednju vrijednost piksela tri ravne crte (opisanom pod A), pod *known distance* sam upisao širinu kvadratne petrijeve zdjelice (12), a pod *Unit of length* sam upisao *cm*. Također, ukoliko se odabere opcija *global*, program ostaje kalibriran za svaku slijedeću učitane fotografiju, a ako ne, onda se postupak kalibracije mora ponavljati za svaku učitane fotografiju.



Prilog 5. Postupak mjerenja duljine primarnog korijena u kalibriranom programu *ImageJ*. (A) Prvo sam u izborniku odabrao opciju *segmented line* (označeno crvenom strijelicom). (B) Zatim sam desnim klikom miša kliknuo na početak korijena te povukao žutu liniju do prvog “zavoja” korijena gdje sam ponovno kliknuo lijevom klikom miša, čime se označi nova točka, te nastavio povlačiti žutu crtu. Na taj način sam žutu crtu povlačio do donje crne oznake, koja predstavlja mjesto do kojeg se korijen protezao pri nasađivanju biljke na stresni medij, te sam zadnji put kliknuo desnim klikom miša, čime se prekine označavanje. Zatim sam zabilježio rezultate pritiskom na tipku *m* na tipkovnici (rezultat u centimetrima označen crvenim pravokutnikom). (C) Isti postupak ponovio sam još jednom, no ovoga puta ne do crne oznake, već do kraja korijena.