

Utjecaj povišene temperature i osmotskog stresa na kultivare raštike (*Brassica oleracea* L. var. *acephala*)

Talanga Vasari, Ana Izabela

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:963862>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-05-02**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Ana Izabela Talanga Vasari

Utjecaj povišene temperature i osmotskog stresa na
kultivare raštike
(*Brassica oleracea* L. var. *acephala*)

Diplomski rad

Zagreb, 2022.

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Ana Izabela Talanga Vasari

The influence of elevated temperature and osmotic
stress on cultivars of kale
(*Brassica oleracea* L. var. *acephala*)

Master Thesis

Zagreb, 2022.

Ovaj rad izrađen je na Zavodu za molekularnu biologiju i Botaničkom zavodu Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, te na Zavodu za molekularnu biologiju Instituta Ruđer Bošković. Rađen je pod vodstvom prof. dr. sc. Mirte Tkalec i izv. prof. dr. sc. Nataše Bauer, te u sklopu projekta „Agrobioraznolikost – osnova za prilagodbu i ublažavanje posljedica klimatskih promjena u poljoprivredi – Operativni program Konkurentnost i kohezija 2014. – 2020“. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistre molekularne biologije.

ZAHVALA

Zahvaljujem se prof. dr. sc. Mirti Tkalec i izv. prof. dr. sc. Nataši Bauer na strpljenju, savjetima i svom znanju koje su mi prenijele tokom izrade ovoga diplomskoga rada. Također zahvaljujem i dr. sc. Branki Salopek Sondi sa Instituta Ruđer Bošković pod čijem vodstvom sam obavila uzgoj i tretiranje beskrajnoga broja malenih raštika. Uistinu sam mnogo naučila! Nadam se da ću dobro iskoristiti stečeno znanje u budućnosti.

Vrlo sam zahvalna i svome laptopu što se nije pokvario i postojanju određene internetske stranice za pristup znanstvenim radovima bez koje bi studij poput ovoga u današnje doba bio jedva moguć.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

Utjecaj povišene temperature i osmotskog stresa na kultivare raštike (*Brassica oleracea* L. var. *acephala*)

Ana Izabela Talanga Vasari

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Globano zagrijavanje i klimatske promjene zahtijevaju selekciju otpornih biljaka koje unatoč temperaturnim ekstremima i sušnim periodima mogu davati dobre prinose. Raštika (*Brassica oleracea* var. *acephala*) je biljka koja odlično uspijeva pri visokim temperaturama i u slanome tlu. U prvom dijelu rada testirana su 33 varijeteta raštike iz različitih dijelova Hrvatske i Hercegovine izlaganjem klijanaca toplinskom stresu (maksimum 38 °C), suši (uz primjenu 0,3 M manitola), te kombinaciji tih stresnih uvjeta. Usporedbom rezultata prirasta korijena, biomase, sadržaja vode i količine prolina odabrana su dva otpornija i dva neotporna kultivara na kojima je u drugom dijelu pokusa mjerena brza fluorescencija klorofila *a* (metoda OJIP), sadržaj vodikova peroksida, stupanj lipidne peroksidacije i aktivnost katalaze. Zatim je napravljena imunodetekcija proteina HSP70, HSP90 i Rubisco, te je analizirana ekspresija gena *NAC041* i *NAC084*. Pronađeno je da u svim kultivarima raštike osmotski stres uzrokuje veće morfološke promjene klijanaca, veću akumulaciju prolina i veća oksidativna oštećenja nego povišena temperatura. Usporedbom otpornih i manje otpornih kultivara utvrđeno je da otporni prilikom izlaganja osmotskom i toplinskom stresu imaju bolju sposobnost očuvanja fotosintetske učinkovitosti, te da dolazi do povećanja količine proteina HSP70, HSP90 i Rubisco. Kod osjetljivog kultivara raštike ekspresija gena *NAC041* smanjena je u osmotskom stresu, a ekspresija gena *NAC084* smanjena je primjenom kombinacije toplinskog i osmotskog stresa. Otporan kultivar raštike ne pokazuje statistički značajno odstupanje u ekspresiji gena *NAC041* i *NAC084* između kontrolnog i stresnih tretmana.

(71 stranice, 17 slika, 6 tablica, 56 literaturnih navoda, jezik izvornika: Hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: HSP proteini, katalaza, lipidna peroksidacija, NAC, OJIP, prolin, rast

Voditelj: prof. dr. sc. Mirta Tkalec, izv. prof. dr. sc. Nataša Bauer

Ocjenitelji: prof. dr. sc. Mirta Tkalec
izv. prof. dr. sc. Nataša Bauer
prof. dr. sc. Biljana Balen

Rad prihvaćen: 10.02.2022.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Master Thesis

The influence of elevated temperature and osmotic stress on cultivars of kale (*Brassica oleracea* L. var. *acephala*)

Ana Izabela Talanga Vasari

Rooseveltovej trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Global warming and climate change create an increased demand for the identification of drought and high temperature resistant plants in order to minimize yield loss in crop plants. Kale (*Brassica oleracea* var. *acephala*) is a plant that has shown the ability to grow in high temperature environments and saline soils. In the first part of the experiments 33 varieties of kale from different parts of Croatia and Hercegovina were tested by exposing the seedlings to temperature stress (maximum 38 °C), drought (0,3 M mannitol) and the combination of the two stresses. Root growth, biomass, water and proline content were analyzed and two of the most and least resistant cultivars were chosen for further investigation and comparison. The four kale varieties were exposed to stresses previously described and chlorophyll *a* fluorescence was measured (OJIP method) as well as hydrogen peroxide content, lipid peroxidation and catalase activity. Levels of HSP70, HSP90 and Rubisco protein were estimated after immunodetection and expression analysis was performed for *NAC041* and *NAC084* genes. It was found that osmotic stress caused greater morphological changes, greater proline accumulation and more oxidative damage than high temperature stress. The comparison of sensitive and resistant varieties revealed that when exposed to osmotic and high temperature stress, the resistant varieties are able to maintain better photosystem II functionality and performance and had increased levels of HSP70, HSP90 and Rubisco protein. In the sensitive kale cultivar the expression of the *NAC041* gene was reduced under osmotic stress and the *NAC084* gene under combined high temperature and osmotic stress. The resistant kale cultivar did not show a statistically significant change in *NAC041* and *NAC084* gene expression between control and stress treatments.

(71 pages, 17 figures, 6 tables, 56 references, original in: Croatian)

Thesis is deposited in Central Biological Library.

Keywords: catalase, growth, HSP protein, lipid peroxidation, NAC, OJIP, proline

Supervisors: Prof. Mirta Tkalec, PhD, Assoc. prof. Nataša Bauer, PhD

Reviewers: Prof. Mirta Tkalec, PhD
Assoc. Prof. Nataša Bauer, PhD
Prof. Biljana Balen, PhD

Thesis accepted: 10.02.2022.

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Klimatske promjene.....	1
1.2. Utjecaj toplinskoga stresa na biljke.....	2
1.3. Biljke i osmotski stres.....	4
1.4. Mehanizmi obrane i tolerancije biljaka na povišenu temperaturu i osmotski stres.....	5
1.5. Oksidativni stres.....	9
1.6. Raštika.....	10
2. CILJ ISTRAŽIVANJA.....	12
3. MATERIJALI I METODE.....	13
3.1. Materijali.....	13
3.1.1. Biljni materijali.....	13
3.1.2. Kemikalije.....	14
3.1.3. Puferi, otopine i reagensi.....	15
3.1.3.1. Kiseli ninhidrin.....	15
3.1.3.2. Reagens <i>ferrous oxidation-xylene orange</i> (FOX).....	15
3.1.3.3. Reagens TCA/TBA.....	15
3.1.3.4. Kalij-fosfatni pufer (0,1 M, pH 7,0).....	15
3.1.3.5. Otopina po Bradfordu.....	15
3.2.3.6. Pufer za mjerenje aktivnosti katalaze (KFP).....	16
3.2.3.7. Pufer za denaturaciju proteina po Laemmliju.....	16
3.2.3.8. Otopine za pripremu poliakrilamidnih gelova za mali sustav elektroforeze....	16
3.2.3.9. Elektrodni pufer za SDS-elektroforezu.....	16
3.2.3.10. Pufer za mokri prijenos proteina na membranu.....	16
3.2.3.11. Otopina boje Ponceau rouge.....	16
3.2.3.12. Otopine korištene za imunodetekciju proteina na membrani.....	16
3.2.3.13. Ekstrakcijski pufer za izolaciju DNA (EP).....	17
3.2.3.14. Precipitacijski pufer za izolaciju DNA (PP).....	17
3.2.3.15. Pufer za uklanjanje RNaza (PRE).....	17
3.2.3.16. Pufer TBE.....	17
3.2.3.17. Otopine za izolaciju RNA.....	18
3.1.4. Uređaji.....	18
3.1.5. Računalni programi.....	18

3.2. Metode.....	18
3.2.1. Priprema hranjivih podloga.....	19
3.2.2. Sterilizacija i isključivanje sjemenki.....	19
3.2.3. Izlaganje toplotnom i osmotskom stresu.....	20
3.2.4. Mjerenje prirasta korijena, određivanje svježeg i suhe mase.....	21
3.2.5. Određivanje sadržaja prolina u tkivu.....	22
3.2.6. Mjerenje polifaznog rasta fluorescencije klorofila <i>a</i> i OJIP test.....	22
3.2.7. Sadržaj vodikova peroksida.....	23
3.2.8. Ekstrakcija i mjerenje koncentracije proteina.....	24
3.2.9. Stupanj lipidne peroksidacije.....	25
3.2.10. Mjerenje aktivnosti katalaze.....	25
3.2.11. Imunodetekcija proteina HSP70, HSP 90, Rubisco.....	26
3.2.11.1. Natrij dodecil sulfat - poliakrilamid gel elektroforeza (SDS-PAGE).....	26
3.2.11.2. Prijenos proteina i imunodetekcija proteina na membrani (Western blot)....	27
3.2.12. Izolacija genomske DNA.....	28
3.2.13. Izolacija RNA.....	29
3.2.14. Reverzna transkripcija (RT-PCR)	30
3.2.15. Odabir početnica za lančane reakcije polimerazom (PCR)	30
3.2.16. Lančana reakcija polimerazom (PCR)	31
3.2.17. Elektroforeza na agaroznom gelu.....	31
3.2.18. Lančana reakcija polimerazom u realnom vremenu (qPCR).....	31
3.2.19. Obrada rezultata.....	31
4. REZULTATI.....	33
4.1. Procjena otpornosti kultivara raštike na osmotski i temperaturni stres, te odabir otpornih kultivara.....	33
4.2. Usporedba manje otpornih i otpornih kultivara.....	35
4.2.1. Analiza fluorescencije klorofila – OJIP krivulja i povezani parametri.....	35
4.2.2. Sadržaj vodikova peroksida.....	39
4.2.3. Stupanj lipidne peroksidacije.....	40
4.2.4. Aktivnost katalaze.....	41
4.2.5. Imunodetekcija proteina na membrani.....	42
4.2.6. Izolacija nukleinskih kiselina.....	46
4.2.7. Početnica za gene <i>OGIO</i> , <i>PUX</i> , <i>ACT7</i> , <i>NAC041</i> i <i>NAC084</i> iz kineskog kupusa vežu se na gene raštike.....	48

4.2.8. Kvantitativna ekspresije gena <i>NAC041</i> i <i>NAC084</i>	50
5. RASPRAVA.....	53
6. ZAKLJUČAK.....	64
7. LITERATURA.....	65
8. ŽIVOTOPIS.....	71

1. UVOD

1.1. Klimatske promjene

Globalno zagrijavanje je proces koji se neizbježno odvija već desetljećima, a ovisno o modifikaciji ljudskih aktivnosti može se usporiti ili čak ubrzati (Arias i sur., 2021). Zagrijavanje na globalnoj razini je kompleksni proces kojemu pridonosi veliki broj faktora sa različitih komponenata Zemljine sfere, no za biljke jedan od važnijih procesa je zagrijavanje Zemljine površine. Naime povišenje temperature zraka oko Zemljine površine događa se značajno brže od povišenja globalne temperature (45 % više naspram porasta globalne temperature) i sa velikom sigurnošću se može ustvrditi da će se taj proces i nastaviti (Arias i sur., 2021). U zadnjih 70 godina učestalost i trajanje hladnih ekstrema se smanjila, dok se učestalost i trajanje toplinskih udara povećala. Takve promjene imaju različite posljedice ovisno o klimatskoj zoni Zemlje gdje se odvijaju. U Mediteranskoj zoni i kontinentalnoj Europi došlo je do porasta srednje temperature, produljenja vegetacijske sezone i već spomenutih temperaturnih ekstrema (Arias i sur., 2021). Posljedično, biljke tokom svojeg životnog ciklusa bivaju izložene temperaturama izvan optimuma za njihov rast i razvoj, što ovisno o poljoprivrednoj kulturi može drastično smanjiti prinos. U slučaju porasta temperature od samo 3-4 °C može doći do pada produktivnosti usjeva između 15-35% (Bita i Gerats, 2013).

Takvi scenariji uzrokovali bi velike ekonomske i socijalne probleme posebno u zemljama u razvoju sa velikom populacijom koja ovisi o poljoprivrednim djelatnostima. S obzirom na veliku vjerojatnost spomenutih scenarija važno je istražiti otpornost ekonomski važnih biljaka, pronaći otporne kultivare te zainteresirati poljoprivrednike i potrošače za njihovu proizvodnju i konzumaciju. Međutim u prirodi, periodi povišene temperature često dolaze zajedno sa manjkom padalina. Time biljke osim temperaturnom stresu bivaju izložene sušnome stresu. Kombinirani efekti povišene temperature i suše imaju mnogo teži utjecaj na vodni status biljke nego svaki zasebno (Hasanuzzaman i sur., 2013).

Salinitet tla, kao jedan od faktora koji uzrokuju osmotski stres, je rezultat prirodnih procesa u kojemu slane podzemne vode kapilarnošću bivaju povučene na površinu. Voda zatim na površini isparava, no sol zaostaje u tlu. Ovaj proces vrlo je izražen u suhim područjima gdje nema dovoljno padalina koje bi ispirale soli iz tla. Smatra se kako je 10% obradivoga tla pogođeno problemom prevelike količine soli (Corwin i Scudiero, 2019), a taj postotak bi mogao rasti uslijed globalnih klimatskih promjena koje remete količine padalina. Predviđeno je da će

uslijed globalnoga zagrijavanja doći do smanjenja padalina u Mediteranskoj regiji (između ostaloga) čime bi došlo i do poremećaja pri uzgoju usjeva u toj regiji.

Smanjenje prinosa nije izolirana posljedica zagrijavanja atmosfere i Zemljine površine. Prilagodba novonastalim uvjetima povlači sa sobom niz promjena koje se moraju provesti i koje dovode do pogoršanja utjecaja poljoprivrede na atmosferu. Naime u pokušaju spašavanja prinosa poljoprivredne kulture povećava se upotreba gnojiva što doprinosi daljnjem povećanju emisije stakleničkih plinova (Clark i sur., 2020). Također dolazi do širenja poljoprivrednih površina koje se intenzivno obrađuju i to nauštrb divljih staništa. Veliki broj poljoprivrednih kultura diljem svijeta već se uzgajaju u uvjetima koji su blizu maksimuma njihove tolerancije (Zampieri i sur., 2017), na primjer procjenjuje se da je do 40% godišnjih fluktuacija u prinosu pšenice uzrokovano toplinskim stresom (Zampieri i sur., 2017). Da bi se odabrale biljke povoljnoga fenotipa za uzgoj na povišenim temperaturama potrebno je poznavati temeljne fiziološke i molekularne procese kojima se biljka prilagođava povišenoj temperaturi.

1.2. Utjecaj toplinskoga stresa na biljke

Toplinski stres u biljkama uzrokovan je kada temperatura okoliša biljke naraste iznad optimalne, te ostane takva dovoljno dugo da uzrokuje ireverzibilna oštećenja biljke (Hasanuzzaman i sur., 2013). Povišenjem temperature dolazi do molekularnih, staničnih i fizioloških promjena unutar biljke.

Izlaganjem biljaka povišenoj temperaturi listovi im poprimaju spaljeni izgled sličan oštećenjima od sunca, gube boju, suše se i prestaju rasti. Slične ozljede pojavljuju se i na ostatku biljke te plodovima. Biljke pokazuju izvjesnu fenotipsku fleksibilnost u uvjetima toplinskoga stresa pa tako biljke uzgojene na povišenoj temperaturi budu nižega rasta, imaju veći promjer ksilemskih elemenata, i dulji korijen (Hassan i sur., 2020).

Toplinski stres različito utječe na biljke ovisno o stadiju razvoja cijele biljke ili pojedinačnih organa. Poremećaji u hormonalnoj signalizaciji rezultiraju visokom osjetljivošću biljke tijekom cvatnje i to posebno muških dijelova cvijeta pa kod biljaka koje rastu u toplinskom stresu često dolazi do muške sterilnosti (Bita i Gerats, 2013). Primijećeno je da klijanci pojačanim kolanjem vode mogu sniziti vlastitu temperaturu do 30 °C (Hasanuzzaman i sur., 2013), no izlaganje biljke povišenoj temperaturi ipak uzrokuje stresni odgovor, čak i kada ima dovoljno vode. Listovi različite starosti pokazuju drugačiju toleranciju na toplinski stres. Mladi listovi vrste *Coffea arabica* podvrgnuti 90 minutnom toplinskom stresu značajno su se sporije oporavili nego zreli listovi biljke. Sporiji oporavak podrazumijeva teži oporavak

fotosintetskog aparata, smanjeni sadržaj strukturalnih ugljikohidrata i smanjenu provodljivost puči. Sve nabrojano predstavlja veliki problem rastućoj biljci, a na primjeru vrste *C. arabica* koja čini 65% globalne produkcije kave, to predstavlja veliki problem i ekonomiji (Marias i sur., 2017).

Stanična membrana rastom temperature postaje fluidnija što mijenja biokemijske procese koji se odvijaju vezano iz nju. Unutar kloroplasta tilakoidne membrane gube svoju uređenost, napuhuju se, te može doći do curenja iona (Bita i Gerats, 2013). Takvi poremećaji u ionskom stanju sa obje strane membrane dovode do promjene u transportu preko membrane, kako elektronskog transportnog lanca u kloroplastima i mitohondrijima, pa tako i ukupnoga naboja potrebnoga za kretanje raznih iona preko membrana.

Smanjeno kolanje vode unutar biljke pod uvjetima toplinskoga stresa uzrokuje pad turgora u stanicama. To kao posljedicu ima hidropasivno zatvaranje puči, no one se mogu zatvoriti i uz signal hormona apscizinske kiseline (ABA). Zatvaranje puči sprječava gubitak vode transpiracijom, no u isto vrijeme onemogućava izmjenu plinova od kojih je najvažniji CO₂ potreban za fotosintezu što uzrokuje smanjenje rasta. Na staničnoj razini nedostatak CO₂ u blizini Rubisca povećava njegovu oksigenaznu aktivnost. To dovodi do pada stope fotosinteze i porasta fotorespiracije, što znači da manje ugljikova dioksida biva fiksirano, dok daljnjim porastom temperature dolazi do potpune inaktivacije enzima Rubisco i njegovog pomoćnog enzima rubisco aktivaze (Hasanuzzaman i sur., 2013). Također dolazi i do porasta aktivnosti klorofilaze koja razlaže klorofil što dalje onemogućava fotosintezu i stvaranje energije, a to opet utječe na smanjenje fiksacije ugljikova dioksida. Smanjenje fiksacije ugljika potrebnoga za metabolizam i rast dovodi do toga da se biljka „izgladnjuje“. Kako bi se to spriječilo neke C₃ biljke imaju opciju indukcije CAM (*Crassulacean acid metabolism*). To se postiže povećanom ekspresijom enzima toga puta fosfoenol piruval karboksilaze (PEP) na transkripcijskoj i posttranslacijskoj razini, zatim NADP malatnoga enzima i drugih (Zhu i sur., 2007).

U kloroplastima, na tilakoidnim membranama, fotosistemi i lanac prijenosa elektrona vrlo su osjetljivi na povišenu temperaturu. Fotosistem II je heterogeni kompleks velikoga broja proteina i antena sa pigmentima, te porastom temperature i dovođenjem reakcijskoga centra do zasićenja dolazi do inhibicije reakcijskog centra i oštećenja proteina koji formiraju taj dio kompleksa, D1 i D2 (Fahad i sur., 2017). Još jedna podjedinica fotosistema II vrlo je podložna visokoj temperaturi a to je manganov kompleks, gdje dolazi do oksidacije vode. Odvajanje i

toga kompleksa dovodi do disbalansa u toku elektrona na akceptorskoj strani fotosistema II (Fahad i sur., 2017).

Fotosistem II i pripadajuće antene nakon apsorpcije energije dio koriste za fotokemijske reakcije ali jedan dio energije biva izgubljen u obliku fluorescencije i topline. U stresnim uvjetima radi poremećaja niza faktora dolazi do povećane potrebe za tim alternativnim putevima disipacije energije koja se ne može iskoristiti za fotokemijske reakcije što dovodi do povećanja fluorescencije. Mjerenje fluorescencije je jedna neinvazivna metoda koja nam daje sliku o energetsom stanju fotosistema, a preko toga i fiziološkom stanju biljke. Smatra se da fluorescencija uglavnom potječe od fotosistema II. Držanjem biljke u mraku dolazi do potpune oksidacije primarnoga kinonskog receptora (Q_A), a mjerenje počinje kada se takve biljke iz tame naglo izlože kratkotrajnom svijetlu visokoga intenziteta. Indukcijom fluorescencije u tamno adaptiranim biljkama dobiva se karakteristična krivulja (tzv. Kautskyjeva krivulja). Ona opisuje inicijalni porast fluorescencije do kojega dolazi nakon izlaganja svijetlu, ali prije pokretanja nizvodnih reakcija fotosinteze pri čemu se akumulira reducirani plastokinon. Taj polifazni porast fluorescencije sastoji se od nekoliko koraka (O-J-I-P) koji su rezultat međudjelovanja funkcionalnih jedinica za prijenos elektrona unutar fotosistema II od kojih svaka ima vlastitu kinetiku pri prenošanju energije (Strasser i sur., 2004). Koraci rasta OJIP krivulje prisutni su u svakom do sada mjerenom fotosintetskom organizmu u normalnim uvjetima. Njihov odnos, prisutnost ili odsutnost, te kvantitativne promjene mjerenih parametara vrlo dobro ukazuju na prisutnost stresa (Strasser i sur., 2004).

1.3. Biljke i osmotski stres

Osmotski stres je zapravo vrlo širok pojam za bilo koje uvjete u kojima voda nije dostupna biljci (Zhu i sur., 2007). Može biti uzrokovan s nekoliko čimbenika poput smrzavanja, hladnoće, nedostatka vode u tlu, visokih temperatura ili prevelike koncentracije soli u okolini korijena.

Općenito, salinitet utječe na biljke uzrokujući osmotski i oksidativni stres, a ako se radi o tlu sa mnogo NaCl postoji i toksičan efekt Na^+ iona koji ometaju primanje drugih iona (najviše K^+) preko membrane ili ometaju stanične procese inhibicijom enzima. Moguće je da u tlu ima dovoljno vode, no u isto vrijeme i previše otopljenih tvari tj. soli, koje snizuju vodni potencijal i biljka ne može primati vodu što uzrokuje osmotski stres. Kada se nalazi u takvim uvjetima biljka počinje „venuti“, tj. smanjeno kolanje vode unutar biljke uzrokuje pad turgora u stanicama. Biljke kao odgovor imaju niz morfoloških prilagodbi koje su rezultat dugoročne

izloženosti osmotskome stresu, poput smanjenja površine lista, promjene omjera korijena i izdanka jer korijen raste nauštrb izdanka u „potrazi“ za vodom, dolazi do zadebljanja listova, suberinizacije korijena i stvaranja listova sa dlačicama (Buchanan i sur., 2015).

Niži rast biljke uzrokovan je abnormalnostima u rastu stanica, što je pak uzrokovano gubitkom turgora. Naime turgor je esencijalan za rast biljke stanice, te se prilikom poremećaja opskrbe stanica vodom one ne mogu pravilno elongirati (Hasanuzzaman i sur., 2013).

Pad turgora dovodi do skupljanja stanice što služi kao mehanički podražaj za aktivaciju signalizacije vezane uz dehidraciju. Dolazi do abnormalnoga toka vode i iona preko membrana uzrokujući porast koncentracije nabijenih elemenata u citosolu. Takve nabijene jedinke mijenjaju hidratacijski plašt oko makromolekula što utječe na njihovu konformaciju i smanjuje njihovu funkcionalnost (Xiong i Zhu, 2002). Povećana koncentracija iona ometa enzimatsku aktivnost proteina što dovodi do metaboličkih poremećaja. Kod kukuruza podvrgnutoga osmotskom stresu došlo je do velikoga smanjenja količine pigmenata i svih fenola (Moharramnejad i sur., 2015). Povećana koncentracija nabijenih jedinki također ometa i provod signala, te transport tvari preko membrana. Poremećaj transporta preko membrana i smanjeno kolanje vode unutar biljke stvara probleme prilikom preraspodjele asimilata potrebnih za energiju i rast (Xiong i Zhu, 2002).

1.4. Mehanizmi obrane i tolerancije biljaka na povišenu temperaturu i osmotski stres

Povišena temperatura i osmotski stres imaju višestruke učinke, te se fiziološki, biokemijski i pogotovo genetički mehanizmi odgovora na ove stresove preklapaju. Rast u uvjetima povišene temperature inducira razne promjene u morfologiji biljke, a to su ujedno i mehanizmi tolerancije toga stresnoga uvjeta. Listovi se savijaju i manji su jer s manjom površinom lakše izbjegavaju oštećenja uzrokovana toplinskim stresom. Također mijenjaju poziciju kako bi površinom bili paralelni upadajućim zrakama sunca što smanjuje apsorpciju sunčeva zračenja (Hassan i sur., 2020).

Kod osmotskog stresa rast stanica zaustavlja se djelomično radi čisto mehaničkoga razloga, naime nedostatka turgora koji je nužan za ekspanziju stanica. Uz čisto mehaničko zaustavljanje rasta postoji i dodatni mehanizam induciran signalom ABA. On aktivira protein ICK1 koji zaustavlja stanični ciklus i sprječava daljnje diobe (Xiong i sur., 2002). Vrlo važno je i zatvaranje puči regulirano s ABA uz pomoć vodikovog peroksida i kalcija jer se time sprječava gubitak vode. Gubitak vode, tj. suša zajedno sa toplinskim stresom stvara teža

oštećenja nego toplina uz dovoljno vlage jer biljka može održavati temperaturu transpiracijom (Hasanuzzaman i sur., 2013).

Kod biljaka izloženih povišenoj temperaturi mijenja se aktivnost proteina asociranih uz membranu, i to radi promjene u fluidnosti membrane ali i zbog konformacijskih promjena samih proteina. Smanjeni vodni potencijal stanice, uzrokovan osmotskim stresom također dovodi do narušavanja interakcija između membrane i stanične stijenke te promjena u konformaciji membranskih proteina. Sve to dovodi do promjena u percepciji i prijenosu signala kroz membranu, utječe na organizaciju citoskeleta te dovodi do promjena u diferencijaciji i diobi stanica (Bitá i Gerats, 2013, Hasanuzzaman i sur., 2013) i inducira gene vezane uz sintezu kompatibilnih osmolita, detoksifikaciju reaktivnih oblika kisika (ROS) i proteina vezanih uz ubikvitinacijsku razgradnju oštećenih proteina (Xiong i sur., 2002).

Denaturacija staničnih proteina uslijed toplinskog ali i osmotskog stresa aktivira takozvani odgovor nesmotanih proteina. On utječe na povećanje transkripcije u jezgri i translacije molekularnih šaperona u endoplazmatskom retikulumu i citosolu koji pomažu u održavanju staničnih proteina u aktivnoj konformaciji. Dio tih šaperona naziva se proteini toplinskog stresa (*heat shock proteins*, HSP) iako se javljaju i uslijed drugih stresnih čimbenika. To su molekularni šaperoni koji reguliraju smatanje nativnih proteina, lokalizaciju, akumulaciju i degradaciju proteina, a geni koji ih kodiraju nalaze se u genomima svih eukariota (Swindell i sur., 2007). Količina različitih HSP varira ovisno o organizmu, no općenito se dijele po veličini, tako da postoje klase/grupe: HSP100 (veći od 100 kDa), HSP90 (između 90 i 100 kDa), HSP70, HSP60 i sHSP (veličine 15 – 42 kDa). Svaka grupa HSP-ova ima ponešto drugačiju funkciju i mehanizam djelovanja (Whaibi, 2011). Ekspresija proteina HSP je regulirana nizom signala koji aktiviraju transkripcijske faktore nazvane *heat shock factors* (HSF). Monomerni oblici proteina HSF nalaze se u citosolu, a uslijed signala mogu oligomerizirati, stvarajući najčešće trimere, ući u jezgru i aktivirati transkripciju gena *HSP*. Transkripcijski faktori HSF vežu se za cis-transkripcijske elemente promotora *heat shock element* (HSE).

Specifično za biljke je veliki broj klasa sHSP (Hasanuzzaman i sur., 2013) koji nerijetko djeluju zajedno sa HSP70 grupom šaperona prilikom odgovora na različite stresne čimbenike (Whaibi, 2011). HSP70 je najpoznatija i najviše eksprimirana grupa HSP proteina, a primarno djeluju kao šaperoni novosintetiziranim proteinima, te prilikom izlaganja povišenoj temperaturi dolazi do povećane ekspresije HSP70 u velikom broju vrsta (Whaibi, 2011). HSP90 su također šaperoni asocirani sa odgovorom na toplinski stres, ali i biotički stres tj. imunološki odgovor biljke (Kadota i Shirasu, 2012).

Za uspostavu osmotske ravnoteže stanice akumuliraju kompatibilne osmolite. To su male molekule koje ne ometaju stanični metabolizam i pomažu osmotskoj prilagodbi stanice time što smanjuju vodni potencijal citosola naspram okoline, a to potiče ulazak vode u stanicu. S druge strane održavaju hidratacijski plašt oko staničnih proteina kako ne bi došlo do odmatanja, a za neke se vjeruje da pomažu i u uklanjanju ROS (prolin) (Kavi i Srenivasulu, 2014). Njihova akumulacija može se postići povećanjem sinteze, zatim smanjivanjem razgradnje te tvari ili razgradnjom polimera čiji monomeri služe kao kompatibilni osmoliti (najviše šećeri).

Prolin je jedan od najpoznatijih kompatibilnih osmolita koji se inducira u raznim biljkama kao odgovor na dehidraciju, povišeni salinitet i visoke temperature (Xiong i sur., 2002, Kavi i Srenivasulu, 2014, Zarattini i Forlani, 2014). Homeostaza prolina pridonosi uspješnijem rastu pod dugoročnim stresom tako što se u citosolu i kloroplastima izdanka povećava sinteza, može se i transportirati do korijena gdje se u mitohondrijima odvija razgradnja radi dobivanja energije. Sinteza prolina odvija se na dva načina: iz ornitina uz ornitin-d-aminotransferazu (OAT) ili glutamata uz pirolin-5-karboksilat-sintetazu (P5CS), a zadnji korak sinteze zatim obavlja delta pirolin-5-karboksilat-reduktaza (P5CR). P5CS inducira povišena razina abscizinske kiseline (ABA), suša, salinitet i povišena temperatura, dok povišena temperatura inducira ekspresiju P5CR (Kavi i Srenivasulu, 2014, Zhu i sur., 2007). S druge strane katabolizam prolina obavlja se uz prolin dehidrogenazu (ProDH) koja je negativno regulirana sušom i povišenim salinitetom, te uz grupu S bazičnih transkripcijskih faktora nazvanih *leucine zipper*, neovisno o ABA signalizaciji (Kavi i Srenivasulu, 2014). Konstitutivna ekspresija enzima OAT daje veće razine prolina i biljke koje se bolje nose sa osmotskim stresom. Ekspresija OAT je pod kontrolom transkripcijskog faktora SNAC2 koji pripada obitelji NAC transkripcijskih faktora (Kavi i Srenivasulu, 2014).

NAC proteini su jedna od najvećih obitelji biljnih transkripcijskih faktora, a često su inducirani različitim abiotičkim čimbenicima stresa. Ime su dobili po tri najranije otkrivena proteina: NAM u petunijama, ATAF1/2 i CUC2 u uročnjaku *Arabidopsis thaliana*, gdje je do sada identificirano 117 proteina NAC. Proteini NAC na N-terminalnom kraju sadrže domenu NAC koja veže DNA, sadrži jezgrin lokalizacijski signal, te može sudjelovati u stvaranju homoi i heterodimera sa drugim NAC proteinima. C-terminalni dio proteina NAC je vrlo varijabilna regija i služi za transkripcijsku regulaciju (Shao i sur., 2015). Regulacija ekspresije proteina NAC odvija se na transkripcijskoj razini, a u promotorskoj regiji gena NAC nalaze se na primjer *ABA responsive elements* (ABRE) i *dehydration responsive elements* (DRE). Uz to ekspresija NAC je regulirana na posttranskripcijskoj razini molekulama microRNA, te na

posttranslacijskoj razini ubikvitinacijom, fosforilacijom i proteolizom (Shao i sur., 2015). Osim u odgovoru na stresne čimbenike, NAC transkripcijski faktori zapravo sudjeluju u gotovo svakoj fazi životnoga ciklusa biljke poput razvoja apikalnoga meristema, cvijeta, starenja lista ili formacije sekundarne stanične stijenke (Shao i sur., 2015). U kupusu *Brassica rapa* od 204 identificirana NAC proteina, neki su konstitutivno eksprimirani, neki inducirani u ranim fazama razvoja, a neki u uvjetima raznih abiotičkih stresova (Liu i sur., 2014). U uročnjaku *A. thaliana* je pronađeno da većina gena NAC mijenja ekspresiju uslijed izloženosti salinitetu i povišenoj temperaturi (Puranik i sur., 2012). Genetički modificirana riža sa konstitutivno povećanom ekspresijom proteina NAC pokazala je bolju toleranciju na sušu, no isti ekperiment u uročnjaku *A. thaliana* nije dao jasne rezultate (Puranik i sur., 2012). Transkripcijski faktori NAC reguliraju nizvodne gene vezanjem na NACRS (*NAC recognition sequence*) u promotorima gena vezanih uz transdukciju signala, proteina na putu sinteze osmolita i antioksidativnoga sustava (Shao i sur., 2015, Puranik i sur., 2012). Promotori gena P5CS i P5CR u riži sadrže NAC vezujuće motive, te je overekspresija NAC povećala akumulaciju prolina i toleranciju na sušni, te solni stres u ovoj žitarici (Zarattini i Forlani, 2017).

Za očuvanje strukture proteina osim kompatibilnih osmolita biljka aktivira sintezu proteina *late embryogenesis abundant* (LEA). Suša uzrokuje visoke razine ABA u biljkama što pak inducira ekspresiju gena za adaptaciju i obranu, između ostaloga i proteina LEA. To su mali hidrofilni proteini koji se akumuliraju u svim vegetativnim tkivima kao odgovor na osmotski i toplinski stres, a najčešći su takozvani dehidrini (grupa 2 proteina LEA) (Amara i sur., 2014). Ti proteini spadaju u nativno nesmotane proteine koji tek dehidracijom poprimaju uređeniju strukturu, a štite druge proteine od inaktivacije i agregacije, također stvaranjem vodikovih veza sa membranama čuvaju i integritet membrana. Igraju ulogu sličnu proteinima HSP, tj. šaperonima no ne koriste ATP (Amara i sur., 2014).

Signalizacijska kaskada potaknuta promjenom u koncentraciji Ca^{2+} iona također je važni mehanizam za prilagodbu uvjetima povišene temperature i nedostatka vode. Ona nizvodno aktivira kalcij vezujuće proteine, koji pak induciraju promjenu u ekspresiji gena vezanih uz dehidraciju (Xiong i sur., 2002). Induciraju se geni za razne transportere poput tonoplastne ATP-aze i ATP-aze stanične membrane kako bi se štetni ioni (Cl^- i Na^+ najviše) sklonili u vakuolu, a potrebne tvari lakše raspodijelile po kompartmentima (Zhu i sur., 2007). Poznata grupa gena koja se inducira u stresu su geni *SOS*, od kojih *SOS1*, na primjer, kodira za plazmatski Na^+/H^+ antiporter koji služi uspostavi ionske ravnoteže. Također dolazi i do povećane sinteze akvaporina koji pomažu uspostavi idealnog osmotskoga stanja citosola.

Signali salicilne kiseline (SA) i ROS reguliraju internalizaciju i preraspodjelu akvaporina u stanicama korijena (Maurel i sur., 2009) kako bi se olakšalo primanje vode u korijen.

1.5. Oksidativni stres

Oksidativni stres odnosno poremećaj ravnoteže između proizvodnje ROS i njihovog uklanjanja javlja se kao posljedica kod različitih stresnih čimbenika. Reaktivni oblici kisika su najčešće superoksidni radikal, hidroksilni radikal, singletni kisik i najdugotrajnija jedinka ove skupine – vodikov peroksid. Povećanjem fluidnosti membrane uslijed povišenja temperature otvaraju se kalcijevi kanali koji služe kao signal za aktivaciju niza signalnih puteva, a aktiviraju i membransku ROS NADPH oksidazu koja stvara ROS. Također i na samome početku dehidracije pad turgora ima mehanički utjecaj jer mijenja konformaciju stanične membrane, te se vjeruje da to potiče signalizacijski niz uz pomoć membranskih proteina poput Sho1P, što nizvodno stvara fosforilacijsku kaskadu uz MAP kinaze te mijenja ekspresiju gena (Zhu i sur., 2007). Zajedno s indirektno stvorenim ROS usred poremećaja u membranama i lancima prijenosa elektrona u kloroplastu i mitohondriju, ovi direktno stvoreni ROS služe kao nizvodni signali za aktivaciju obrambenih mehanizama.

Velike količine ROS nisu povoljne, jer kada dođe do neravnoteže u nastajanju i detoksifikaciji ROS oni uzrokuju značajna oštećenja. Oštećuju proteine stvaranjem nitroziliranih i karboniliranih adukata, dok hidroksilni radikali uništavaju fotosintetske pigmente, a moguća su i oštećenja DNA (Xie i sur., 2019, Hassan i sur., 2020). ROS reagiraju sa nezasićenim masnim kiselinama stvarajući malondialdehid (MDA) u procesu zvanom lipidna peroksidacija. Povećanje količine MDA indikator je oksidativnoga stresa (Fahad i sur., 2017).

Stanični antioksidacijski sustav uključuje enzimске i ne-enzimске komponente. Enzimi se smatraju najefikasnijima u uklanjanju ROS, a može ih se naći u svim staničnim organelima i stromi. Uklanjanje superoksidnih radikala koji nastaju u fotosistemu II i I (Mehlerova reakcija) obavlja enzim superoksid dismutaza (SOD) te stvara vodikov peroksid i molekularni kisik. Vodikov peroksid je najstabilniji ROS, te kao signalna molekula difundira po stanici i apoplastu. Međutim suvišak vodikova peroksida mora se uklanjati a to rade dvije glavne vrste enzima, katalaze i peroksidaze. Ti enzimi se razlikuju po strukturi, afinitetu za supstrat i mehanizmu katalize. Katalaze su tetramerni metaloenzimi koji razgradnju vodikova peroksida obavljaju u dva koraka. Klasificiraju se u tri različite podvrste koje su različito eksprimirane ovisno o tkivu, stadiju razvoja biljke ili staničnom organelu (Mhamdi i sur., 2010). Ekspresija

antioksidacijskih enzima regulirana je i preko fitohormona. Na primjer, preko signala ABA dolazi do porasta količine katalaze u peroksisomima i glioksisomima, organelima sa najvećom produkcijom ROS uslijed povećane fotorespiracije i β -oksidacije masnih kiselina (Fahad i sur., 2017). Integracijom svih signala biljka se aklimatizira, te modifikacijom i preusmjeravanjem rasta, regulacijom razvoja pojedinih dijelova, preraspodjelom nutrijenata i asimilata može nastaviti svoj rast i razvoj u novonastalim uvjetima.

1.6. Raštika

Biljni rod *Brassica* iz porodice Brassicaceae sadrži niz povrća i njihovih kultivara koji čine važnu stavku ljudske prehrane. Sama porodica pojavila se u Iransko-Turanskoj regiji prije 37 milijuna godina. Biljke roda *Brassica* korištene su u Indiji još od 3 000 prije Krista, a postoje i indikacije da su pojedine vrste kultivirane na obali Europe još prije 8 000 godina (Šamec i sur., 2017). Jedan od pripadnika ovoga roda, raštika, *Brassica oleracea* var. *acephala* je biljka koja se uzgaja na istočnom Mediteranu i na nekim mjestima oko Atlantskoga oceana. To je dvogodišnja biljka sa debelim (nekada i naboranim) plavo-zelenim listovima koji ne tvore glavicu. Lako se i relativno jeftino mogu uzgojiti no potrebna im je dobro pripremljena zemlja jer imaju visoke potrebe za nutrijentima (posebno dušik). Unatoč tome odlično rastu prilikom izlaganju nizu stresnih uvjeta poput povišene temperature, suše ili solnoga stresa (Šamec i sur., 2019). Biljke ovoga roda korištene su u tradicionalnoj medicini više kultura Euroazije. Uz povoljni utjecaj na probavu, pokazano je da sadrže niz spojeva važnih za ljudsko zdravlje poput vitamina C, K, A, riboflavina, folata, minerala (posebno kalcija), glukozinolata i fenola (Harbaum i sur., 2006, Šamec i sur., 2019). Glukozinolati su spojevi specifični za vrste iz ove porodice, a produkti njihove razgradnje, izotiocijanati, imaju antioksidativna svojstva, te djeluju protuupalno i antibakterijski (Major i sur., 2020).

S obzirom da potječe i da se kultivira u suhim područjima, raštika je vrlo dobro prilagođena rastu u klimatskim uvjetima podložnim velikim oscilacijama temperature i količine padalina. Izlaganjem mladih biljaka raštike sedmodnevnoj suši nije utvrđena razlika u turgoru biljaka (Pavlović i sur., 2018). Drugi fiziološki i biokemijski parametri također ukazuju na veliku otpornost raštike naspram drugih biljaka istoga roda. Izlaganjem klijanaca kineskoga kupusa (*Brassica rapa*), običnoga kupusa (*Brassica oleracea* var. *capitata*) i raštike sušnome stresu utvrđen je porast količine prolina i malondialdehida (MDA), produkta lipidne peroksidacije što su oznake oksidativnoga stresa, no samo u raštici nije zabilježen pad u efikasnosti fotosintetskoga aparata (Pavlović i sur., 2018). U istoj studiji pronađeno je da aktivnost katalaze u raštici pod sušnim stresom pada, dok aktivnost SOD raste (Pavlović i sur.,

2018). Izlaganjem klijanaca raštike, kineskoga kupusa i običnoga kupusa solnome stresu, zabilježen je porast H_2O_2 i količina glutaciona u korijenu, no kod raštike manje nego kod kineskoga kupusa (Linić i sur., 2019), što indicira da je raštika otpornija na solni stres. U sličnom radu gdje se izlagalo već spomenute tri vrste solnome stresu, utvrđen je porast količine MDA u korijenu raštike, no bez statističke značajnosti čak i kod većih koncentracija soli (do 200 mM) (Pavlović i sur., 2019). Nadalje, ne dolazi niti do smanjenja biomase prilikom izlaganja osmotskome stresu (Pavlović i sur., 2019). Fluorescencijski parametri u ovoj studiji pokazali su da je raštika naspram kineskoga kupusa značajno otpornija na solni stres. Niže koncentracije soli u kineskoga kupusa uzrokuju pad efikasnosti fotosinteze, dok je isto uočeno kod raštike tek pri većim koncentracijama. U istoj studiji zabilježen je i porast prolina u sve tri vrste (Pavlović i sur., 2019). Porast količine prolina asociran je sa otpornošću biljke na osmotski stres, a u slučaju raštike porast toga parametra zabilježen je u nizu studija (Pavlović i sur., 2019, Linić i sur., 2019, Pavlović i sur., 2018). Izlaganjem raštike solnome stresu dolazi do povećane proizvodnje glukozinolata, spojeva povoljnih po ljudsko zdravlje (Linić i sur., 2019). Nadalje dolazi i do porasta salicilne kiseline koja pridonosi toleranciji na abiotički stres (Linić i sur., 2019).

Na području Hrvatske i Hercegovine, gdje se najviše i uzgaja raštika, postoji veliki broj lokalnih kultivara (Šamec i sur., 2019). Radi lokalnoga uzgoja i adaptacije na uvjete tih lokaliteta postoje velike varijacije u morfologiji biljaka poput različite boje listova radi količine antocijana, oblika, teksture i veličine listova, te razlike u klijavosti i morfologiji samoga sjemena (Šamec i sur., 2019). To znači da između tih kultivara vjerojatno postoje i razlike na fiziološkoj, biokemijskoj i razini ekspresije gena. Uzgojem nekoliko lokalnih kultivara raštike u hidroponici pronađeno je da količina glukozinolata i karotenoida ne varira značajno, no zabilježene su velike razlike u kvaliteti sjemena, klijavosti i morfologiji biljaka, posebno u boji listova što potječe od razlika u količini antocijana (Šamec i sur., 2019). Razlike su također pronađene u količini flavonoida i flavanola (Šamec i sur., 2019).

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj ovoga rada je usporediti različite kultivare raštike prema njihovoj sposobnosti rasta u uvjetima povišene temperature i suše i identificirati najotpornije te zatim pokušati utvrditi mehanizme odgovorne za otpornost odnosno osjetljivost na povišenu temperaturu i sušu.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1. 1. Biljni materijali

Sjemenke različitih tradicionalnih kultivara raštike *Brassica oleracea* var. *acephala* dobivene su iz Instituta za poljoprivredu i turizam u Poreču, a u istraživanjima sam koristila sjemenke 33 kultivara. Tablica 1 prikazuje kultivare raštike i lokacije u Hrvatskoj na kojima su sakupljeni.

Sjeme kineskog kupusa *Brassica rapa* var. *pekinensis* kupljeno je od tvrtke *International Seeds Processing GmbH*.

Tablica 1. Popis kultivara raštike i odgovarajuće lokacije sakupljanja.

Kultivar	Lokacija uzorkovanja
IPT202	Kaštelir Venier
IPT206	Labinci Jugovac Edo
IPT379	Fuškulín
IPT380	Otok Iž 2.
IPT381	Preko - Otok Ugljan
IPT383	Vrgorac (bijela)
IPT384	Konavle, Pavlje Brdo - A. Tsojarović
IPT385	Mostar, Vitina
IPT386	Vrgorac
IPT387	Ponikve, Pelješac
IPT388	Topići, Bačka voda
IPT390	Lošinj
IPT391	Ugljan - Otok Ugljan
IPT392	Dubrovnik
IPT393	Mostar
IPT394	Oključina - Otok Vis
IPT395	Mostar
IPT396	Lošinj
IPT397	Vrgorac
IPT398	Vrgorac, Prapatnice
IPT399	Čara, Korčula - Čarsko polje
IPT401	Zavalatica, Korčula
IPT402	Katuni
IPT403	Drinovci
IPT404	Blato na Cetini, Omiš
IPT405	Opuzen
IPT406	Babino polje
IPT408	Poreč - Pištan
IPT411	Otok Iž 1.
IPT414	Srijane
IPT416	Vinjani Donji
IPT419	Rum. - Bugarska, gr. prijelaz Oršova
IPT423	Kreševo

3.1.2. Kemikalije

Sve kemikalije koje sam koristila u izradi diplomskog rada nalaze se u tablici 2.

Tablica 2. Popis kemikalija, i njihovih proizvođača, korištenih u diplomskom radu.

Kemikalija	Proizvođač
(NH ₄) ₂ SO ₄	Sigma
30% H ₂ O ₂	Lachner
5-bromo-4-kloro-3-indolil fosfat /nitro plavi tetrazol (BCIP/NBT)	Sigma
96% H ₂ SO ₄	Kemika
Agaroza	Sigma
Albumin goveđeg seruma (<i>Bovine Serum Albumin</i> -BSA)	Sigma
Amonijev persulfat (APS)	Sigma
Boja <i>Coomasie brilliant blue G250</i>	Sigma
Borna kiselina	Kemika
Bromfenol plava	Riedel de Haen
Cetrimonijev bromid (CTAB)	Sigma
Ditiotreitol (DTT)	VWR
Etanol	LabExpert
Etidij bromid	Sigma
Etilendiamintetraoctena kiselina (EDTA)	Sigma
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	Kemika
Fosforna kiselina	Kemika
Glicerol	Kemika
Glicin	Kemika
HCl	Kemika
Izoamil	Kemika
Izosan	Pliva
K ₂ HPO ₄ , KH ₂ PO ₄	Gram-Mol
Kloroform	Scharlau
Ksilenol narančasta	Sigma
Ledena octena kiselina	Gram-Mol
Manitol	Sigma
Metanol	Kemika
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	Kemika
NaCl	Gram-Mol
Natrij dodecil sulfat (SDS)	Pharmacia Biotech
Ninhidrin	TCI
Polivinil polipirrolidon (PVPP)	Fluka
Prolin	Sigma
Sorbitol	Sigma
Tetrametiletildiamin (TEMED)	Aldrich
Tiobarbiturna kiselina (TBA)	Sigma
Trikloroctena kiselina (TCA)	Acros Organics
Tris	Sigma
Tween20	AppliChem
β-merkaptotanol	Sigma

3.1.3. Puferi, otopine i reagensi

3.1.3.1. **Kiseli ninhidrin**

Kiseli ninhidrin pripremljen je otapanjem 0,5 g ninhidrina u otopini ledene octene kiseline (30 ml), 96% etanola (10 ml) i destilirane vode (10 ml).

3.1.3.2. **Reagens *ferrous oxidation-xylenol orange* (FOX)**

Reagens ferrous oxidation-xylenol orange (FOX) je napravljen u dva koraka. Prvo sam napravila 25 mM otopinu amonijeva željezo (II) sulfata otapanjem 0,695 g $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ i 0,33 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ u otopini pripremljenoj od 96% H_2SO_4 (13,9 ml) i d H_2O (85,5 ml).

U drugom koraku otopila sam 4,75 mg boje ksilenol narančaste i 0,9105 g sorbitola u 50 ml d H_2O . U pripremljenu otopinu dodala sam 0,5 ml 25 mM otopine amonijeva željezo (II) sulfata.

3.1.3.3. **Reagens TCA/TBA**

Reagens TCA/TBA za detekciju količine malondialdehida (MDA) sadržavao je 0,3% otopinu tiobarbiturne kiseline (TBA) u 20% otopini trikloroctene kiseline (TCA). Prvo sam otopila 20 g TCA u otprilike 80 ml vode, a kada se sve otopilo dodala sam 0,3 g TBA i nadopunila do 100 ml s d H_2O .

3.1.3.4. **Kalij-fosfatni pufer (0,1 M, pH 7,0)**

Otopine potrebne za pripremu pufera su 1 M otopina KH_2PO_4 koja se dobije otapanjem 6,804 g KH_2PO_4 u 50 ml destilirane vode i 1 M otopina K_2HPO_4 koja se napravi otapanjem 8,709 g K_2HPO_4 u 50 ml destilirane vode. Pufer sam napravila miješanjem 3,85 ml 1 M otopine KH_2PO_4 i 6,15 ml 1 M otopine K_2HPO_4 uz dodatak 1 ml 10 mM otopine EDTA te nadopunila do 100 ml s d H_2O .

3.1.3.5. **Otopina po Bradfordu**

Otopinu po Bradfordu (Bradford, 1976) pripremila sam od 425 ml d H_2O , 15 ml 96% etanola, 30 ml 88% fosforne kiseline i 30 ml štok otopine za Bradford (100 ml 96% etanol, 200 ml 88% fosforna kiselina, 350 mg boje *Coomasie brilliant blue G250*). Radnu otopinu sam nakon pravljenja profiltrirala.

3.2.3.6. Pufer za mjerenje aktivnosti katalaze (KFP)

Pripremila sam 0,1 M kalij-fosfatni pufer (pH 7,0) na prethodno opisani način ali bez EDTA te sam neposredno prije korištenja u njega dodala 102 μ l 30% H₂O₂.

3.2.3.7. Pufer za denaturaciju proteina po Laemmliju

Pufer sam napravila dodavanjem 250 μ l 0,5 M Tris-HCl (pH 6,8) u 400 μ l 10% SDS, zatim 200 μ l glicerola, 100 μ l β -merkaptetoetanol i na kraju 50 μ l prethodno napravljene 0,04% boje Bromfenol plave (Laemmli, 1970).

3.2.3.8. Otopine za pripremu poliakrilamidnih gelova za mali sustav elektroforeze

Gel za razdvajanje (12%, 10 ml) pripremila sam miješanjem 2,5 ml otopine 1,5 M Tris-HCl (pH 8,8), 4 ml 30% otopine akrilamid/bisakrilamid, 100 μ l 10% SDS-a i 3,35 ml destilirane vode. Netom prije izlijevanja gelova dodala sam 50 μ l 10% APS-a i 5 μ l TEMED-a jer oni potiču polimerizaciju.

Gel za koncentriranje (4%, 5 ml) pripremila sam dodavanjem 1,25 ml otopine 0,5 M Tris-HCl (pH 6,8), 665 μ l 30% otopine akrilamid/bisakrilamid, 50 μ l 10% SDS-a, te 3,05 ml destilirane vode, a kao i prethodno netom prije izlijevanja dodano je 50 μ l 10% APS-a i 5 μ l TEMED-a.

3.2.3.9. Elektrodni pufer za SDS-elektroforezu

Za 1 L pufera otopila sam 3 g Tris u nešto manje od 1 L destilirane vode, zatim 14,4 g glicina i 1 g SDS. Namjestila sam pH do 8,3 sa 6 M HCl, te na kraju nadopunila do 1 L.

3.2.3.10. Pufer za mokri prijenos proteina na membranu

Pufer sam pripremila vaganjem 1,675 g Tris i 7,2 g glicina u koji sam dodala 50 ml metanola i sve nadopunila do 500 ml s destiliranom vodom.

3.2.3.11. Otopina boje Ponceau rouge

Otopinu sam napravila otapanjem 0,025 g boje Ponceau Rouge u 47,5 ml destilirane vode, te dodala 2,5 ml ledene octene kiseline.

3.2.3.12. Otopine korištene za imunodetekciju proteina na membrani

Pufer TBS (pH 7,5) sam pripremila otapanjem 1,2 g Tris i 4,4 g NaCl, a nakon podešavanja pH vrijednosti nadopunila sam s dH₂O do 500 ml.

Također pripremila sam pufer TTBS dodavanjem Tween 20 u TBS pufer tako da finalna koncentracija Tween20 bude 0,05%. Otopinu za blokiranje (OB) pripremila sam dodavanjem mlijeka u prahu u TTBS pufer tako da konačna koncentracije bude 5%.

Za pripremu 50 ml otopine C otopila sam 0,606 g Tris HCl, 0,292 g NaCl i 0,051 g $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ u 50 ml destilirane vode, te namjestila pH na 9,5 sa 1 M HCl.

Primarno protutijelo za HSP70 (Agrisera, iz zeca) napravila sam u TTBS puferu sa 3% mlijekom u razrjeđenju 1:1000. Za aktin (Agrisera, iz zeca) primarno protutijelo napravila sam u PBS puferu sa 2% mlijeka u razrjeđenju 1:1000, za HSP90 (Agrisera, iz zeca) u TBS puferu u razrjeđenju 1:3000, te za Rubisco (Agrisera, iz zeca) u TTBS puferu sa 5% mlijekom u razrjeđenju 1:1000.

Sekundarno protutijelo (Sigma, *anti-rabbit* IgG) konjugirano sa alkalnom fosfatazom, napravila sam u TTBS puferu sa 3% mlijekom (OB) u razrjeđenju 1:15000.

3.2.3.13. Ekstrakcijski pufer za izolaciju DNA (EP)

Pufer EP napravila sam miješanjem 1ml 1 M HCl, 2,8 ml 5 M NaCl, 400 μl 0,5 M EDTA, 200 mg CTAB i 1,4 μl 14,3 M β -merkaptetanola, te sam nadopunila do 10 ml sa destiliranom vodom.

3.2.3.14. Precipitacijski pufer za izolaciju DNA (PP)

Pufer EP napravila sam dodavanjem 1 ml 1 M Tris-HCl, 400 μl 0,5 M EDTA, 200 mg CTAB u nešto manje od 20 ml destilirane vode, te nakon što se otopilo nadopunila sam do 20 ml.

3.2.3.15. Pufer za uklanjanje RNaza (PRE)

Pufer za uklanjanje RNaza sastojao se od 1,5 M NaCl otopine i RNaze A koncentracije 10 ng/ml (primjenu sam opisala u postupku).

3.2.3.16. Pufer TBE

Pufer koji sam koristila za otapanje agaroze pri pripremi gelova, te kao elektrodni pufer tijekom elektroforeze DNA sadržavao je slijedeće komponente navedenih koncentracija: 0,1 M Tris, 0,1 M borna kiselina i 0,002 M EDTA.

3.2.3.17. Otopine za izolaciju RNA

Za izolaciju RNA koristila sam kit *MagMAX Plant RNA Isolation* (ThermoFisher). Sve otopine su priređene prema uputi proizvođača. Pufer za lizu je pripremljen tako da je netom prije postupka u *Lysis buffer* dodan polivinilpirolidon (PVPP) finalne koncentracije 2 % w/v i 2 M ditioneitol (DTT) u finalnoj koncentraciji od 0,039 M.

3.1.4. Uređaji

U diplomskom radu sam koristila stolne laboratorijske uređaje kao što su analitička vaga, pH metar, vorteks, autoklav, centrifuga s hlađenjem, termoblok, magnetska mješalica, termomiješač i vodena kupelj. Također koristila sam laminar, spektrofotometar (Analytik Jena), uređaj za elektroforezu proteina (Mini-PROTEAN 2 Cell, Bio-Rad) i vertikalni sustav za elektro prijenos (Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell, Bio-Rad), uređaj za mjerenje fluorescencije klorofila *a* Fluorpen (Photon Systems Instruments) i fitotron (Tamiko Instruments). Zatim NanoDrop (Thermo Fisher Scientific) za mjerenje koncentracije nukleinskih kiselina. Za kvantitativnu analizu ekspresije gena koristila sam uređaj MicPCR (Magnetic Induction Cycler proizvođača Bio Molecular Systems) i pripadajući programski paket (Bio Molecular Systems).

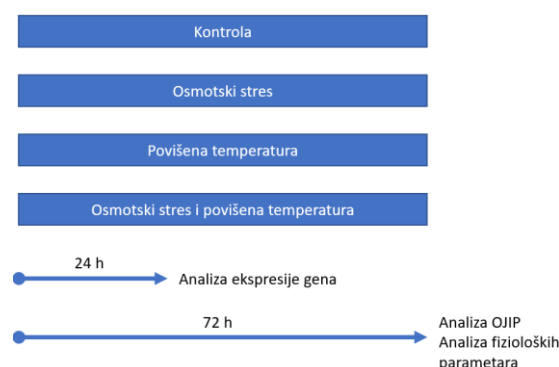
3.1.5. Računalni programi

U diplomskom radu koristila sam program za analizu podataka iz slike Image J (Schneider i sur., 2012) zatim program za analizu sekvenci primera Primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>), Nucleotide-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>) i SnapGene (SnapGene software, Insightful Science; dostupno na snapgene.com). Za statističku analizu koristila sam program Statistica (StatSoft Inc., "Statistica," Data Analysis Software System), a podatke sam uređivala u programu Excel (Microsoft Corporation. (2018). *Microsoft Excel*. <https://office.microsoft.com/excel>).

3.2. Metode

Eksperimentalni rad sastojao se od dva dijela. U prvom dijelu sam jedan dan stare klijance 33 kultivara raštike izložila povišenoj temperaturi i osmotskom stresu te povišenoj temperaturi uz osmotski stres kroz 72 sata (slika 1). Na temelju prirasta korijena, biomase, sadržaja vode i količine prolina u tkivu te dostupne količine sjemena odabrala sam dva otporna i dva najmanje otporna kultivara raštike za detaljnije analize.

U drugom dijelu rada sam 4 odabrana kultivara raštike i kineski kupus *Brassicca rapa* tretirala na isti način 24 sata uzorkovala sam (i čuvala na -80 °C) za analizu ekspresije gena, a nakon 72 sata dio uzgojenih biljaka koristila sam za mjerenje fluorescencije metodom OJIP, uzorkovala (smrzavanje tekućim dušikom i čuvanje na -80 °C) za mjerenje količine vodikova peroksida, te uzorkovala (smrzavanje tekućim dušiku, pohrana na -20 °C i sušenje liofilizacijom) za mjerenje stupnja lipidne peroksidacije, ukupne količine proteina, aktivnosti katalaze, i analize proteina HSP70, HSP90 i Rubisco (slika 1).



Slika 1. Jedan dan stari klijanci raštike i kineskog kupusa uzgajani su u kontrolnim uvjetima ili izloženi osmotskom stresu, povišenoj temperaturi ili kombinaciji osmotskog stresa i povišene temperature kroz 24 h za analizu ekspresije gena te 72 h za analizu fluorescencije metodom OJIP i analizu fizioloških parametara.

3.2.1. Priprema hranjivih podloga

Podlogu za isključivanje sjemenki i uzgoj klijanaca napravila sam otapanjem agara u destiliranoj vodi tako da koncentracija agara bude 1% (w/v), sterilizirala je autoklaviranjem na 121 °C tijekom 30 minuta a zatim sam tekući agar razlila u Petrijeve zdjelice (12 × 12 cm) u sterilnim uvjetima laminara i ostavila da se ohladi i skruti, te do uporabe čuvala na sobnoj temperaturi. Za izlaganje osmotskom stresu pripremila sam podlogu u koju sam osim agara dodala i manitol u koncentraciji 0,3 M.

3.2.2. Sterilizacija i isključivanje sjemenki

Sterilizaciju sjemenki radila sam u laminaru tako da su sve sjemenke bile potopljene u 1 ml 3% (w/v) vodene otopine Izosana i inkubirane 10 minuta uz povremeno miješanje. Nakon toga isprala sam sjemenke sterilnom destiliranom vodom tri puta i rasporedila na podlogu s agarom u pripremljene Petrijeve zdjelice.

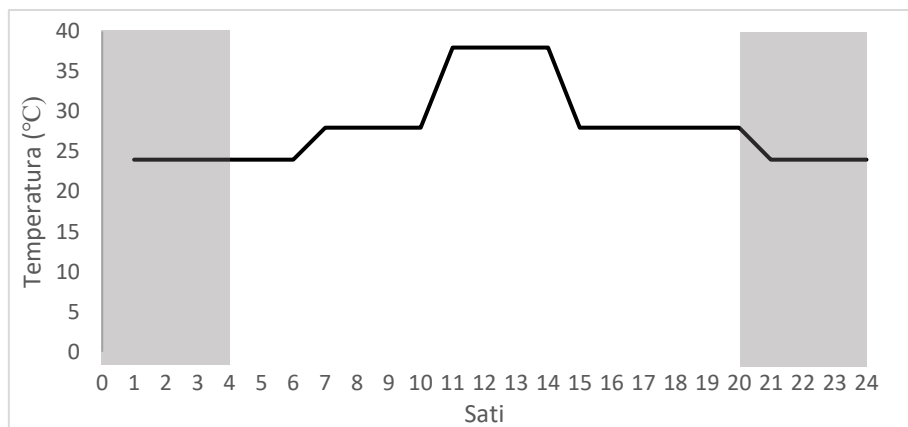
Ploče sa sjemenkama sam stavila na stratifikaciju u mrak na 4 °C, tijekom pet dana te ih zatim izvadila i inkubirala u fitotronu gdje su klijale 24 sata pri fotoperiodu 16/8 sati (dan/noć), konstantnoj temperaturi od 22 °C, te pri intenzitetu svjetla od 75-85 $\mu\text{mol fotona m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

3.2.3. Izlaganje toplinskom i osmotskom stresu

Nakon 24 sata klijanja, klijance sam u sterilnim uvjetima laminara presadila na tretmane (slika 2). Klijance za kontrolu i tretman samo toplinskim stresom presadila sam na ploče s 1% agarom, dok sam klijance za tretman osmotskim stresom, te kombiniranim osmotskim i toplinskim stresom presadila na ploče s 1% agarom s dodatkom 0,3 M manitola. Manitol u podlozi za rast imitira osmotski stres kojemu bi biljke bile izložene prilikom rasta u sušnim uvjetima. Kako bi što preciznije odredila rast korijena u prvom dijelu pokusa za svaki tretman nasadila sam po tri ploče s 5 – 7 klijanaca po ploči te sam označila početnu duljinu korijena kako bih kasnije mogla pratiti rast. U drugom dijelu pokusa nasađivala sam 20-tak klijanaca po ploči kako bih dobila potrebnu količinu materijala. Nakon presađivanja, ploče s klijancima sam prenijela u fitotron. Biljke za kontrolu i tretman manitolom rasle su na konstantnoj temperaturi od 22 °C. Klijanci tretirani toplinskim stresom i oni tretirani kombinacijom osmotskoga i toplinskoga stresa rasli su u drugom fitotronu gdje se simulirala ciklička promjena temperature tijekom 24 sata u ljetnim mjesecima - temperatura se mijenjala na slijedeći način: 10 sati 24 °C, 4 sata 28 °C, 4,5 sati 38 °C, 5,5 sati 28 °C (slika 3). Za kontrolu i sve tretmane fotoperiod je bio 16/8 (dan/noć) a jačina svjetlosti 120 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.



Slika 2: Petrijeve zdjelice s agarom i nasađeni jedan dan stari klijanci raštike.



Slika 3: Kretanje temperature u fitotronu tijekom 24 sata izlaganja povišenoj temperaturi. Sivo obojani dijelovi predstavljaju period noći, tj. ugašenoga svjetla.

3.2.4. Mjerenje prirasta korijena, određivanje svježje i suhe mase

Prirast korijena klijanaca izloženih kontrolnim i stresnim uvjetima određivala sam nakon 72 sata tretmana mjerenjem dužine izraslog korijena skeniranjem klijanaca i analizom u programu ImageJ. Rezultate sam prikazala kao prirast korijena tretmana u odnosu na kontrolu prema formuli:

$$\text{Prirast korijena (\%)} = \frac{\text{srednja vrijednost dužine korijena na tretmanu}}{\text{srednja vrijednost dužine korijena na kontroli}} \times 100$$

Zatim sam izvagala svježju masu (FW) svih klijanaca jedne ploče i zapisala njihov broj te izračunala postotak prirasta biomase klijanca prema formuli:

$$\text{Biomasa klijanca (\%)} = \frac{\frac{FW}{\text{klijanac}}(\text{tretman})}{\frac{FW}{\text{klijanac}}(\text{kontrola})} \times 100$$

Na kraju sam klijance smrznula u tekućem dušiku prije liofilizacije koja je obavljena tijekom 24 sata. Nakon liofilizacije izvagala sam suhu masu (DW) te izračunala postotak vode u tkivu prema formuli:

$$\% \text{ vode u tkivu} = \frac{FW - DW}{FW} \times 100$$

3.2.5. Određivanje sadržaja prolina u tkivu

Prolin sam mjerila u svim analiziranim kultivarima raštike. Liofilizirano tkivo, dobiveno nakon određivanja prirasta i sadržaja vode u tkivu, sam stavila u epruvete, dodala četiri keramičke kuglice i uronila u tekući dušik te usitnjavala vorteksiranjem 20 sekundi. Uranjanje u tekući dušik i vorteksiranje ponavljala sam sve dok tkivo nije bilo samljeveno u sitni prah. Samljeveno tkivo svakoga tretmana i kontrole razdijelila sam na tri do četiri mikroeprovete (ovisno o dostupnoj količini tkiva svakoga kultivara) od kojih je svaka sadržavala otprilike 10 mg tkiva.

Prolin sam mjerila po metodi koja koristi ninhidrin kao agens za detekciju prolina, te kisele uvjete octene kiseline koja hidrolizira ciklički prolin (Carillo i sur., 2008). Ekstrakciju prolina iz samljevenoga tkiva napravila sam u 70% etanolu. U prethodno spomenute mikroeprovete sa odvaganim tkivom dodala sam po 1 ml 70% etanola, kratko vorteksirala kako bi se sve promiješalo i inkubirala 30 minuta na 4 °C. Nakon inkubacije opet sam kratko vorteksirala i centrifugirala 10 minuta na 16 000 g u centrifugi ohlađenoj na 4 °C. Supernatant u kojem se nalazi prolin prelila sam u nove mikroeprovete. Razrjeđivanjem matične otopine L-prolina (1000 µmol/L) pripremila sam otopine prolina poznatih koncentracija (standardi): 1 µmol/L, 10 µmol/L, 25 µmol/L, 50 µmol/L, 100 µmol/L, 250 µmol/L, 500 µmol/L i 1000 µmol/L koje sam koristila za izradu baždarnog pravca. Zatim sam u epruvetama sa navojem napravila reakcijsku smjesu koja se sastojala od 1 ml kiselog ninhidrina (3.1.3.1.) i određenog volumena supernatanta ili standarda. Za uzorke kontrole i tretmana topline te standarde dodavala sam 100 µl supernatanta odnosno pojedinog standarda, dok sam za uzorke tretmana manitolom i kombiniranog stresa supernatant razrijedila četiri puta pipetirajući 25 µl uzorka i dodajući 75 µl 70% etanola. Slijepu probu napravila sam dodavanjem 100 µl 70% etanola u 1 ml reakcijske smjese. Vorteksirala sam dobivenu mješavinu i inkubirala 20 minuta na 95 °C u termobloku kako bi se ubrzala reakcija i dobio obojeni produkt prolina i ninhidrina. Nakon nekoliko minuta hlađenja na ledu, mjerila sam apsorbanciju dobivenih otopina uzoraka i standarda na 520 nm. Koncentraciju prolina u uzorcima izračunala sam uvrštavanjem dobivene apsorbancije u jednadžbu baždarnoga pravca dobivenog sa standardima. Rezultate sam izrazila po suhoj masi tkiva.

3.2.6. Mjerenje polifaznog rasta fluorescencije klorofila *a* i OJIP test

Fotosintetska učinkovitost odabranih kultivara raštike određena je mjerenjem polifaznog rasta fluorescencije klorofila *a* odmah nakon 72-satnog izlaganja klijanaca stresu, pomoću

uređaja Fluorpen. Petrijeve zdjelice s klijancima držala sam prije mjerenja u uvjetima tame 30 minuta. Klijanci raštike imaju male supke te sam supke neposredno prije mjerenja skupila zajedno kako bih dobila odgovarajuću površinu. Mjerenje se odvijalo u potpunom mraku kako ne bi došlo do neželjenog osvjetljavanja. Za svaki tretman i kontrolu izmjerila sam četiri do pet klijanaca. Na uređaju sam odabrala OJIP protokol (Fluorpen Manual) koji automatski mjeri rast fluorescencije klorofila *a* prema zadanim parametrima i bilježi podatke. Promjena fluorescencije, prikazana na logaritamskoj skali vremena daje polifaznu krivulju od koje svaki segment predstavlja jedan od procesa apsorpcije kvanta svjetlosti, prijenosa energije i elektrona unutar fotosistema II. Ukratko, pomoću pulsa saturacijske svjetlosti (455 nm, max. 3000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) inducira se fluorescencije klorofila *a*. Intenzitet fluorescencije mjeri se 50 μs nakon osvjetljenja što se smatra početnim korakom na OJIP krivulji te se označava kao F_0 ili O korak. Zatim slijede međukoraci J i I izmjereni nakon 2 ms odnosno 30 ms (Strasser is ur., 2004) te završno maksimalni intenzitet fluorescencije (F_m kao korak P). Iz dobivenih podataka, pomoću OJIP testa uređaj računa različite parametre od kojih sam ja u radu koristila maksimalni kvantni prinos fotosistema II (F_v/F_m) i indeks fotosintetske učinkovitosti (P_{Iabs}).

3.2.7. Sadržaj vodikova peroksida

Za određivanje sadržaja vodikova peroksida koristila sam metodu s reagensom FOX (*ferrous oxidation-xylenol orange*) (Gupta, 1973). Ona se bazira na oksidaciji Fe^{2+} iona u Fe^{3+} koja se odvija uz pomoć H_2O_2 prisutnoga u uzorku. Kada željezo prijeđe u Fe^{3+} oblik stvara kompleks sa ksilenolom i dalje plavo-ljubičasto obojenje otopini. Količina nastalih kompleksa ovisi o količini vodikova peroksida u uzorku što se mjeri spektrofotometrijski.

Vodikov peroksid mjerila sam u klijancima odabranih klutivara. Ekstrakte sam napravila tako što sam tkivu smrznutom na -80°C dodala četiri staklene kuglice i jednu keramičku te sam homogenirala vorteksiranjem uz uranjanje u tekući dušik kako bih dobila prah. Tijekom mljevenja dodavala sam 70 % etanol sve do konačne količine od 1 ml. Nakon toga stavila sam ih u centrifugu ohlađenu na 4°C i centrifugirala na 5 000 g tijekom 20 minuta kako bi se stanični ostatci spustili na dno. Supernatant sam prepipetirala u zatamnjene mikroeprovete i tijekom korištenja držala na ledu, a zatim spremila na -20°C do daljnjega korištenja.

Za mjerenje sam otpipetirala u zatamnjene mikroeprovete 100 μl prethodno napravljenoga ekstrakta i 1 ml FOX reagensa (3.1.3.2.). Uzorke standarada za izradu baždarnoga pravca napravila sam dodavanjem 100 μl otopine H_2O_2 slijedećih koncentracija: 0,0619 $\mu\text{g/ml}$, 0,124 $\mu\text{g/ml}$, 0,248 $\mu\text{g/ml}$, 0,557 $\mu\text{g/ml}$, 0,867 $\mu\text{g/ml}$, 1,362 $\mu\text{g/ml}$ i 1,733 $\mu\text{g/ml}$,

koje sam pripremila razrjeđivanjem matične otopine H₂O₂ koncentracije 30%, u 1 ml FOX reagensa. Slijepu probu napravila sam dodavanjem 100 µl 70% etanola u 1 ml FOX reagensa. Nakon toga sve uzorke sam inkubirala 15 minuta na sobnoj temperaturi i potom mjerila apsorbanciju dobivenog obojenog kompleksa na 560 nm. Količinu vodikova peroksida u uzorcima izračunala sam uvrštavanjem dobivene apsorbancije u jednadžbu baždarnoga pravca dobivenu sa poznatim koncentracijama H₂O₂. Rezultate sam izrazila po svježoj masi tkiva.

3.2.8. Ekstrakcija i mjerenje koncentracije proteina

Ukupna količina proteina određena je u klijancima odabranih klutivara metodom prema Bradfordu (1976). Metoda se temelji na vezanju boje Comassie Brilliant Blue (CBB) G-250 na proteine u kiselom mediju. CBB se na proteine veže hidrofobnim interakcijama i ionskim vezama. To je stabilizira u anionskom obliku i dovodi do vidljive promjene boje iz smeđe u plavu.

Ekstrakte sam radila iz liofiliziranih uzoraka u kalij-fosfatnom puferu (3.1.3.4.). U ohlađene tarionike dodala sam biljni materijal, količinu polivinil polipirolidona (PVPP) koja stane na vrh špatulice i 500 µl hladnoga KFP. Zatim sam tučkom homogenizirala tkivo, prelila u mikroeprovete, te sa dodatnih 500 µl hladnoga KFP isprala tarionik i tučak tako da je ekstrakt rađen sveukupno sa 1 ml KFP. Uzorke sam zatim centrifugirala 20 minuta na 16 000 g u centrifugi ohlađenoj na 4 °C. Supernatant sam potom pažljivo prepipetirala u čiste mikroeprovete zbog tankog uljanog sloja koji se nalazio na površini supernatanta sa ekstraktom topivih proteina. Ekstrakti su tijekom korištenja držani na ledu, a zatim na -20 °C do daljnjega korištenja. Korišteni su za određivanje stupnja lipidne peroksidacije (3.2.9.), aktivnosti katalaze (3.2.10.) i za imunodetekciju proteina (3.2.11.)

Za detekciju količine proteina u mikroeprovete sam dodavala po 1 ml Bradfordove otopine (3.3.3.5.) i 50 µl ekstrakta proteina. Slijepa proba je umjesto ekstrakta sadržavala 50 µl KFP, a uzorci standarada za izradu baždarnog pravca su sadržavali 50 µl otopine albumina goveđeg seruma (*bovine serum albumin*, BSA) poznatih koncentracija: 0,1 mg/ml, 0,2 mg/ml, 0,3 mg/ml, 0,4 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,6 mg/ml, 0,7 mg/ml, 0,8 mg/ml, 0,9 mg/ml. Mješavinu sam potom kratko vorteksirala i inkubirala 10 minuta na sobnoj temperaturi. Zatim sam mjerila apsorbanciju na 595 nm. Količinu proteina u uzorcima izračunala sam uvrštavanjem dobivene apsorbancije u jednadžbu baždarnoga pravca dobivenu sa poznatim koncentracijama BSA, te izrazila po suhoj masi.

3.2.9. Stupanj lipidne peroksidacije

Stupanj lipidne peroksidacije mjerila sam u klijancima odabranih klutivara. Koristila sam metodu određivanja malondialdehida (MDA) glavnog produkta lipidne peroksidacije (Draper, i Hadley, 1990). U kiselom okruženju reakcijske otopine potiče se ispuštanje i stabilizacija MDA koji s tiobarbiturnom kiselinom (TBA) iz reagensa stvara ružičasto obojene adukte koji imaju maksimum apsorpcije na 532 nm.

Ekstrakte napravljene prilikom mjerenja količine proteina (3.2.8.) koristila sam i u ovoj metodi. Čuvani su smrznuti na -20 °C, pa sam ih otopila i čuvala na ledu do korištenja. Zatim sam u epruvete sa navojem dodala 750 µl TBA/TCA reagensa (3.1.3.3.) i na to 250 µl ekstrakta. U drugu seriju jednako označenih epruveta dodala sam 750 µl TCA reagensa (3.1.3.3.) i 250 µl ekstrakta. Također sam napravila i slijepu probu u koju sam umjesto ekstrakta dodala 250 µl KFP. Zatim sam sve uzorke i slijepu probu inkubirala na 95 °C tijekom 30 minuta u termobloku. Nakon isteka vremena uzorke sam kratko ohladila i centrifugirala 10 minuta pri 15 000 g u centrifugi ohlađenoj na 4 °C, te potom supernatant prelila u mikroepruvete. Apsorbanciju sam istovremeno mjerila na 532 nm gdje apsorbira MDA i 600 nm radi zamućenja. Koncentraciju TBARS u ekstraktu izračunala sam po formulama:

$$A = (A_{TCA/TBA}(532 \text{ nm}) - A_{TCA/TBA}(600 \text{ nm})) - (A_{TCA}(532 \text{ nm}) - A_{TCA}(600 \text{ nm}))$$

$$MDA = \frac{A \times f.r. \times V_{ekstrakta}}{\varepsilon \times l \times \gamma} \times 10^6$$

Pri čemu je :

A – apsorbcija

f.r. – faktor razrjeđenja (4)

V_{ekstrakta} – 1 ml

ε – ekstinkcijski koeficijent (155 mM⁻¹cm⁻¹)

l – duljina optičkoga puta (1 cm)

γ - koncentracija proteina u uzorku (mg/ml)

3.2.10. Mjerenje aktivnosti katalaze

Aktivnost katalaze (CAT) mjerena je u prethodno pripremljenim proteinskim uzorcima. Aktivnost CAT određena je praćenjem promijene apsorpcije na 240 nm uslijed smanjenja količine vodikova peroksida iz reakcijskog pufera zbog katalitičkoga djelovanja katalaze (Aebi, 1984). Mjerenje se provodilo u kvarcnoj kiveti, svakih 10 sekundi nakon dodavanja 25 µl proteinskog ekstrakta napravljenog za mjerenje ukupnih proteina (3.2.8.) u 975 µl reakcijskog

pufera čiji sastav je opisan u poglavlju 3.2.3.6. Slijepa proba sadržavala je 25 µl KFP u 975 µl reakcijskog pufera. Aktivnost CAT izračunala sam prema formuli :

$$CAT = \frac{\Delta A \times f.k. \times f.r.}{\epsilon \times l \times \gamma}$$

Pri čemu je :

CAT (mM/min/mg (proteina))

ΔA - srednja vrijednost promjene apsorbancije u 10 sekundi

f.k. - faktor korekcije po minuti (6)

f.r. - faktor razrjeđenja (40)

ε - ekstinkcijski koeficijent (40 mM⁻¹cm⁻¹)

l – duljina optičkoga puta (1 cm)

γ - koncentracija proteina u uzorku (mg/ml)

3.2.11. Imunodetekcija proteina HSP70, HSP90, Rubisco

3.2.11.1. Natrij dodecil sulfat - poliakrilamid gel elektroforeza (SDS-PAGE)

Proteine u ekstraktima odabranih kultivara raštike dobivenih pod 3.2.9. razdvojila sam vertikalnom SDS-PAGE elektroforezom u denaturirajućim uvjetima. Koristila sam diskontinuirani gel u sistemu pufera Tris-Gly (3.2.3.9.). Nakon sastavljanja stakalaca i pričvrščivanja u aparaturu za izlijevanje napravila sam 12% -tni gel za razdvajanje (3.2.3.8.) koji se ulijeva prvi. Mješavina se odmah nanosi pipetom između stakalaca, te sam gel nadsvodila vodom kako kontakt sa kisikom iz zraka ne bi spriječio polimerizaciju. Nakon 45 minuta gel se polimerizirao te sam napravila gornji 4%-tni gel za koncentriranje (3.2.3.8.), unijela među stakalca, stavila češljice te pustila da polimerizira još 45 minuta. Prije nanošenja uzoraka napunila sam spremnik sa elektrodnim puferom (3.2.3.9.). Zatim sam uzorke denaturirala dodavanjem najmanje 25 µl Laemmlijevog pufera za denaturaciju (3.2.3.7.) na fiksnih 100 µl uzorka. Količinu pufera sam varirala tako da u konačnici u uzorcima dobijem koncentraciju proteina koja će omogućiti nanošenje 9 µg proteina po jažici. Denaturaciju sam napravila u termobloku 5 minuta na 96 °C. Nakon hlađenja uzorke sam nanijela u jažice na gel, stavila u jednu jažicu 8 µl markera (ColourBurst, Sigma) i pokrenula elektroforezu. Prvih 15 minuta proteini su se sabijali na konstantnom naponu od 100 V (28 mA), a nakon toga 60 minuta odvajali pri konstantnom naponu od 200 V (44 mA). Tijek elektroforeze prekinula sam kad je boja bromfenol modro došla do kraja gela.

3.2.11.2. Prijenos proteina i imunodetekcija proteina na membrani (Western blot)

Nakon SDS-PAGE gel sam složila u višeslojni „sendvič“ za prijenos na membranu. U posudu s puferom za prijenos stavila sam plastični okvir uređaja (tamnom stranom prema dolje), na njega spužvicu, filter papir i zatim nitroceluloznu membranu te gel i na njega opet filter papir i spužvicu pazeći da sve bude dobro natopljeno i da između membrane i gela nema mjehurića zraka. Redoslijed slaganja mora biti takav da proteini u smjeru toka struje prijeđu iz gela na nitroceluloznu membranu. Sve zajedno sam dobro stisnula i učvrstila te složila u posebni držač koji se učvrsti u kadnicu sa puferom za prijenos (3.2.3.10.). Proteini su zatim elektroforetskim putem preneseni na nitroceluloznu membranu u puferu za prijenos tijekom 60 minuta pri konstantnom naponu od 60 V (206 mA). Prije imunodetekcije membranu sam obojala sa bojom Ponceau rouge kako bih potvrdila uspješnost transfera. Boja Ponceau rouge (3.2.3.11.) reverzibilno vizualizira proteine na nitroceluloznoj membrani, a ispiru se vodom ili u mom slučaju ja sam isprala vodom i potom još u TBS puferu.

Imunodetekcija započinje blokiranjem membrane u otopini za blokiranje (OB, 3.2.3.12.) tijekom jednog sata. Zatim sam membrane prerezala na mjestu između očekivanih bandova proteina koje sam detektirala ravnanjući se prema markeru. Dio membrane za koji očekujem da sadržava protein HSP70 sam inkubirala u primarnom antitijelu na taj protein a drugi dio za koji se očekuje da sadrži kontrolu nanošenja, tj. aktin inkubirala sam u pripadajućem antitijelu. Jednako tako, membrane za detekciju HSP90 odnosno Rubisco inkubirala sam u pripremljenim otopinama za ta protutijela (3.2.3.12.). Inkubacija je trajala preko noći na 4 °C.

Slijedeći dan membrane sam isprala dva puta u OB tijekom 5 minuta, i dodala sekundarno antitijelo konjugirano sa alkalnom fosfatazom te inkubirala jedan sat. Nakon ispiranja dva puta po 10 minuta u TTBS puferu isprala sam membrane dva puta po 5 minuta u otopini C (3.2.3.12.). Detekciju sam napravila odlijevanjem većine otopine C, no ostavila sam dovoljno da membrane budu vlažne, te sam po njima rasporedila oko 1 ml mješavine BCIP/NBT (supstrat za alkalnu fosfatazu). Nakon pojave plavo-ljubičastoga obojenja reakciju sam zaustavila dodatkom veće količine vode. Imunodetekcija proteina napravljena je u duplikatu, a membrane sam potom skenirala. Analizu intenziteta proteinskih bandova napravila sam u programu ImageJ prema protokolu opisanom u *Western blot quantification using ImageJ* autora Hossein Davarinejad (<http://www.yorku.ca/yisheng/Internal/Protocols/ImageJ.pdf>).

3.2.12. Izolacija genomske DNA

Genomsku DNA izolirala sam iz klijanaca metodom CTAB (Doyle i Doyle, 1987). Ova metoda vrlo je prikladna za izolaciju DNA iz biljnih uzoraka jer CTAB kao kationski deterdžent ne radi samo micele sa lipidima membrana čime se ispušta sadržaj jezgre, već ovisno o ionskoj jakosti otopine djeluje i na specifične biljne metabolite. Ekstrakcijski pufer koji se koristi ima visoku koncentraciju iona, a u tom okruženju CTAB veže kompleksne polisaharide i neutralizira efekte sekundarnih metabolita, dok pri niskoj ionskoj jakosti precipitacijskog pufera CTAB precipitira nukleinske kiseline.

DNA sam izolirala iz 10 klijanaca smrznutih u tekućem dušiku i homogeniziranih u hladnom tarioniku. Nakon drobljenja odvojila sam oko 100 mg tkiva u zasebnu mikroeprevetu. Ekstrakciju sam započela dodavanjem 0,5 ml pufera EP (3.2.3.13.) zagrijanoga na 65 °C u mikroeprevete sa otprilike 100 mg samljevenih uzoraka, te stavila na inkubaciju u vodenu kupelj zagrijanu na 65 °C tijekom 30 minuta. Tijekom inkubacije sam povremeno promiješala uzorke. U rashlađene uzorke sam dodala 0,5 ml mješavine kloroform:izoamil (24:1), stavila na miješalicu 10 minuta i zatim centrifugirala 10 minuta na 14 000 g (sobna temperatura). Nukleinske kiseline su nakon centrifuge ostale u gornjoj, vodenoj fazi koju sam prenijela u novu mikroeprevetu i dodatno pročistila mješavinom kloroform:izoamil (24:1) u omjeru 1:1 naspram izvađene vodene faze. Uzorci su ponovo miješani tijekom 10 minuta i zatim 10 minuta centrifugirani na 14 000 g. Nakon ovoga koraka pročišćavanja nukleinske kiseline se ponovo nalaze u gornjoj vodenoj fazi, koju sam prenijela u novu mikroeprevetu (od 2 ml radi daljnjih koraka) i dodala pufer PP (3.2.3.14.) u omjeru 2:1 naspram izvađene vodene faze sa nukleinskim kiselinama. Uzorke sam inkubirala 60 minuta na sobnoj temperaturi, zatim centrifugirala 10 minuta na 14 000 g i maknula supernatant jer nukleinske kiseline nakon centrifuge tvore vidljivi bijeli talog na dnu mikroeprevete. Na talog sam dodala 600 µl 1,5 M NaCl i 4 µl RNaze (koncentracije 10 ng/ml). Uzorke sam zatim inkubirala 30 minuta na 55 °C. Po završetku sam dodala 1200 µl hladnoga 96% etanola i ostavila da se DNA precipitira na sobnoj temperaturi tijekom 60 minuta. Zatim sam centrifugirala uzorke 10 minuta na 14 000 g, maknula supernatant i isprala talog sa 1 ml 70% etanola. Ponovo sam centrifugirala 5 minuta na 7 000 g, maknula supernatant i osušila talog. Na kraju sam DNA otopila u 100 µl miliQ vode preko noći na 4 °C i spremila na -20 °C.

3.2.13. Izolacija RNA

Izolaciju RNA radila sam iz klijanaca odabranih kultivara raštike (kultivari 392 i 411) i kineskog kupusa *B. rapa*. Klijaneci su 24 sata nakon izlaganja tretmanima (3.2.2, slika 1) uronjeni u tekući dušik, te spremljenih na -80 °C. Jedna biološka replika za izolaciju RNA sadržavala je 10 klijanaca koji su zajedno homogenizirani. Protokol izolacije pratio je instrukcije dobivene uz kit *MagMAX Plant RNA Isolation*.

Izolacija započinje usitnjavanjem biljnoga tkiva. Deset klijanaca stavila sam u tarionik ohlađen u tekućem dušiku, prelila tekućim dušikom i homogenizirala do praha sve dok dušik nije ispario. Zatim sam premjestila tkivo u označene mikroepruvete te držala u tekućem dušiku. Nakon toga sam u svaki uzorak dodala 600 µl pufera za lizu zagrijanoga na 56 °C. Kratko sam centrifugirala, te stavila uzorke 5 minuta u vodenu kupelj na 56 °C. Po završetku inkubacije uzorke sam centrifugirala 10 minuta na 16 000 g pri sobnoj temperaturi. Uzela sam 400 µl supernatanta sa RNA i premjestila u nove označene mikroepruvete. U svaki uzorak sam dodala 25 µl RNA vezujućih kuglica i 400 µl 96 % etanola. Uzorke sam vorteksirala 10 sekundi i zatim centrifugirala oko 1 sekunde da se tekućina spusti na dno mikroepruvete. Nakon što se sva tekućina spustila na dno, mikroepruvete sa uzorcima sam stavila na magnetski stalak tijekom 2 minute tijekom kojih su se kuglice sa RNA nakupile na stranu mikroepruvete prema magnetu te sam mogla maknula tekućinu sa ostatkom lizata držeći mikroepruvete na magnetskom stalku. Nakon toga, s RNA vezane na kuglicama isprala sam nevezane nečistoće sa 700 µl otopine za ispiranje 1 i ponovila ciklus od 10 sekundi vorteksiranja, 1 sekunda centrifuge i 2 minute na magnetskom stalku, te maknula supernatant. Uzorke sam osušila u otvorenim mikroepruветama kroz 5 minuta na magnetnom stalku da ispari sav etanol. Slijedeći korak je tretman DNazom, te sam u svaki uzorak dodala 200 µl prethodno pripremljene otopine s DNazom, lagano promiješala tapkanjem mikroepruvete i inkubirala 15 minuta na 37 °C i uz miješanje 350 okretaja i minuti. Kratko sam centrifugirala da se uzorci spuste na dno mikroepruvete. Nakon ovoga slijedi ponovo vezanje RNA na kuglice, za što sam dodala 150 µl pufera za ponovo vezanje i 400 µl 96 % etanola, te ponovila ciklus od 10 sekundi vorteksiranja, 1 sekunda centrifuge i 2 minute na magnetskom stalku. Dok su mikroepruvete još na stalku maknula sam supernatant, zatim sam ih izvadila iz stalka i dodala 700 µl otopine za ispiranje 1. Ponovila sam ciklus 10 sekundi vorteksiranja, 1 sekunda centrifuge, 2 minute na magnetskom stalku i uklonila supernatant. Zatim sam dodala 700 µl otopine za ispiranje 2, te dva puta ponovila opisani ciklus (10 sekundi vorteks, 1 sekunda centrifuga, 2 minute magnetski stalak) sa otopinom za ispiranje 2. Nakon završetka RNA na kuglicama je „oprana“ i stavila sam uzorke 5 minuta da se suše na

sobnoj temperaturi. Kada je ispario sav etanol, zadnji korak ekstrakcije je eluiranje RNA sa kuglica. Za to sam dodala 70 µl vode bez nukleaza i uklonila uzorke sa magnetskoga stalka. Napravila sam spomenuti ciklus 10 sekundi vorteksiranja, 1 sekunda centrifuge, 2 minute na magnetskom stalku. Čekala sam da se otopina raščisti, tj. kuglice priljube uz stijenku prema magnetu. RNA se sada nalazila u supernatantu, te sam bez micanja mikroeproveta sa stalka pažljivo prebacila supernatant sa pročišćenom RNA u čiste označene mikroeprove. Uzorcima RNA sam spektrofotometrijski izmjerila koncentraciju (pri 260 nm) i čistoću (omjer 260 nm/230 nm, i 260 nm/280 nm), te su čuvani na -20 °C.

3.2.14. Reverzna transkripcija (RT-PCR)

Izoliranoj RNA izmjerila sam koncentraciju na NanoDrop-u, a za reverznu transkripciju sam koristila 1 µg RNA. Mješavinu za prvi dio reakcije napravila sam dodavanjem početnice 0,5 µl oligo dT (0,5 µg/µl (Thermo Scientific)), 1 µl dNTP (10 mM) mješavine u svaku mikroeprovetu, te zatim u svaku dodala odgovarajuće volumene izolirane RNA (ukupno 1 µg) i DEPC H₂O (voda bez nukleaza) tako da je konačni volumen bio 12,5 µl. Ta mješavina inkubirana je 5 minuta na 65 °C. Za to vrijeme pripremila sam mješavinu od 4 µl 5× RT-PCR pufera, 0,5 µl RNAi (radi blokiranja RNaza, RiboLock RNase inhibitor (Thermo Scientific)), 1 µl enzima reverzne transkriptaze (RevertAid H Minus Reverse Transcriptase (Thermo Scientific)) i 2 µl DEPC H₂O te sam 7,5 µl te mješavine dodala u uzorak RNA i inkubirala 45 minuta na 42 °C te 15 minuta na 70 °C. Pri završetku reakcije dodala sam 80 µl DEPC H₂O u svaki uzorak tako da je konačna koncentracija cDNA bila 10 ng/µl.

3.2.15. Odabir početnica za lančane reakcije polimerazom (PCR)

Na raspolaganju su mi bile početnice dizajnirane za gene srodnog kineskog kupusa *B. rapa* (Macrogene). Genom raštike *B. oleracea* var. *acephala* nije sekvenciran, no poznat je genom zelja *B. oleracea* var. *oleracea*. Kako bih odredila koje setove dostupnih *B. rapa* početnica mogu koristiti analizirala sam kompatibilnost koristeći programe Primer-BLAST (Ye i sur., 2012) i Nucleotide-BLAST (Altschul i sur., 1990), te SnapGene (SnapGene® software). Ukratko, tražila sam gen u *B. oleracea* var. *oleracea* najbližiji onome u *B. rapa*, te provjerila koliko efikasno (i da li uopće) se te početnice dizajnirane prema genu *B. rapa* vežu unutar odgovarajućega gena u *B. oleracea* var. *oleracea*. Unijela sam sekvence para početnica u Primer-BLAST, te pronašla sekvencu gena unutar vrste *B. rapa* za koju se taj par početnica veže. Zatim sam sekvencu toga gena (u FASTA formatu) unijela u Nucleotide-BLAST i pronašla gen sa najvećim postotkom sličnosti, po sekvenci nukleotida, u genomu *B. oleracea*

var. *oleracea*. Tu sekvencu sam zatim unijela u SnapGene i napravila test vezanja početnica. Od dostupnih početnica odabrala sam setove početnica za referentne gene i gene vezane uz stresni odgovor, a bazirano na najmanjem broju nepodudaranja.

3.2.16. Lančana reakcija polimerazom (PCR)

Za umnažanje gena metodom PCR korišten je Emerald premix (TaKaRA). Svaka reakcija sadržavala je 7 μ l H₂O, 10 μ l Emerald smjese, 0,5 μ l *forward* (FW) početnice (100 pmol/ μ l), 0,5 μ l *reverse* (REV) početnice (100 pmol/ μ l) za svaki gen i 1 μ l kalupa cDNA (10 ng/ μ l) ili DNA (100 ng/ μ l). Uvjeti reakcije bili su slijedeći: 3 minute na 98 °C početne denaturacije, zatim 40 ciklusa po 10 s na 98 °C (denaturacija), 30 s na 58 °C (vezanje početnica), 60 s na 72 °C (sinteza), te završna sinteza 7 minuta na 72 °C. Uzorci su potom čuvani na 4 °C.

3.2.17. Elektroforeza na agaroznom gelu

Za razdvajanje produkata gena nakon reakcije PCR korišten je 2,5% -tni agarozni gel u puferu 1 $\times$ TBE (3.2.3.16.). Uz uzorke (po 10 μ l) na gel sam nanosila i 3 μ l DNA markera (Quick-Load Purple, 100 pb DNA Ladder, New England BioLabs). Elektroforeza je trajala 40 minuta pri konstantnom naponu od 50 V. Nakon završetka razdvajanja, gelove sam obojala 5 minuta u otopinu etidij bromida (koncentracije 1 μ g/l) i fotografirala na transiluminatoru pod UV svijetlom.

3.2.18. Lančana reakcija polimerazom u realnom vremenu (qPCR)

Kvantitativni PCR, tj. lančanu reakciju polimerazom u realnom vremenu napravila sam koristeći setove početnica za odabrane gene kineskog kupusa koji se vežu i na gene raštike (4.2.7). Po reakciji sam koristila 20 ng cDNA, a svaka reakcija sadržavala je 7,5 μ l qPCR-mix (GoTaq, Promega), 5,1 μ l H₂O, 0,2 μ l FW početnica (100 pmol/ μ l), 0,2 μ l REV početnica (100 pmol/ μ l) i 2 μ l kalupa cDNA (10 ng/ μ l). Uvjeti reakcije bili su slijedeći: 5 minuta na 98 °C početne denaturacije, zatim 40 ciklusa po 5 s na 98 °C (denaturacija) i 10 s na 58 °C (vezanje početnica i sinteza), te na kraju krivulja mekšanja amplikona rađena tako da je temperatura podizana sa 40 °C na 95 °C, brzinom od 0,3 °C/s. Uzorci su zatim čuvani na -20 °C. Za izračun relativne ekspresije gena korištena je $\Delta\Delta$ Ct metoda prema Livak i Schmittgen (2001).

3.2.19. Obrada rezultata

Za odabir kultivara korištena je analiza glavnih komponenti (*principal component analysis* - PCA) i toplinska karta u programu Excel. Metoda PCA korištena je kako bi se vizualizirao odnos između 12 istraživanih varijabli uključujući prirast korijena, biomase,

sadržaj vode i prolina za svaki stresni čimbenik. Ova metoda temelji se na korelaciji između varijabli te grupira uzorke u glavne komponente (engl. principal components - PCs). Metoda daje opis odnosa između varijabli te nam omogućuje vizualizaciju njihovog odnosa, tj. jesu li one slične ili različite. Objekti koji su slični jedan drugome grupirat će se zajedno, dok će oni različiti biti udaljeniji. Budući da je prva analiza pokazala slabi doprinos sadržaja vode napravljena je analiza bez tih varijabli.

Za analizu utjecaja tretmana na oksidativne parametre, aktivnost katalaze i fluorescenciju klorofila korištena je ANOVA ($p \leq 0,05$) te *post-hoc* test najmanje značajne razlike (*least significant difference* - LSD). Promjena ekspresije gena analizirana je T-testom ($p \leq 0,05$). Svi rezultati prikazani su kao srednje vrijednosti odgovarajućeg broja replika zajedno sa standardnom pogreškom.

4. REZULTATI

4.1. Procjena otpornosti kultivara raštike na osmotski i temperaturni stres, te odabir otpornih kultivara

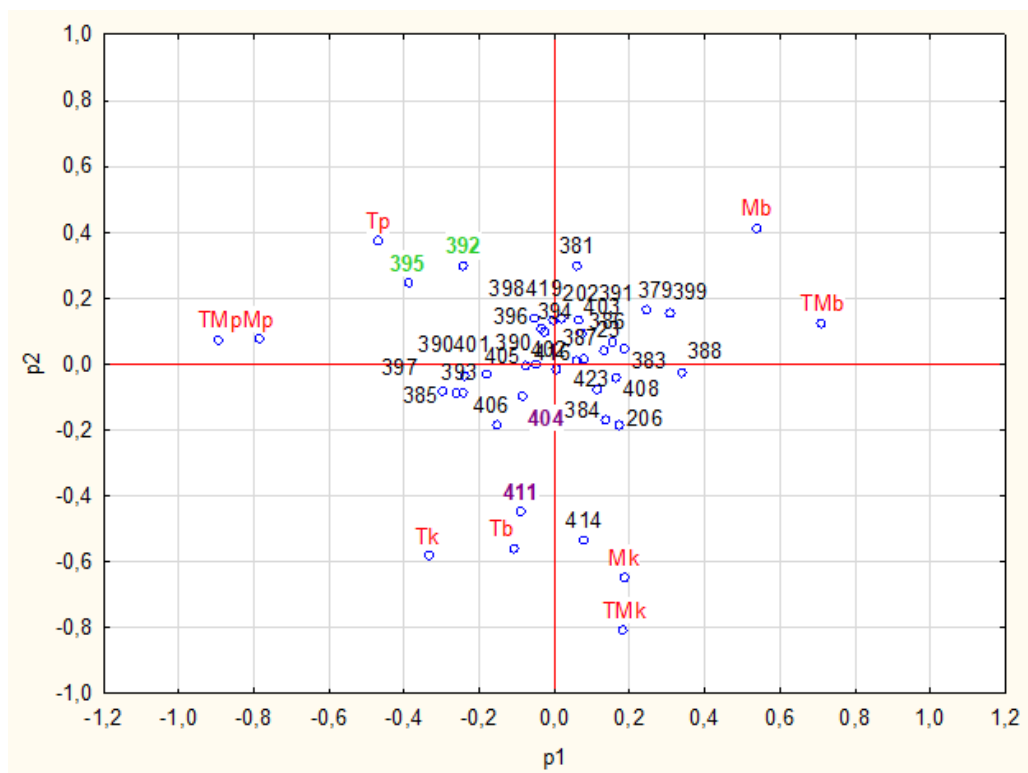
Probir najotpornijih kultivara raštike napravljen je uzimajući u obzir rast korijena, biomasu i količinu vode te sadržaj prolina. U tablici 3 su srednje vrijednosti svih izmjerenih vrijednosti spomenutih parametara za testirane kultivare prikazane u obliku toplinske mape. Intenzitet boje polja sa srednjom vrijednošću ukazuje na udaljenost te vrijednosti od ukupne srednje vrijednosti svih kultivara za taj tretman. Crvena boja prikazuje vrijednosti iznad srednje vrijednosti a plava ispod. Kao najotpornije kultivare smatrala sam one sa najvećim brojem polja obojanih intenzivnije crveno, jer veće vrijednosti rasta korijena, biomase i količine vode ukazuje na biljke otpornije na stres. U slučaju prolina većina kultivara imala je ispodprosječnu količinu prolina jer je na visoku ukupnu srednju vrijednost količine prolina jako utjecao kultivar 385 kod kojega je izmjereno ogromno povećanje prolina naspram kontrole. Ovdje sam gledala kultivare sa što intenzivnijom plavom bojom jer manji sadržaj prolina ukazuje na otpornije biljke.

Analiza toplinske mape (tablica 3) pokazala je izdvajanje kultivara po osjetljivosti. Najotpornijim se pokazao kultivar 414, zatim kultivari 388, 393, 419, 423, 384, 385, 387, 397, 404, nešto manje otporni su bili 206, 386, 396, 399, 405, 406 i 411. Za daljnja istraživanja odabrani su kultivari 404 (lokacija Blato na Cetini) i 411 (otok Iž). Kultivar 404 jer se prema rastu korijena i sadržaju vode pokazao otporniji na izlaganje manitolu dok se kultivar 411 pokazao otporniji na toplinski stres prema svim parametrima. Također morala sam uzeti u obzir i količinu dostupnoga sjemena za ponavljanje pokusa koja je kod ova dva kultivara bila dovoljna. Kao najslabiji u odgovoru na primijenjene stresne tretmane pokazali su se kultivari pod brojevima 390 i 395, zatim 398, 202, 379, 380, 392, 394 i 303. Za daljnje pokuse opet su odabrani oni sa najvećom količinom dostupnoga sjemena, a to su bili 392 (Dubrovnik) koji je bio dosta osjetljiv na izlaganje manitolu i 395 (Mostar) koji je bio osjetljiv i na toplinski stres i na manitol ovisno o gledanom pokazatelju.

Kako bih potvrdila odabir kultivara napravila sam analizu glavnih komponenti PCA koja je grupirala odgovor istraživanih kultivara raštike na stres (Slika 4). Statističku značajnost su pokazale samo dvije glavne komponente (p) koje su i prikazane. Vidljivo je da su se kultivari 392 i 395 (označeni zeleno) odvojile od ostalih na jednu stranu, a 411 i 414 (označeno ljubičasto) na drugu ovisno o svome odgovoru na stresni čimbenik. Kultivar 404 nije se izrazito odvajao ali je bio unutar istog kvadranta s kultivarom 411.

Tablica 3: Toplinska mapa sa podacima biomasa, prirasta korijena, sadržaja vode i sadržaja prolina u svim testiranim kultivarima raštike. Podaci su izraženi kao srednja vrijednost minimalno 10 replika i prikazani kao postotak naspram kontrole. Sve replike bile su unutar 20% od srednje vrijednosti. M - tretman 0,3 M manitolom, T – tretman povišenom temperaturom, TM – kombinacija tretmana 0,3 M manitolom i povišenom temperaturom, sr.vr. – srednja vrijednost. Crvena boja prikazuje vrijednosti iznad ukupne srednje vrijednosti, plava ispod, a jači intenzitet boje govori o većem odstupanju.

Parametar	Biomasa (% kontrole)			Prirast korijena (% kontrole)			Sadržaj vode (% kontrole)			Sadržaj prolina (% kontrole)		
	M	T	TM	M	T	TM	M	T	TM	M	T	TM
IPT-23	46	82	47	34	58	28	82	96	86	569	91	534
IPT-202	50	86	44	43	50	22	82	97	78	564	180	618
IPT-206	41	84	50	63	56	51	81	98	83	254	76	472
IPT-379	46	76	49	48	47	18	65	107	67	130	105	175
IPT-380	35	86	38	48	56	31	79	98	77	1039	140	976
IPT-381	50	72	51	42	53	6	84	98	79	714	162	638
IPT-383	46	73	44	36	59	41	86	96	86	206	102	176
IPT-384	45	96	50	49	63	47	73	99	108	205	126	519
IPT-385	42	88	40	50	65	35	84	97	102	9912	1311	9745
IPT-386	51	89	56	46	57	38	81	97	70	775	153	490
IPT-387	52	87	51	26	77	32	79	99	105	763	85	441
IPT-388	60	98	57	49	54	42	83	99	65	397	76	230
IPT-390	36	65	38	45	60	43	68	95	81	270	169	625
IPT-391	51	81	48	62	49	33	82	93	83	642	248	577
IPT-392	49	81	46	22	61	7	83	98	80	1416	162	1221
IPT-393	50	87	44	40	78	46	86	98	86	1661	173	1029
IPT-394	50	84	42	59	42	42	73	96	84	438	279	621
IPT-395	41	73	41	32	59	27	83	95	71	1740	343	1026
IPT-396	50	86	49	30	69	21	81	95	103	732	129	852
IPT-397	42	89	38	55	69	32	90	101	100	1173	177	1172
IPT-398	45	73	43	38	61	21	81	97	104	681	147	766
IPT-399	59	73	68	63	63	34	84	92	95	582	241	318
IPT-401	43	90	35	54	70	17	78	98	62	927	177	648
IPT-402	48	75	43	52	65	33	89	98	76	770	115	370
IPT-403	53	79	47	44	59	35	85	97	83	633	106	314
IPT-404	49	84	48	70	75	41	86	98	84	822	252	862
IPT-405	49	86	46	55	62	38	86	97	79	847	209	869
IPT-406	47	103	42	49	74	44	76	98	84	1324	163	672
IPT-408	51	82	48	57	60	40	75	96	82	402	85	485
IPT-411	34	107	46	59	82	56	65	101	84	690	113	607
IPT-414	42	91	49	86	85	73	86	100	85	516	81	536
IPT-416	44	88	48	31	77	21	85	100	84	550	67	604
IPT-419	52	103	55	15	82	2	91	101	99	245	148	883
IPT-423	53	84	52	56	67	48	84	102	81	913	80	563
Sr.vr.	47	85	47	47	64	34	81	98	85	985	185	901

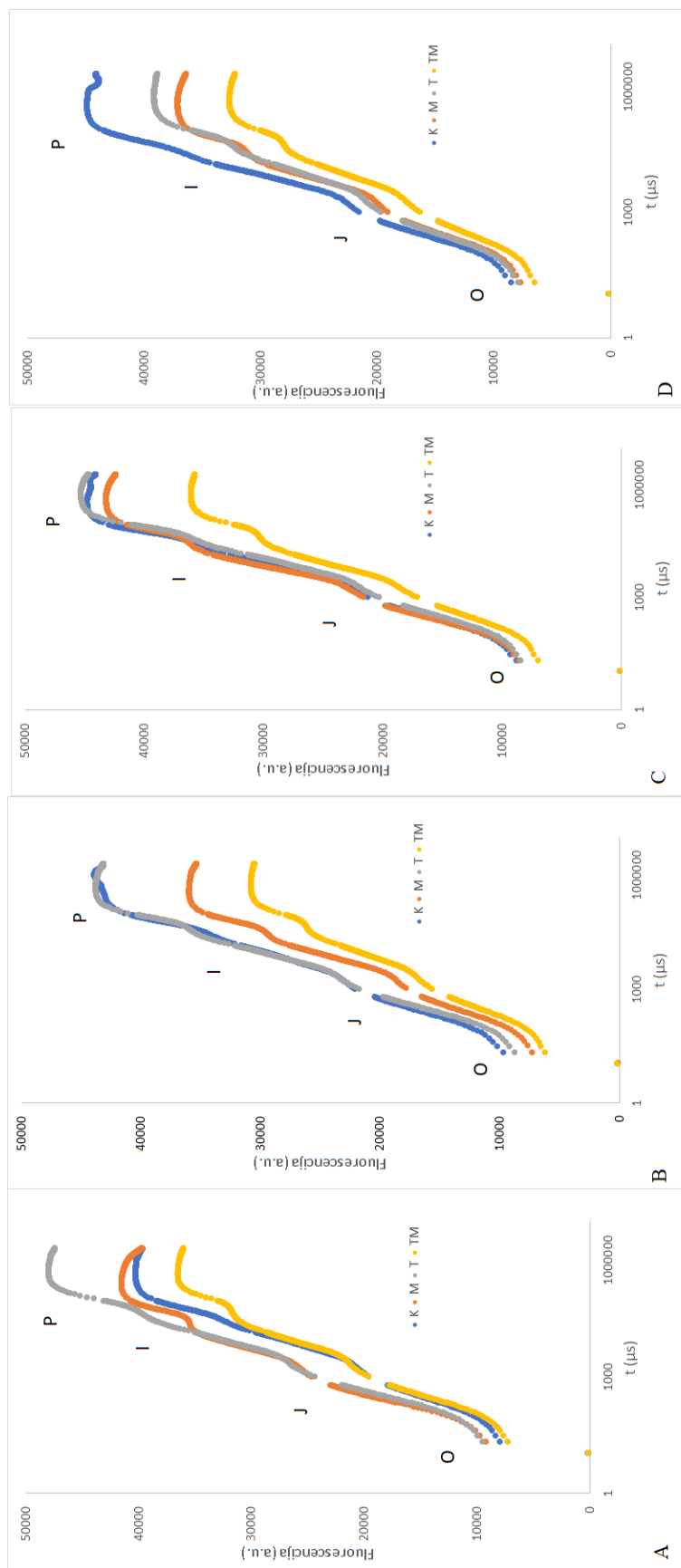


Slika 4: Analiza glavnih komponenti P1 i P2, napravljena sa 9 varijabli - prirast korijena (k), biomasu (b) i prolin (p) izmjereni u različitim kultivarima raštike nakon izlaganja manitolu (M), povišenoj temperaturi (T) i kombiniranom stresu (TM).

4.2. Usporedba manje otpornih i otpornih kultivara

4.2.1. Brza fluorescencija klorofila – OJIP krivulja i povezani parametri

Krivulja rasta fluorescencije kod svih kultivara i tretmana pokazuje sva četiri tipična koraka (O, J, I i P) (slika 5 A-D). Kod kontrolnih biljaka i onih izloženih povišenoj temperaturi krivulje svih kultivara imaju slični rast i raspored pojedinačnih koraka. Kod sva četiri kultivara kombinirani tretman manitolom i povišenom temperaturom najviše je utjecao na smanjenje porasta fluorescencije. To se očituje u blažem rastu krivulje općenito, ali posebno između koraka I i P, što je posljedica toga da im je F_m niži. Biljke iz tretmana manitolom također pokazuju nešto niži porast fluorescencije, no u samo tri kultivara 395, 404 i 411 (slika 5, B-D), dok je kod kultivara 392 tretman povišenom temperaturom skoro jednako utjecao na smanjenje kao i tretman manitolom (slika 5, A).



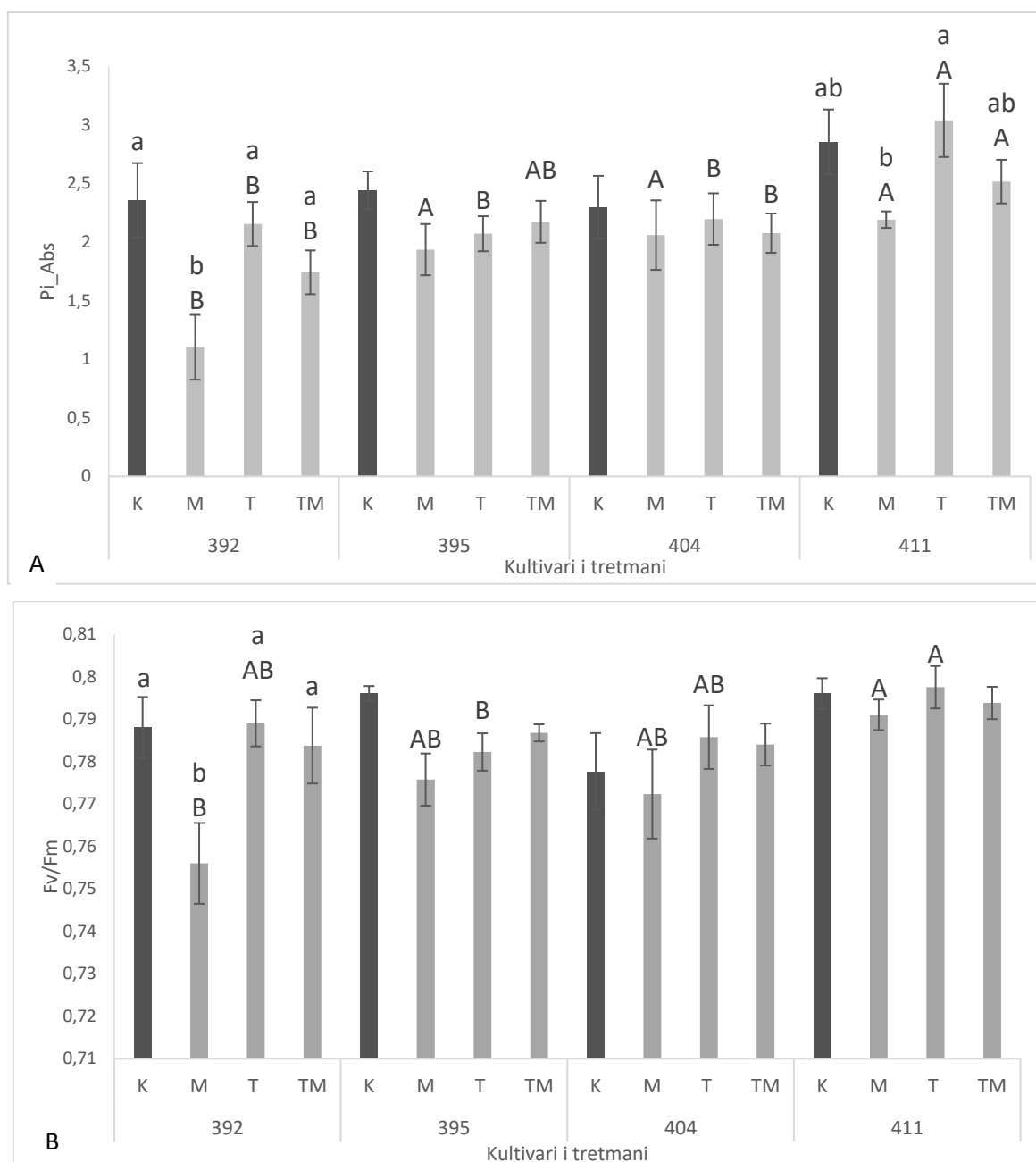
Slika 5: Mjerenje polifaznog rasta fluorescencije klorofila a (OJIP krivulja) za kultivare rašike 392 (A), 395 (B), 404 (C), i 411 (D). K – kontrola, M - tretman 0,3 M manitolom, T – tretman povišenom temperaturom, TM – kombinacija tretmana 0,3 M manitolom i povišenom temperaturom. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti minimalno tri replike.

Indeks fotosintetske učinkovitosti (P_{IABS}) mjeri ukupnu efikasnost fotosintetskog aparata. Kod biljaka kultivara 392 samo je tretman 0,3 M manitolom uzrokovao statistički značajno smanjenje ovoga parametra u odnosu na kontrolu i ostale tretmane koji su imali slične vrijednosti (slika 6, A). Kod biljaka kultivara 395 i 404 nisu pronađene statistički značajne razlike u indeksu fotosintetske učinkovitosti nakon niti jednog tretmana. Kod kultivara 411 najveću vrijednost indeksa fotosintetske učinkovitosti su pokazale biljke nakon tretmana povišenom temperaturom, dok je tretman manitolom smanjio učinkovitost ali navedene promjene nisu bile statistički značajne u odnosu na kontrolne vrijednosti nego samo međusobno (slika 6, A).

Između biljaka različitih kultivara u kontrolnim uvjetima nije bilo statistički značajnih razlika u indeksu fotosintetske učinkovitosti (slika 6, A). Tretman manitolom najviše je smanjio učinkovitost kod biljaka kultivara 392 i to sa statističkom značajnošću u odnosu na vrijednosti kod ostalih. Kod tretmana temperaturom statistički značajno veća vrijednost indeksa fotosintetske učinkovitosti utvrđena je kod biljaka kultivara 411, u odnosu na ostale koji su imali niže vrijednosti. Kod biljaka kultivara 411 i kombinirani tretman manitolom i temperaturom pokazuje statistički značajno veću vrijednost u odnosu na ostale kultivare.

Mjerenje maksimalnog kvantnog prinosa fotosistema II (F_v/F_m) kod kultivara 392 pokazalo je da su biljke iz tretmana manitolom imale statistički najnižu vrijednost u odnosu na kontrolu i ostale tretmane koji se nisu međusobno statistički značajno razlikovali. Kod kultivara 395, 404 i 411 nisu uočene statistički značajne promjene ovoga parametra prilikom primjene tretmana (slika 6, B).

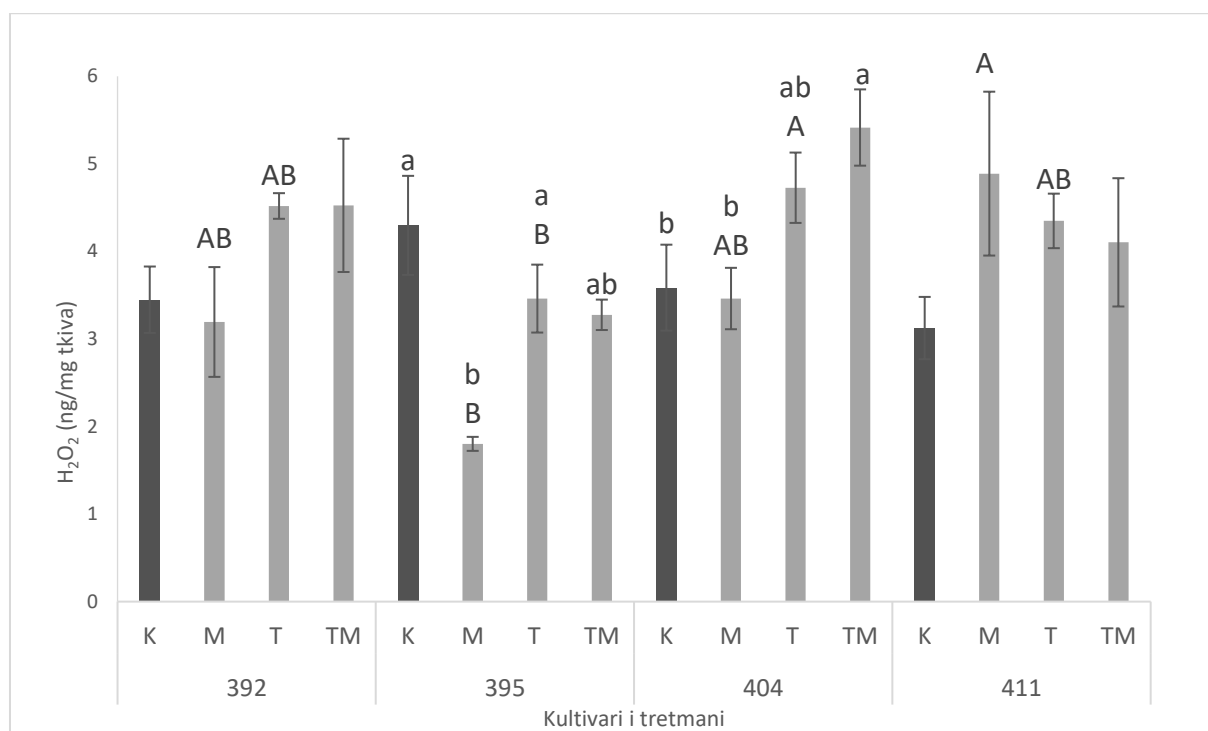
Kod kontrolnih biljaka usporedba vrijednosti F_v/F_m između različitih kultivara nije pokazala statistički značajne razlike (Slika 6, B). Kod tretmana manitolom statistički značajno su se razlikovali kultivar 392 sa najmanjom vrijednosti i kultivar 411 sa najvećom vrijednosti, koje su se međusobno razlikovale dok su kultivari 395 i 404 bili slični međusobno i u odnosu na druga dva kultivara. Tretman povišenom temperaturom uzrokovao je statistički značajno veće vrijednosti F_v/F_m u biljaka kultivara 411 u odnosu na sve ostale koji se međusobno nisu razlikovali. Kombinirani tretman manitolom i povišenom temperaturom nije doveo do statistički značajne razlike u vrijednostima F_v/F_m između kultivara.



Slika 6: Indeks fotosintetske učinkovitosti – Pi_Abs (A) i maksimalni kvantni prinos fotosistema II – Fv/Fm (B) izmjeren kod različitih kultivara raštike (392, 395, 404 i 411) izloženih stresu. K – kontrola, M - tretman 0,3 M manitolom, T – tretman povišenom temperaturom, TM – kombinacija tretmana 0,3 M manitolom i povišene temperature. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti minimalno tri replike sa pripadajućim standardnim pogreškama. Mala slova označuju statističku razliku u odgovoru na tretmane unutar pojedinog kultivara, a velika slova označuju statističku razliku u odgovoru na isti tretman između kultivara (ANOVA, $p < 0,05$).

4.2.2. Sadržaj vodikova peroksida

U kultivarima 392 i 411 nije bilo statistički značajne razlike u količini vodikova peroksida nakon primjene tretmana (slika 7). Kod kultivara 395 statistički značajno više vodikova peroksida imali su uzorci kontrole i tretmana povišenom temperaturom, nešto manje uzorci iz kombiniranoga tretmana manitolom i povišenom temperaturom, a statistički značajno najmanje uzorci iz tretmana manitolom. Kultivar 404 imao je statistički značajno najviše vodikova peroksida u uzorcima iz kombiniranoga tretmana, a najmanje u uzorcima kontrole i tretmana manitolom. Uzorci iz tretmana povišenom temperaturom imali su vrijednost sličnu vrijednostima kod svih drugih tretmana.



Slika 7: Sadržaj vodikova peroksida u uzorcima različitih kultivara raštike (392, 395, 404 i 411) izloženih stresu. K – kontrola, M - tretman 0,3 M manitolom, T – tretman povišenom temperaturom, TM – kombinacija tretmana 0,3 M manitolom i povišene temperature. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti minimalno tri replike sa pripadajućim standardnim pogreškama. Mala slova označuju statističku razliku u odgovoru na tretmane unutar pojedinog kultivara, a velika slova označuju statističku razliku u odgovoru na isti tretman između kultivara (ANOVA, $p < 0,05$).

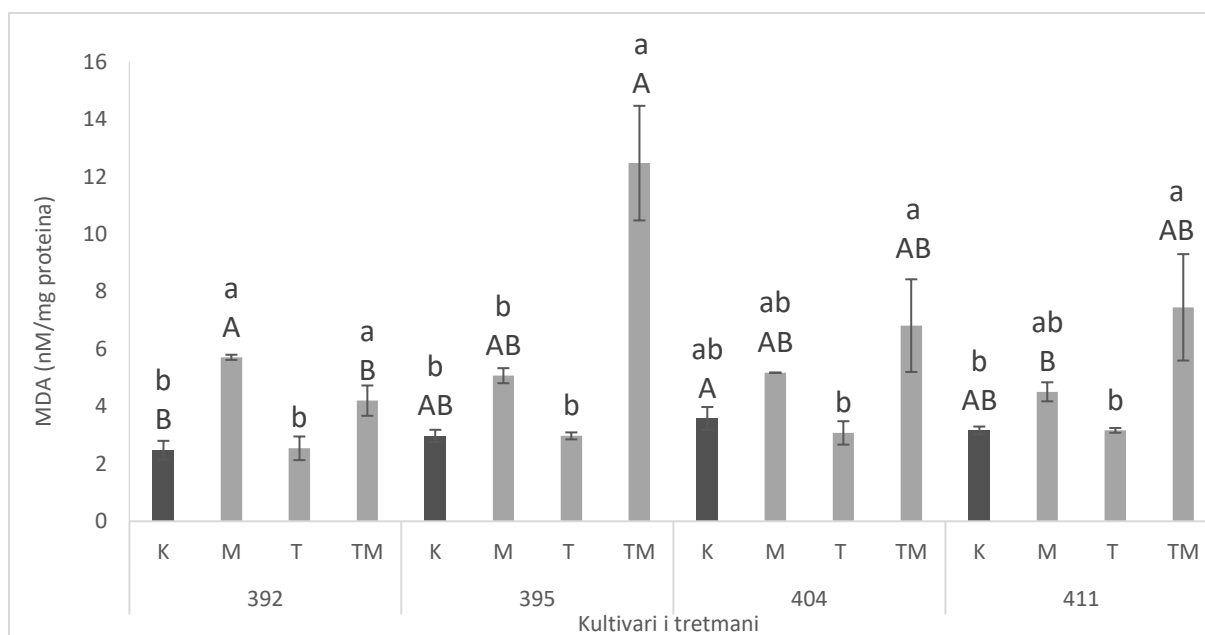
Uzorci kontrole i kombiniranoga tretmana 0,3 M manitolom i povišenom temperaturom nisu pokazali statistički značajne razlike između kultivara (slika 7). Tretman manitolom najviše je povišio količinu vodikova peroksida u kultivaru 411. Kultivari 392 i 404 imali su nešto manju vrijednost i statistički sličnu onoj kod kultivara 411, ali i kultivara 395 koji je imao najmanju količinu vodikova peroksida. Tretman povišenom temperaturom najviše je povećao količinu vodikova peroksida u kultivaru 404. Kultivari 392 i 411 imali su nešto manju količinu i

statistički sličnu vrijednost kultivaru 404, ali i kultivaru 395 koji je i u tretmanu povišenom temperaturom imao najmanju količinu vodikova peroksida

4.2.3. Stupanj lipidne peroksidacije

Kod kultivara 392 biljke tretirane 0,3 M manitolom, i kombiniranim tretmanom manitolom i povišenom temperaturom imaju značajno povišenu razinu lipidne peroksidacije u odnosu na kontrolu i biljke tretirane povišenom temperaturom koje imaju slične vrijednosti (slika 8). Kod kultivara 395 jedino značajno povećanje stupnja lipidne peroksidacije u odnosu na kontrolu je izmjereno u biljkama nakon kombiniranoga tretmana manitolom i povišenom temperaturom, dok su biljke tretirane samo manitolom i povišenom temperaturom imale nešto veće vrijednosti ali ne i statistički značajno. Kod tretiranih biljaka kultivara 404 nisu uočene značajne promjene u stupnju lipidne peroksidacije u odnosu na kontrolu. Veći stupanj lipidne peroksidacije izmjeren je nakon tretmana kombiniranim stresom u odnosu na tretman povišenom temperaturom. Kod kultivara 411 zabilježena je statistički značajno veća količina lipidne peroksidacije u kombiniranom tretmanu manitolom i povišenom temperaturom, u odnosu na vrijednosti kod kontrole i tretmana temperaturom, dok se tretman manitolom nije značajno razlikovao od ostalih.

Usporedbom linija međusobno, u kontrolnim uvjetima najveću razinu lipidne peroksidacije imale su biljke kultivara 404 ali razlika je bila značajna samo u odnosu na biljke kultivara 392 (slika 8). Kod biljaka tretiranih manitolom najvišu razinu lipidne peroksidacije imao je kultivar 392, ali značajno različitu samo u odnosu na kultivar 411 koji je imao najnižu vrijednost. Nakon tretmana temperaturom nema razlike u stupnju lipidne peroksidacije među linijama. Kombinirani tretman manitolom i povišenom temperaturom uzrokovao je najveće povećanje stupnja lipidne peroksidacije u kultivaru 395, no najmanje u kultivaru 392. Kultivari 404 i 411 pokazuju vrijednosti koje su slične međusobno i sa druga dva kultivara.



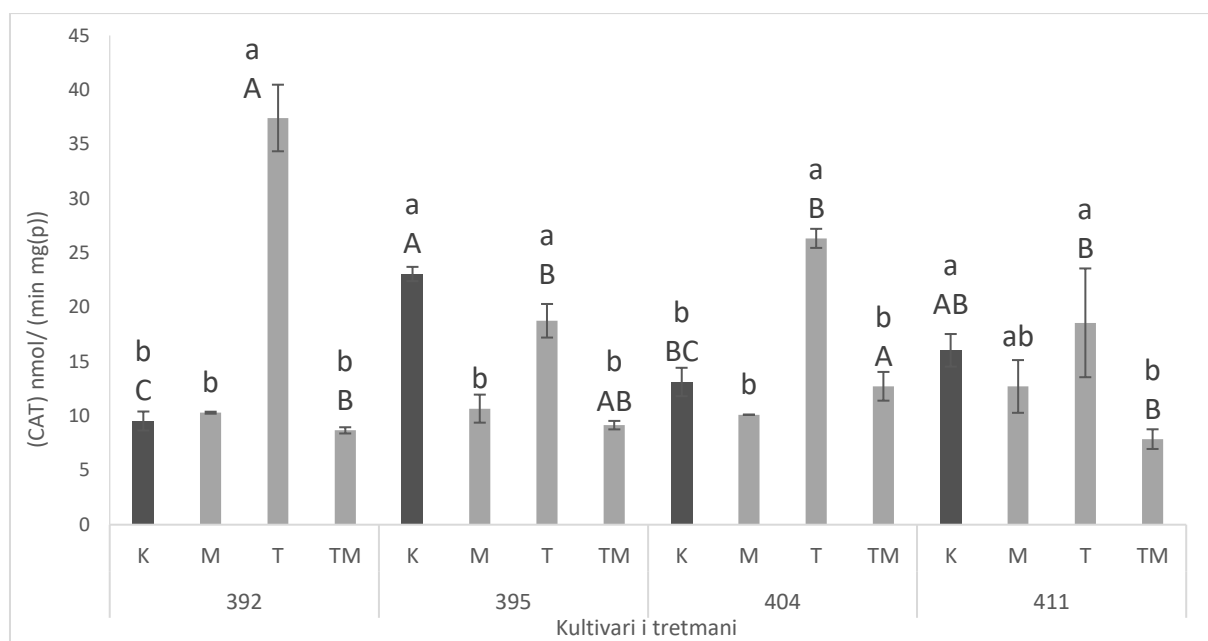
Slika 8: Stupanj lipidne peroksidacije izražen kao MDA u uzorcima različitih kultivara raštike (392, 395, 404 i 411) izloženih stresu. K – kontrola, M - tretman 0,3 M manitolom, T – tretman povišenom temperaturom, TM – kombinacija tretmana 0,3 M manitolom i povišene temperature. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti minimalno dvije replike sa pripadajućim standardnim pogreškama. Mala slova označuju statističku razliku u odgovoru na tretmane unutar pojedinog kultivara, a velika slova označuju statističku razliku u odgovoru na isti tretman između kultivara (ANOVA, $p < 0,05$).

4.2.4. Aktivnost katalaze

U kultivaru 392 tretman povišenom temperaturom dao je statistički značajno povećanje aktivnosti katalaze, dok kod drugih tretmana i kontrole ovoga kultivara nisu pronađena statistički značajna odstupanja (slika 9). Uzorci kultivara 395 dali su statistički značajno povećanje aktivnosti katalaze u tretmanu povišenom temperaturom, te kod kontrole. Tretmani manitolom i kombiniranim stresom 0,3 M manitola i povišene temperature pokazali su manju aktivnost katalaze naspram uzoraka kontrole i tretmana povišenom temperaturom sa statističkom značajnošću. U kultivaru 404 tretman povišenom temperaturom dao je statistički značajno povećanje aktivnosti katalaze, a kontrolni uzorci i tretmani manitolom i kombiniranim stresom nisu pokazali statistički značajna odstupanja. Kod kultivara 411 statistički značajno veću aktivnost katalaze imali su uzorci kontrole i tretmana povišenom temperaturom. Tretman manitolom pokazao je sličnosti u rezultatima svih ostalih uzoraka, a uzorci iz tretmana kombiniranim stresom imali su statistički značajno najmanju aktivnost katalaze.

Kontrolni uzorci različitih kultivara pokazali su vrlo različite aktivnosti katalaze. Najveću aktivnost pokazali su uzorci kultivara 395, zatim uzorci kultivara 411 (slika 9). Uzorci toga

kultivara imali su sličnosti i sa nešto manje aktivnom katalazom kultivara 404, dok su statistički značajno najmanju aktivnost katalaze imali uzorci kultivara 392. Tretman manitolom nije dao statistički značajne razlike između kultivara. Povišena temperatura statistički značajno je povećala aktivnost katalaze kultivara 392, no ne i kod ostalih kultivara. Uzorci iz kombiniranoga tretmana manitolom i povišenom temperaturom pokazali su najviše povećanje aktivnosti katalaze u kultivaru 404. Kultivar 395 imao je nešto nižu aktivnost koja dijeli sličnosti sa vrijednosti kultivara 404, ali i vrijednostima statistički najmanje aktivnih katalaza kultivara 392 i 411.

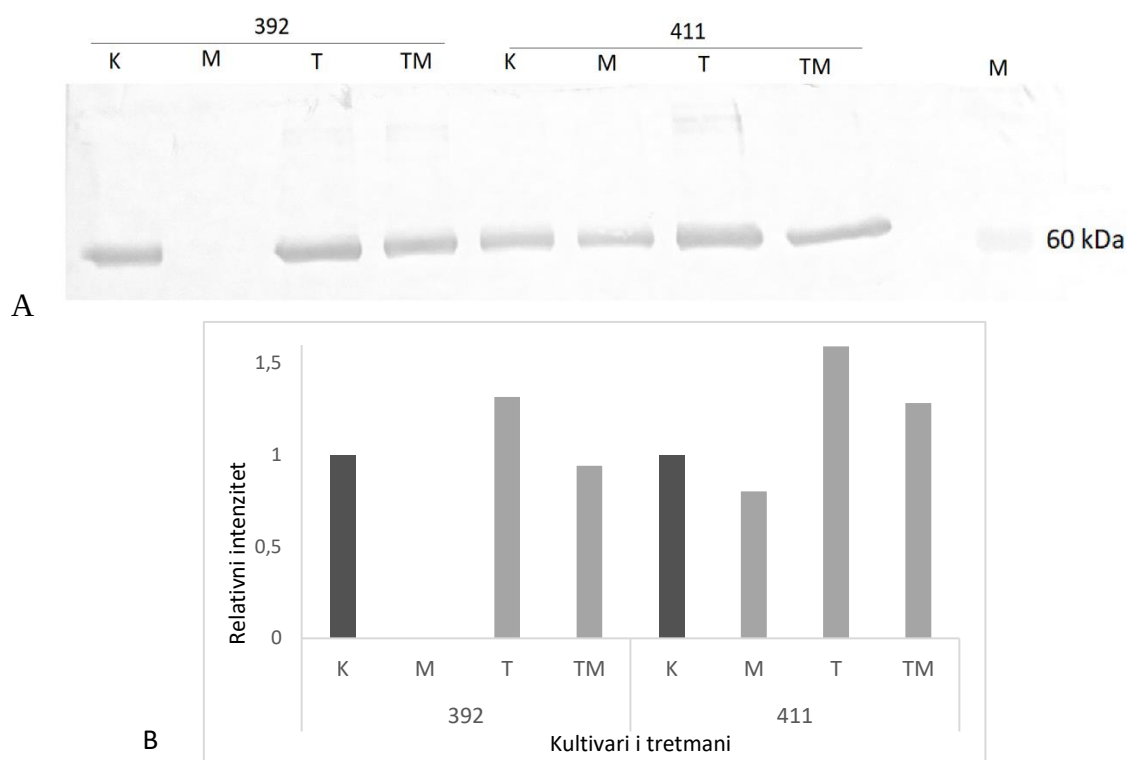


Slika 9: Aktivnost katalaze (CAT) u uzorcima različitih kultivara raštike (392, 395, 404 i 411) izloženih stresu. K – kontrola, M - tretman 0,3 M manitolom, T – tretman povišenom temperaturom, TM – kombinacija tretmana 0,3 M manitolom i povišene temperature. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti minimalno dvije replike sa pripadajućim standardnim pogreškama. Mala slova označuju statističku razliku u odgovoru na tretmane unutar pojedinog kultivara, a velika slova označuju statističku razliku u odgovoru na isti tretman između kultivara (ANOVA, $p < 0,05$).

4.2.5. Imunodetekcija proteina na membrani

Analiza količine šaperona HSP 70 u kultivaru 392 i 411 imunokemijskom detekcijom na membrani pokazala je da je tretman povišenom temperaturom inducirao povećanje količine tih proteina naspram kontrole i to u oba kultivara. To je jasno vidljivo po širini vrpca na membranama (slika 10, A), no potvrđeno je i mjerenjem intenziteta bandova (slika 10, B). Kod osjetljivoga kultivara 392 šaperon HSP70 u tretmanu 0,3 M manitolom uopće nije detektiran (slika 10, A i B). U otpornom kultivaru 411 tretman manitolom smanjio je količinu šaperona HSP70 naspram kontrole. Tretman kombiniranim stresom manitola i povišene temperature

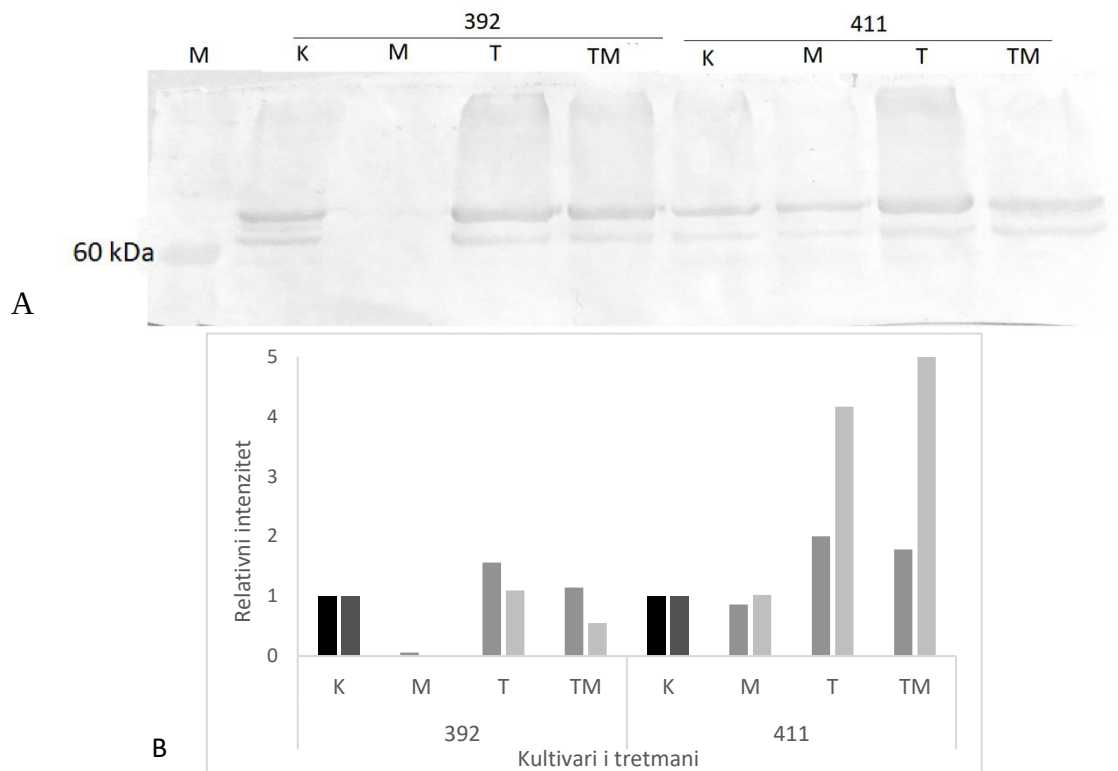
također pokazuje razlike između osjetljivoga i otpornoga kultivara. Kultivar 392 pokazuje smanjenu količinu šaperona HSP70, no kultivar 411 povećanje.



Slika 10: Imunodetekcija proteina HSP70 na membrani (A) i njegov relativan intenzitet (B). Korišteni su proteinski ekstrakti klijanaca raštike kultivara 392 i 411 izloženih stresu (A) i relativni intenzitet. K – kontrola, M - tretman 0,3 M manitolom, T – tretman povišenom temperaturom, TM – kombinacija tretmana 0,3 M manitolom i povišene temperature, M – marker s vidljivim proteinom od 60 kDa. Intenzitet je prikazan u odnosu na kontrolu svakog kultivara koja ima vrijednost 1.

Šaperon HSP90 u tretmanu manitolom kultivara 392 uopće nije vidljiv kao vrpca na membrani (slika 11, A), a mjerenjem intenziteta detektirana je samo mala do zanemariva količina (slika 11, B). U kultivaru 392 tretman povišenom temperaturom malo je povišio količinu HSP90, a kombinacija manitola i povišene temperature nije pokazao velike razlike naspram kontrole. U kultivaru 411 tretman manitolom nije utjecao na količinu HSP90, no tretmani povišenom temperaturom i kombinirani tretman jesu (Slika 11, A i B). Na membrani (slika 11, A) vidljive su dvije vrpce detektirane protutijelima na HSP90. Vrpce nešto veće molekularne mase intenzivnije su. Te dvije detektirane varijante HSP90 pokazuju nešto drugačije ponašanje u odgovoru na tretmane naspram kontrole. U kultivaru 392 vrpce veće molekularne mase pokazuju veći intenzitet naspram kontrole u tretmanima povišenom temperaturom i kombiniranim tretmanom (slika 11, B). S druge strane kod kultivara 411 vrpce

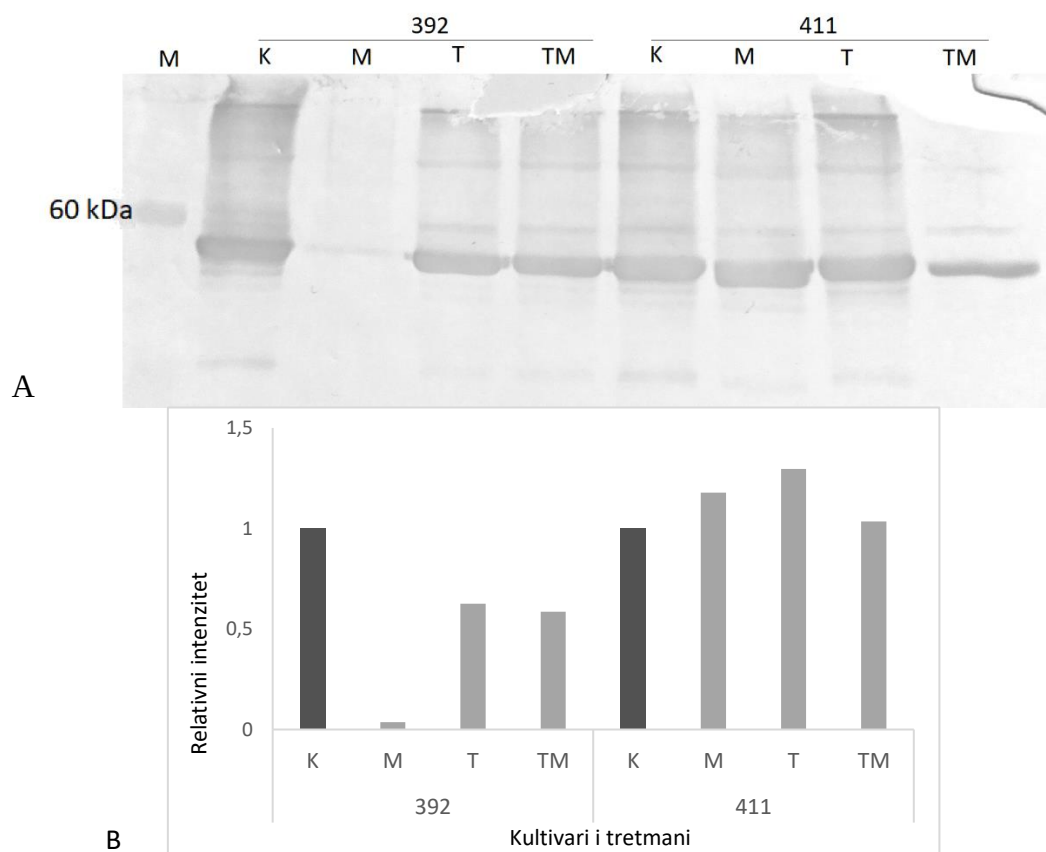
manje molekularne mase pokazuju mnogo veći intenzitet naspram kontrole nego vrpce veće molekularne mase.



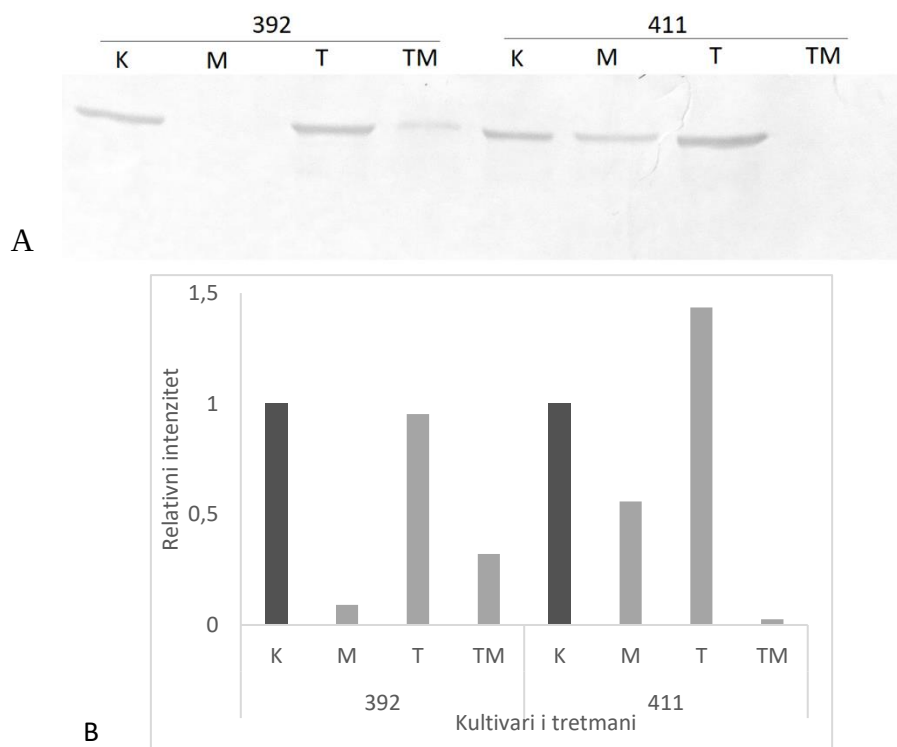
Slika 11: Imunodetekcija proteina HSP90 na membrani (A) i njegov relativan intenzitet (B). Korišteni su proteinski ekstrakti klijanaca raštike kultivara 392 i 411 izloženih stresu. K – kontrola, M - tretman 0,3 M manitolom, T – tretman povišenom temperaturom, TM – kombinacija tretmana 0,3 M manitolom i povišene temperature, M – marker s vidljivim proteinom od 60 kDa. Intenzitet je prikazan u odnosu na kontrolu svakog kultivara koja ima vrijednost 1.

Detekcija količine velike podjedinice proteina Rubisco (RbcL) pokazuje da su u kultivaru 392 svi tretmani doveli do smanjenja količine naspram kontrole, posebno tretman manitolom gdje je taj protein jedva detektiran (slika 12, A i B). Nasuprot tome u kultivaru 411 došlo je do povećanja količine RbcL u tretmanu povišenom temperaturom i u uzorcima iz tretmana manitolom. Kombinirani stres manitola i povišene temperature nije pokazao razliku naspram kontrolnih uzoraka (slika 12).

Količina aktina jako je varirala u svim uzorcima kultivara 392 u usporedbi sa kontrolom (slika 13). U tretmanu manitolom i kombiniranim tretmanim manitola i povišene temperature došlo je do smanjenja, dok u tretmanu povišenom temperaturom nije bilo velike razlike (slika 13, B). Kod kultivara 411 količina aktina je također smanjena u tretmanima manitolom i kombiniranom tretmanu, no u tretmanu povišenom temperaturom povećala je količinu aktina (slika 13, B).



Slika 12: Imunodetekcija velike podjedinice proteina Rubisco (RbcL) na membrani (A) i njegov relativan intenzitet (B). Korišteni su proteinski ekstrakti klijanaca raštike kultivara 392 i 411. K – kontrola, M - tretman 0,3 M manitolom, T – tretman povišenom temperaturom, TM – kombinacija tretmana 0,3 M manitolom i povišene temperature, M – marker s vidljivim proteinom od 60 kDa. Intenzitet je prikazan u odnosu na kontrolu svakog kultivara koja ima vrijednost 1.



Slika 13: Imunodetekcija proteina aktina na membrani (A) i njegov relativan intenzitet (B). Korišteni su proteinski ekstrakti klijanaca raštike kultivara 392 i 411. K – kontrola, M - tretman 0,3 M manitolom, T – tretman povišenom temperaturom, TM – kombinacija tretmana 0,3 M manitolom i povišene temperature, M – marker s vidljivim proteinom od 60 kDa. Intenzitet je prikazan u odnosu na kontrolu svakog kultivara koja ima vrijednost 1.

4.2.6. Izolacija nukleinskih kiselina

Iz klijanaca oba kultivara raštike i iz kineskog kupusa, nakon 24 satnog izlaganja tretmanima izolirala sam RNA visoke koncentracije i čistoće. Koncentracija RNA u uzorcima bila je u rasponu od 144 – 658 ng/μl (tablica 4). Koncentracija izolirane RNA iz kineskoga kupusa bila je u rasponu 149,2 – 588,2 ng/μl. Omjeri apsorbancije svih uzoraka na valnim duljinama od 280 nm, 260 nm i 230 nm su indikatori čistoće izolirane RNA ili DNA. Za RNA idealan omjer 260/280 je oko 2,0. Svi izolirani uzorci imaju taj omjer u rasponu od 1,98 – 2,18 što znači da su izolirane RNA dobre čistoće. Omjer 260/230 za izoliranu RNA pogodne čistoće bi trebao biti u rasponu od 2,0 – 2,2. Taj omjer za sve uzorke je u rasponu od 1,88 – 2,37.

Genomsku DNA (gDNA) izolirala sam iz kontrolnih uzoraka. Iz oba kultivara raštike izolirala sam gDNA koncentracije oko 450 ng/μl, dok je gDNA iz kineskoga kupusa bila koncentracije 98,7 ng/μl (tablica 5). Omjer 260/280 je za sve uzorke bio između 1,97 – 2,0. Taj

omjer za DNA je idealno oko 1,8 što znači da je izolirana DNA dobre čistoće. Omjer 260/230 u rasponu je od 2,37 – 2,38 što su također prihvatljive vrijednosti.

Tablica 4: Koncentracije izolirane mRNA iz dva kultivara raštike *Brassica oleracea* var. *acephala* (392 i 411) i kineskog kupusa *Brasicca rapa* (BR), te pripadajući omjeri apsorbancije tih uzoraka na 280 nm, 260 nm i 230 nm. Za kultivar 392 i kineski kupus izolirane su RNA iz tri biološke replike, dok su za kultivar 411 izolirane RNA za dvije nezavisne biološke replike. K – kontrola, M - tretman 0,3 M manitolom, T – tretman povišenom temperaturom, TM – kombinacija tretmana 0,3 M manitolom i povišenom temperaturom.

	Tretman	mRNA (ng/ μ l)	A (260/280)	A (260/230)
392	K	511,4	2,15	2,19
		515	2,09	1,9
		426,9	2,08	2,13
	M	561,2	2,17	1,9
		477,3	2,07	2,19
		461,1	2,05	1,98
	T	228,9	2,17	1,9
		413	2,05	1,88
		496,3	2,14	2,01
	TM	144,5	2,11	1,77
		423,9	1,98	1,68
		427,8	2,08	2,11
411	K	478,5	2,07	2,16
		658,1	2,17	2,28
	M	458,6	2,07	2,15
		446,3	2,08	2,16
	T	289,3	2,13	2,16
		493,5	2,17	2,13
	TM	319,6	2,11	2,03
		514,1	2,11	1,95
BR	K	180	2,1	1,98
		176	2,19	2,11
		250,8	2,14	2,27
	M	588,2	2,18	1,77
		385,1	2,12	2,17
		250,8	2,14	2,27
	T	168,5	2,17	1,9
		160,6	2,18	2,11
		304,4	2,11	2,05
	TM	234,7	2,16	2,37
		149,2	2,17	2,21
		298,3	2,15	2,34

Tablica 5: Koncentracije izolirane genomske DNA iz dva kultivara raštike *Brassica oleracea* var. *acephala* (392 i 411) i kineskog kupusa *Brassica rapa* (BR), te pripadajući omjeri apsorbancije tih uzoraka na 280 nm, 260 nm i 230 nm. K – kontrola, M - tretman 0,3 M manitolom, T – tretman povišenom temperaturom, TM – kombinacija tretmana 0,3 M manitolom i povišenom temperaturom.

	DNA (ng/μl)	A (260/280)	A (260/230)
392	462,4	1,97	2,38
411	446,1	1,98	2,39
BR	98,7	2	2,37

4.2.7. Početnica za gene *OGIO*, *PUX*, *ACT7*, *NAC041* i *NAC084* iz kineskog kupusa vežu se na gene raštike

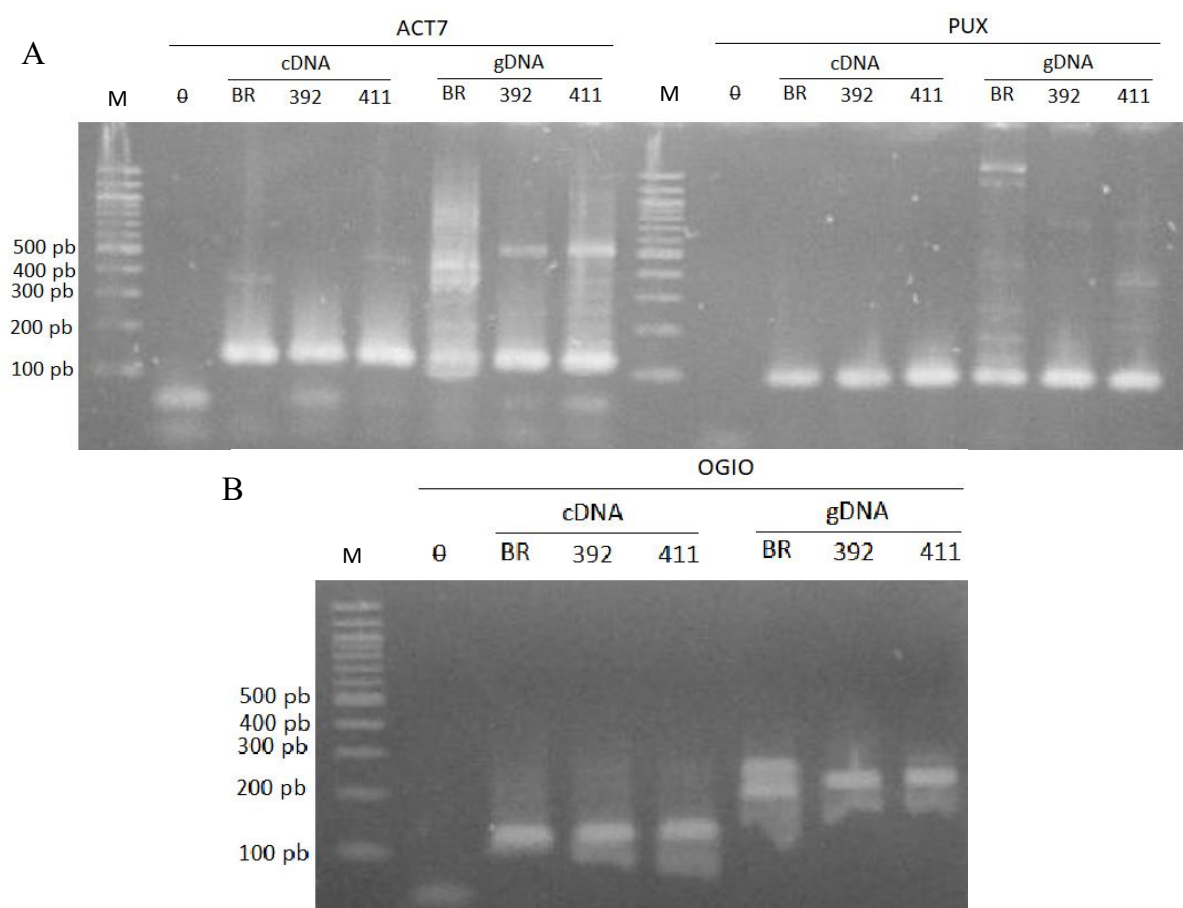
Kako bi odabrala početnice dizajnirane za gene kineskog kupusa *B. rapa* analizirala sam njihovo prijanjanje na gene kupusa *Brassica oleracea* var. *oleracea* (tablica 6). Pronađena su tri potencijalna referentna gena od kojih se početnice za gene *OGIO* i *PUX* potpuno podudaraju a početnice za gen *ACT7* imaju po jedno nepodudaranje. Također pronađena su i dva gena asocirana sa stresnim odgovorom u biljaka (transkripcijski faktori) od kojih *NAC041* ima jedno nepodudaranje, a *NAC084* dva, po jedno u svakoj početnici.

Tablica 6: Nazivi gena odabranih početnica, njihove sekvence, očekivana veličina umnoženoga fragmenta i broj nepodudaranja sekvenci sa veznim mjestima u genima *Brassica oleracea* var. *oleracea*.

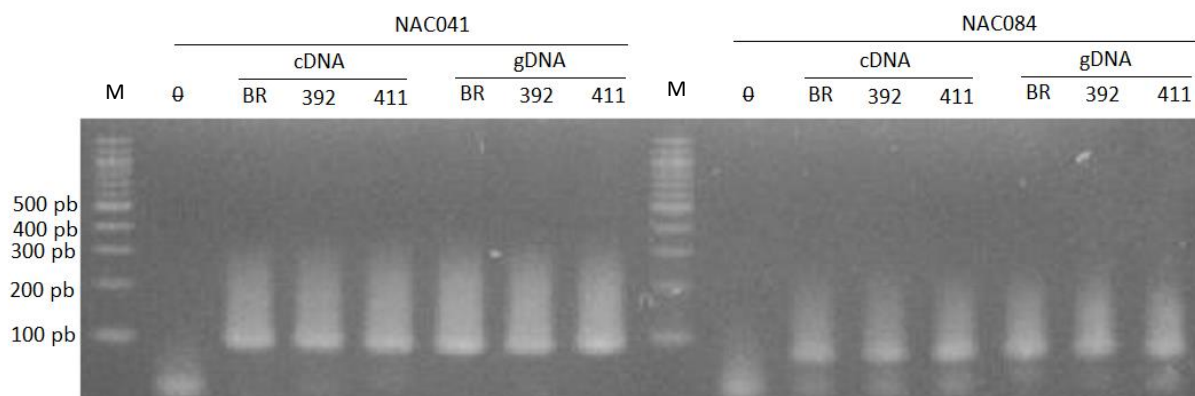
Gen	Sekvenca 5' - 3'		Veličina fragmenta u bp	Broj nepodudaranja u FW	Broj nepodudaranja u REV
<i>OGIO</i>	FW	CAGTATCGTAGCTGAGGTAGC	121	0	0
	REV	AGAACGGAACACATACTTGACTC			
<i>PUX</i>	FW	CAAACCCAAAGAGGTTGTTGC	86	0	0
	REV	TCATGTCGTTGTCTTCCAAGG			
<i>ACT7</i>	FW	GGGCGTACTACTGGTATTGTG	128	0	1
	REV	GAATCAGTGAGGTCCCTACC			
<i>NAC041</i>	FW	CGAAGACGACAACAAGAGTGC	92	1	0
	REV	GAGTCACATTCAAATCGCAGC			
<i>NAC084</i>	FW	ACTAAGGTGTTTGGAGAATGGG	78	1	1
	REV	TGGTTTCCTCTGTCTTCTCC			

Nadalje, testirala sam pogodnost odabranih početnica za umnažanje gena raštike (*Brassica oleracea* var. *acephala*). Koristeći gDNA i komplementarnu DNA (cDNA) kao kalup u PCR-u svi setovi odabranih početnica uspješno su poslužili za umnažanje gena raštike (slika 14 i 15). U svim uzorcima cDNA umnožen je fragment gena *OGIO* (slika 14, B) veličine 120 pb što je i očekivana veličina fragmenata (tablica 6). Na kalupu genomske DNA kultivara

raštike 392 i 411 umnožen je fragment veličine 240 bp, dok su na kalupu genomske DNA *B. rapa* umnožena dva fragmenta, od 200 pb i 240 pb (slika 14, B). Svi uzorci umnoženi *PUX* početnicama na kalupu gDNA i cDNA pokazuju jedan fragment veličine od 90 pb (slika 14, A). U genomu *B. rapa* umnožen je i dodatni fragment na oko 1000 bp. Kod umnažanja početnicama za *ACT* dolazi do višestrukog vezanja početnica u genomu kineskog kupusa i oba kultivara rāštike, te se na gDNA umnaža više fragmenata. Osim očekivanog fragmenta veličine 128 pb u cDNA kineskog kupusa umnožen je dodatni fragment veličine oko 350 pb, a u rāštiki 411 veličine oko 400 pb (slika 14). Umnažanje uzoraka sa početnicama koje se vežu unutar gena *NAC041* i *NAC084* dalo je jedinstvene fragmente za genomsku i cDNA (slika 15). Fragmenti umnoženi sa *NAC041* i *NAC084* početnicama veličine su oko 90 pb što je očekivana veličina fragmenata (tablica 6).



Slika 14: Umnažanje gena *ACT7* i *PUX* (A), te *OGIO* (B) lančanom reakcijom polimerazom na kalupu genomske (gDNA) i komplementarne (cDNA) dva kultivara rāštike *Brassica oleracea* var. *acephala* (392 i 411), te uzoraka kineskog kupusa *Brassicca rapa* (BR). M – DNA marker, Θ – kontrola bez kalupa.



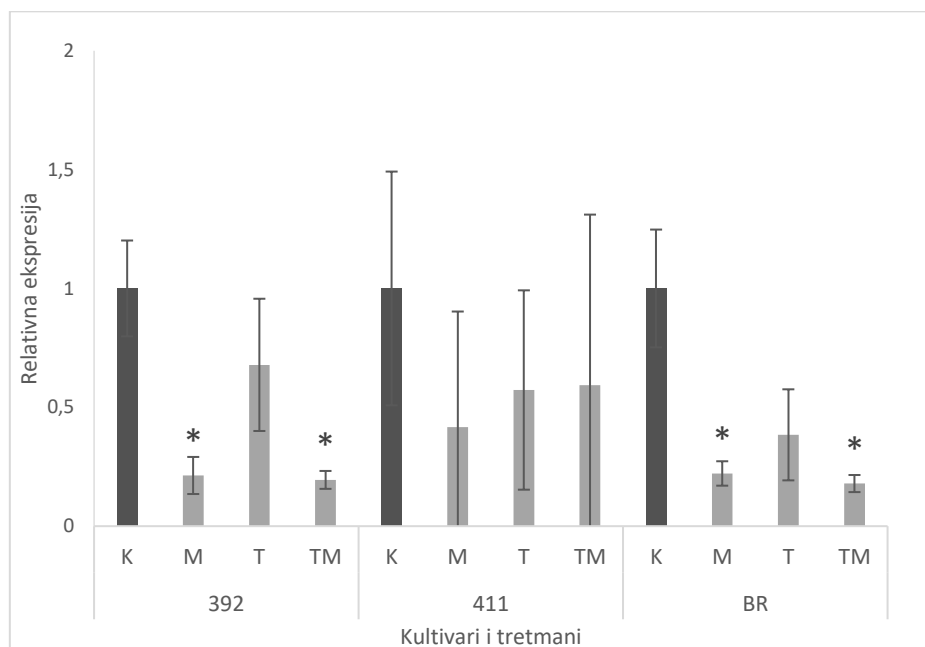
Slika 15: Umnažanje gena *NAC041* i *NAC084* lančanom reakcijom polimerazom na kalupu genomske (gDNA) i komplementarne (cDNA) dva kultivara raštike *Brassica oleracea* var. *acephala* (392 i 411), te uzoraka kineskog kupusa *Brassicca rapa* (BR). M – DNA marker, Θ – kontrola bez kalupa.

4.2.8. Kvantitativna ekspresije gena *NAC041* i *NAC084*

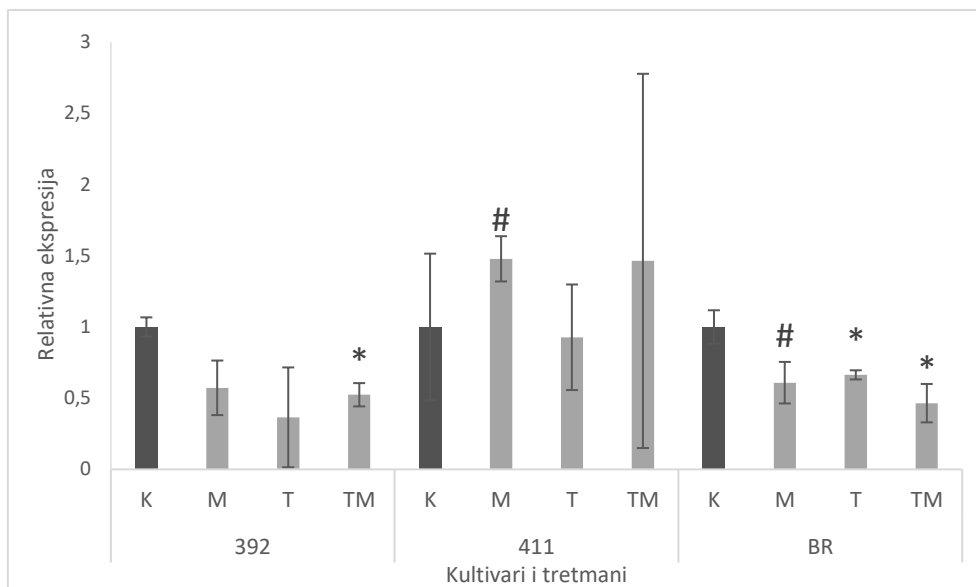
Nakon izlaganja klijanaca stresu s manitolom, povišenoj temperaturi i kombiniranom stresu s manitolom i povišenom temperaturom analizirala sam ekspresiju transkripcijskih faktora *NAC041* i *NAC084*. Uzorci oba kultivara raštike, te kineskog kupusa *B. rapa* pokazali su smanjenu ekspresiju gena *NAC041* prilikom izlaganja biljaka stresnim uvjetima (slika 16). Kultivar raštike 392 pokazuje statistički značajno smanjenje ekspresije gena *NAC041* u tretmanu s manitolom. Izlaganjem kineskog kupusa *B. rapa* tretmanu s manitolom također je došlo do statistički značajnoga smanjenja ekspresije ovoga gena naspram kontrole. Smanjenje ekspresije gena *NAC041* dogodilo se i prilikom izlaganja te vrste kombiniranom stresu manitola i povišene temperature. Kultivar 411 pokazuje manji pad ekspresije gena *NAC041* no za ovaj kultivar analizirane su dvije biološke replike koje međusobno odstupaju, te su potrebne dodatne analize ekspresije. Dobiveni rezultat ukazuje da je regulacija gena *NAC041* u kultivaru raštike 392 slična regulaciji u kineskom kupusu, premda za ekspresiju gena *NAC041* nisu pronađene statistički značajne razlike između kultivara raštike 411 i kineskog kupusa *B. rapa*.

Gen *NAC084* pokazuje statistički značajno smanjenje ekspresija primjenom kombiniranoga tretmana manitola i povišene temperature u kultivaru raštike 392 i u kineskom kupusu *B. rapa* (slika 17). U ekspresiji ovoga gena postoje statistički značajne razliku u odgovoru biljaka na primjenu manitola, naime biljke *B. rapa* imale su značajno manju

ekspresiju gena *NAC084* prilikom primjene toga tretmana naspram biljaka raštike kultivara 411 koje imaju povećanu ekspresiju gena *NAC084* u osmotskom stresu.



Slika 16: Relativna ekspresija gena *NAC041* u dva kultivara raštike *Brassica oleracea* var. *acephala* (392 i 411) i kineskom kupusu *Brassicca rapa* (BR). K – kontrola, M - tretman 0,3 M manitolom, T – tretman povišenom temperaturom, TM – kombinacija tretmana 0,3 M manitolom i povišenom temperaturom. Rezultati su normalizirani na uzorke kontrole, te prikazani kao srednje vrijednosti minimalno dvije replike sa pripadajućim standardnim pogreškama. Simbol * označava statističku razliku tretmana u usporedbi sa kontrolom za pojednu liniju pri $p < 0,05$.



Slika 17: Relativna ekspresija gena *NAC084* u dva kultivara raštike (*Brassica oleracea* var. *acephala*) 392 i 411, kineskom kupusu (*Brassica rapa*) BR. K – kontrola, M - tretman 0,3 M manitolom, T – tretman povišenom temperaturom, TM – kombinacija tretmana 0,3 M manitolom i povišenom temperaturom. Rezultati su normalizirani na uzorke kontrole, te prikazani kao srednje vrijednosti minimalno dvije replike sa pripadajućim standardnim pogreškama. Simbol * označava statističku razliku tretmana u usporedbi sa kontrolom za pojednu liniju, a simbol # označava statističku razliku između dva kultivara raštike i kineskoga kupusa za isti tretman pri $p < 0,05$.

5. RASPRAVA

Sjemenke testiranih kultivara, a onda kasnije i sami klijanci pokazali su veliku raznolikost ne samo između kultivara već i unutar kultivara. Često se radilo o prisutnosti antocijana, razlikama u veličini kotiledona ili cijeloga klijanca. Šamec i sur. (2019) također su se osvrnuli na to, no u njihovom eksperimentu koji se odvijao u hidroponici nije zabilježena prisutnost antocijana. U njihovom slučaju to je pripisano činjenici da su biljke rasle u hidroponici bez primjene tretmana radi čega nisu bile primorane sintetizirati antocijan koji služi za obranu od nepovoljnih uvjeta, no u mojim eksperimentima i klijanci iz kontrole su pokazali prisutnost antocijana. Također postojala je i velika razlika u brzini klijanja, te su klijanci otpornijih kultivara (404, 414) prilikom završetka eksperimenta (pet dana starosti) imali začetke prvih pravih listova. Odabir kultivara za drugi dio pokusa napravila sam prema rezultatima morfoloških parametara prirasta korijena, biomase i sadržaja vode budući da se relativno brzo i jednostavno mjere a pouzdani su pokazatelji učinka stresa kod raštike. Također kao dodatnu potvrdu napravila sam analizu sadržaja prolina koji se isto pokazao kao pouzdani marker osjetljivosti na osmotski stres (Pavlović i sur., 2019).

Tretman povišenom temperaturom općenito je manje utjecao na klijance svih kultivara nego tretman manitolom ili kombinacijom manitola i povišene temperature. To je vidljivo iz rezultata mjerenja prirasta korijena, biomase i sadržaja vode. Na sadržaj vode u svim kultivarima tretman povišenom temperaturom imao je minimalan do nikakav utjecaj (prosječno smanjenje od 2%). Pad turgora jedna je od posljedica izlaganja biljaka povišenoj temperaturi najviše radi povećanja transpiracije (Fahad i sur., 2017), no ovdje se radilo o malenim klijancima zatvorenim u Petrijeve zdjelice unutar kojih je vlaga 100%, te gubitak vlage nije moguć. Stoga održavanje turgora radi rasta transpiracije ne bi trebao biti veliki problem. Tretman manitolom najviše je smanjio sadržaj vode, čak više i od kombiniranoga tretmana. Tu razliku možda je moguće objasniti pojačanim kolanjem vode kroz klijance u uvjetima povišene temperature što zauzvrat pomaže povratiti dio turgora koji je pao kao posljedica osmotskoga stresa. Smanjena biomasa također je jedna od posljedica sušnoga i toplinskoga stresa (Fahad i sur., 2017), no rezultati su pokazali kako je tretman manitolom mnogo više utjecao na smanjenje biomase naspram kontrole nego tretman povišenom temperaturom. Štoviše tretman povišenom temperaturom u prosjeku je smanjio sadržaj vode za samo 15% dok su tretmani manitolom, te kombinirani tretman manitolom i povišenom temperaturom smanjili prosječno 53%. Prirast korijena je karakteristika koja se najviše povezuje sa osmotskim i toplinskim stresom (Fahad i sur., 2017, Hadi i sur., 2014) jer s jedne strane dolazi do smanjenja rasta

korijena (kao i cijele biljke) radi poremećaja cjeloukupnoga metabolizma, no aklimatizacija na te stresne uvjete zahtijeva rast korijena radi bolje apsorpcije vode i mobilnih nutrijenata iz zemlje (Hassan i sur., 2020). Kao i kod drugih parametara, tretman povišenom temperaturom najmanje je smanjio prirast korijena naspram kontrole. No kod ovoga parametra, gledajući prosječne vrijednosti svih kultivara, kombinirani stres najviše je smanjio prirast korijena (66%), što indicira da je združeno djelovanje osmotskoga stresa i povišene temperature jači stresni faktor na rast korijena nego ti stresni čimbenici pojedinačno.

Sadržaj prolina je četvrti parametar korišten za odabir najotpornijega kultivara, jer se u uvjetima različitih stresnih čimbenika kao što su suša, salinitet i akumulira u citosolu, služi za održavanje turgora, zaštitu staničnih komponenti, i kao antioksidans (Buchanan i sur., 2015). Taj parametar često se povezuje s povećanom otpornošću na inducirani stres, no usporedbom biljaka iz roda *Brassica* utvrđeno je da se kod raštike koja se pokazala otpornija na salinitet, inducirao u manjoj količini nego kod osjetljivijeg kineskog kupusa (Pavlović i sur. 2019). Svi tretmani su rezultirali većom akumulacijom prolina u tkivu, no tretman povišenom temperaturom najmanje (povećanje od 85% naspram kontrole) dok su tretmani manitolom i kombinacijom manitola i povišene temperature podigli količinu prolina skoro deset puta (985% i 901% u prosjeku naspram kontrole). S obzirom na važnu ulogu prolina u održavanju turgora tijekom uvjeta koji dovode do dehidracije stanice kao što je osmotski stres zbog izlaganja manitolom ovi rezultati su očekivani.

Po pitanju količine prolina vrlo je zanimljiv kultivar 385 kod kojega je došlo do najvećega povećanja prolina naspram kontrole od svih testiranih kultivara (13 puta prilikom tretmana povišenom temperaturom, te oko 100 puta u tretmanima koji su uključivali manitol). Taj kultivar se nije istaknuo niti po jednom drugom parametru pa bi bilo zanimljivo vidjeti da li su ti rezultati ponovljivi i ako jesu kakav mehanizam dovodi do tako velikog povećanja akumulacije prolina posebno u prisutnosti manitola. Moguće je da se radilo o interferenciji šećera sa uzorcima, jer je utvrđeno da kod korištene kolorimetrijske metode detekcije šećeri također kompleksiraju sa ninhidrinom, što prividno povećava količinu prolina (Magne i Larher, 1992).

Analiza glavnih komponenti najbolje je prikazala izdvajanje osjetljivih kultivara 392 i 395. Također vidljivo je i izdvajanje kultivara 411 po otpornosti, no najveće izdvajanje je pokazao kultivar 414. To je najotporniji kultivar po svim parametrima (analiza glavnih komponenti i toplinske mape) jer je imao najbolje očuvani rast korijena i biomase, najmanji gubitak vode i najmanju akumulaciju prolina no nažalost nije bilo dovoljno sjemena toga

kultivara za daljnji uzgoj i mjerenje biokemijskih i fizioloških parametara. Otporni kultivari 404 i 411 odabrani su jer su bilo relativno otporni ili na manitol ili na temperaturu, a imali su dovoljne količine sjemena. Unatoč tome što nisu bili među najotpornijima, svejedno su prema nizu parametara (lipidna peroksidacija, aktivnost katalaze, ekspresija gena, količina proteina) koje sam analizirala u drugom dijelu pokusa bili značajno bolji u usporedbi sa odabranim osjetljivim kultivarima 392 i osobito 395 koji se pokazao kao najmanje otporan od svih što potvrđuje da je moj odabir kultivara na početku bio dobar za utvrđivanje mehanizama otpornosti. Naravno bilo bi zanimljivo istražiti otpornost kultivara 414.

Iz mojih rezultata čini se da je raštika otpornija na povišenu temperaturu, nego na osmotski stres, no važno je ponovo napomenuti da se ovdje radilo o klijancima. U tome stadiju razvoja biljka se najviše oslanja na unutarnje izvore energije, te ne ovisi toliko o asimilaciji ugljika iz okoliša. Povišena temperatura u ovakvim *in vitro* uvjetima najviše bi utjecala na oštećenja fotosintetskoga aparata i dovela do poremećaja ciklusa asimilata, no kako biljka još ima unutrašnje rezerve koje samo treba razgraditi na oligo- i monomere takva oštećenja bi imala manji utjecaj na biljku, naravno u slučaju kraćeg trajanja stresa. S druge strane dostupnost vode stanicama vrlo je važna u stadiju intenzivnoga rasta, ne samo radi održanja idealne raspodjele metabolita i funkcije stanice, već i radi mehaničke uloge turgora u rastu i elongaciji stanica. Osmotski stres je ono što najviše utječe na smanjenje turgora i time remeti pravilan razvoj klijanca (Xiong i Zhu, 2002). Bilo bi zanimljivo usporediti utjecaj ova dva tretmana na starijim biljkama. Na primjer, Pavlović i sur. (2018) izlagali su odrasle biljke raštike i kineskoga kupusa suši tijekom sedam dana. Nakon toga perioda, biljke kineskoga kupusa pokazivale su znakove teške dehidracije, no raštika vrlo blage.

Klijanci iz tretmana manitolom i kombiniranim tretmanom koji je uključivao manitol bili su vrlo ljepljivi nakon liofilizacije što indicira prisutnost šećera. S obzirom da nisam analizirala sadržaj šećera nije moguće zaključiti da li se radi o endogenim šećerima sintetiziranim za obranu od osmotskoga stresa (Kavi i Srenivasulu, 2014) ili manitolu iz podloge. Naime, Hadi i sur. (2014) usporedili su efekte manitola i polietilen glikola (PEG) na indukciju osmotskoga stresa u klijanaca *Brassica oleracea* te zaključili kako manitol inducira mnogo veći osmotski stres u ranom razvoju biljke jer mnogo lakše ulazi u same stanice od PEG. Stoga je moguće da je „ljepljivost“ uzoraka potekla od manitola iz podloge.

Fluorescencija je jedan od načina disipacije viška apsorbirane energije koja se ne može upotrijebiti za fotokemiju radi poremećaja fotosistema, prijenosa lanca elektrona, integriteta tilakoidnih membrana ili manjka krajnjih akceptora elektrona. Stoga bi teoretski biljke pod

jačim stresom imale veću fluorescenciju, no u stresnim uvjetima dolazi i do drugih procesa koji utječu na smanjenje fotosintetskih pigmenata što bi zapravo dovelo do smanjenja fluorescencije. Prilikom izlaganja nešto starijih biljaka raštike suši pronađeno je da ne dolazi do pada u indeksu fotosintetske učinkovitosti i maksimalnom prinosu po kvantu (Pavlović i sur., 2018). To su neki od razloga zašto se raštika smatra biljkom otpornom na sušu. Međutim odrasle biljke imaju drugačiji odgovor na primjenu sušnoga stresa nego klijanci.

Zanimljivo je da je u slučaju osjetljivoga kultivara 392 došlo upravo do porasta maksimalne fluorescencije u tretmanima povišenom temperaturom i manitolom, što bi ukazivalo na to da su te biljke bile pod stresom. No kod otpornoga kultivara 411 biljke kontrole imale su najveću maksimalnu fluorescenciju, a svi tretmani su ju smanjili što je trenutno, bez dodatnih istraživanja teško objasniti. Možda klijanci otpornih kultivara odmah prilikom nastupanja nepovoljnih uvjeta preusmjeravaju resurse, u ovome slučaju u rast korijena umjesto na sintezu pigmenta, jer kao klijanci ionako imaju rezerve ugljičnih spojeva. Prirast korijena kod kultivara 411 je prilikom primijenjenih tretmana bio mnogo veći nego u kultivaru 392. Suprotno vrijedi za količinu prolina, u kultivaru 392 došlo do mnogo većeg povećanja količine prolina nego u kultivaru 411. Čini se da su primijenjeni tretmani jače djelovali na kultivar 392 nego na otporniji kultivar 411. No sama krivulja fluorescencije bez dodatnih pokazatelja koji bi dali informacije o stanju fotosintetskog aparata te analiza fotosintetskih pigmenata ne daje mnogo informacija. U istraživanju učinka saliniteta na različite vrste kupusa maksimalna fluorescencija je bila značajno smanjena nakon izlaganja kineskog kupusa i raštike solnom stresu ali je smanjenje bilo manje izraženo kod raštike (Pavlović i sur., 2019). Zbog male površine kotiledona kod klijanaca starih 5 dana koje sam mjerila moguće je i da je došlo do pogreške tijekom mjerenja pa bi to svakako trebalo ponoviti.

Indeks fotosintetske učinkovitosti je osjetljiv parametar koji odražava funkcionalnu aktivnost cijelog fotosintetskog aparata jer objedinjuje tri najvažnija procesa prilikom fotosinteze: apsorpciju fotona, zarobljavanje te energije i daljnju predaju u lanac transporta elektrona (Bussotti i sur., 2010). Tretman manitolom je najviše utjecao na smanjenje fotosintetske učinkovitosti kod svih kultivara, a značajno kod kultivara 392 i 411. Usporedbom kultivara i za ostale tretmane, kultivar 411 se izdvaja kao onaj koji je unatoč tretmanima najbolje uspio očuvati učinkovitost fotosintetskog aparata. Maksimalni kvantni prinos je parametar koji mjeri funkcionalnost fotosistema II, dakle nešto specifičniji parametar od prethodnoga. Kao i kod prethodnoga parametra, tretman manitolom je najviše utjecao na smanjenje kvantnog prinosa, ali samo je kod kultivara 392 to bilo statističko značajno. Otporni

kultivar 411 ima veće vrijednosti ovog parametra i na manitolu i na povišenoj temperaturi dok kultivar 404, odabran kao drugi otporni kultivar ima dosta sličnosti s odabranim osjetljivim kultivarom 395.

Sveukupno gledano, kultivar 411 se u stresnim uvjetima pokazao najučinkovitijim u očuvanju fotosintetske učinkovitosti i maksimalnog prinosa po kvantu. Jedino bi se možda trebalo osvrnuti na to da u tretmanu manitolom ovaj kultivar ima dobro održanu funkcionalnost fotosistema II jer maksimalni prinos po kvantu ima više vrijednosti dok fotosintetska učinkovitost cijelog aparata nije jednako očuvana iz čega slijedi da je do poremećaja došlo u nizvodnim procesima, vrlo vjerojatno lancu prijenosa elektrona.

Antioksidativni sustav stanice vrlo je kompleksan, a mehanizam djelovanja ROS vrlo je širok stoga je teško povezati njihove rezultate u jednu cjelinu analizirajući samo tri parametra koja sam mjerila. Katalaza je enzim koji metabolizira vodikov peroksid na vodu i kisik, pa ako stanica ima aktivniju katalazu koja pomaže održati količinu vodikova peroksida unutar tolerantne razine, oštećenja tkiva, na primjer lipidna peroksidacija mogla bi biti smanjena. Međutim postoje i drugi antioksidativni enzimi koji uklanjaju vodikov peroksid, te drugi oblici ROS koji mogu uzrokovati lipidnu peroksidaciju pa je navedena shema odgovora dosta pojednostavljena i treba biti oprezan u zaključivanju. Odgovori kultivara 395 i 404 slažu se s navedenom shemom. U kultivaru 395 uzorci kontrole i tretmana povišenom temperaturom imaju najveću količinu vodikova peroksida, ali isto tako i najveću aktivnost katalaze, međutim i vrlo malu količinu lipidne peroksidacije. Uzorci iz tretmana manitolom imaju najmanje vodikova peroksida, manje aktivnu katalazu i manje lipidne peroksidacije. Međutim uzorci iz kombiniranoga tretmana manitolom i povišenom temperaturom imaju srednju količinu vodikova peroksida naspram drugih tretmana, no najmanje aktivnu katalazu, ali u isto vrijeme u najveću količinu lipidne peroksidacije, pa bi se ta oštećenja mogla pripisati prevelikoj količini vodikova peroksida radi neaktivne katalaze. U kultivaru 404 uzorci kombiniranog tretmana imaju najviše vodikova peroksida, manje aktivnu katalazu i očekivano, najveću količinu lipidne peroksidacije. Najaktivniju katalazu ima tretman povišenom temperaturom, uzorci iz toga tretmana imaju drugu najveću količinu vodikova peroksida, ali zato najmanju količinu lipidne peroksidacije. Kombinirani tretman ovoga kultivara isto slijedi tu shemu, a čak i rezultati preostala dva kultivara kod kojih nije pronađena statistička značajnost u razlici vodikova peroksida pokazuju sličan uzorak.

Općenito uspoređujući primijenjene tretmane i mjerenja oksidativnih parametara uočavaju se neki uzorci. Kombinirani tretman manitolom i povišenom temperaturom je

uzrokovao značajno višu razinu lipidne peroksidacije u svim kultivarima. Tretman manitolom je također podigao razinu lipidne peroksidacije no ne u svim kultivarima sa statističkom značajnošću. Sveukupno gledajući tretmani koji su uključivali manitol uzrokovali su najveća oksidativna oštećenja.

Mjerenje vodikova peroksida ne pokazuje jasan uzorak učinka tretmana. Također ne vidi se niti razlika između odabranih osjetljivih i otpornih kultivara. Naime statistički gledano kultivar 392 po količini vodikova peroksida u tretmanima manitolom i povišenom temperaturom grupiran je s oba otporna kultivara 404 i 411. To se ne može objasniti niti aktivnošću katalaze.

Aktivnost katalaze u svim kultivarima povećana je u tretmanu povišenom temperaturom. Samo mjerenje aktivnosti katalaze obavljano je na istoj temperaturi za sve uzorke stoga ovo povećanje nije moglo biti radi ubrzanja kinetike enzima povećanjem temperature. Štoviše katalitička aktivnost katalaze ne ovisi o povećanju temperature (Aebi i sur., 1984). Znači uzorci iz tretmana povišenom temperaturom imali su veći udio aktivnih katalaza u proteinskom ekstraktu naspram uzoraka iz drugih tretmana. Tretmani koji su uključivali manitol, tj. osmotski stres imali su statistički značajno manju aktivnost katalaze naspram tretmana povišenom temperaturom. Moguće objašnjenje je to da u suši kod raštike dolazi do smanjenja aktivnosti katalaze (Pavlović i sur., 2018), no nije poznato da li je to radi inhibicije ili smanjenja količine enzima. Što se tiče usporedbe kultivara ovdje kao i kod lipidne peroksidacije nema jasnih indikacija da su odabrani otporni kultivari uistinu otporniji, no sveukupno gledano jasno je da osmotski stres uzrokuje teža oštećenja posebno u kombinaciji sa povišenom temperaturom.

Imunodetekcijom je ustanovljena povećana količina proteina toplinskog stresa HSP70 i HSP90 u oba kultivara prilikom tretmana povišenom temperaturom. Kod otpornijega kultivara 411 relativni intenzitet proteinskih vrpce ukazuje da je količina oba proteina HSP povećana u odnosu na neotporni kultivar 392. Isto vrijedi i za kombinirani tretman manitolom i povišenom temperaturom, no prema intenzitetu vrpce taj porast je manji nego kod tretmana samo povišenom temperaturom. To je vjerojatno radi združenoga efekta osmotskoga i toplinskoga stresa. Naime primjena samo osmotskoga stresa tj. tretmana manitolom dovela je kod otpornoga kultivara 411 do laganoga smanjenja količine oba HSP, ali u osjetljivom kultivaru 392 do potpune odsutnosti tih šaperona. To ukazuje na to da je indukcija ova dva šaperona pod utjecajem povišene temperature, ali ne i osmotskoga stresa. Slične rezultati dobili su Swindell i sur. (2007) analizom ekspresije različitih klasa HSP-ova u uročnjaku *A. thaliana*. Pronašli su

da tretman visokom temperaturom utječe na povećanje ekspresije HSP70 i HSP90, no da osmotski stres najviše korelira sa ekspresijom klase HSP100.

Membrana na kojoj su detektirani HSP90 pokazuje dvije proteinske vrpce koje se nalaze iznad markera za veličinu od 60 kDa, a ispod oznake markera za 100 kDa. Pozicija tih vrpca i kao i sama specifičnost protutijela znači da se radi o detektiranim HSP90 proteinima, no nije jasno zašto postoje dva vrpce jer indicira da postoje dvije izoforme toga proteina sa malo drugačijom molekularnom masom. S obzirom na to da genom raštike (*Brassica oleracea* var. *acephala*) nije sekvenciran nagađanja se mogu bazirati prema podacima za vrstu *Brassica oleracea* var. *oleracea*. Podatci ove podvrste uspješno su korišteni prilikom odabira početnica za praćenje ekspresije gena, te su se početnice uspješno i vezale. Prema podacima iz NCBI-baze podataka u *Brassica oleracea* var. *oleracea* indentificirani su proteini HSP90-1 i HSP90-2 koji se međusobno razlikuju po broju i sekvenci aminokiselina, te molekularnoj masi. Prema sekvenci HSP90-2 (NCBI Reference Sequence: XP_013628650.1) taj protein bi imao molekularnu masu od 80 kDa (Stothard, 2000). Druga potencijalna izoforma bi bio HSP90-1 (NCBI Reference Sequence: XP_013619217.1) molekularne mase od 90 kDa (Stothard, 2000). Unatoč tome što su podaci *Brassica oleracea* var. *oleracea* primjenjivi na rašniku, o postojanju sličnih izoformi poput iznad spomenutih u raštici bez daljnjega istraživanja može se samo nagađati. Nadalje može se raditi i o različitim *splicing* varijantama proteina HSP90 (Lu i sur., 2020) ili različitoj glikoziliranosti. Međutim glikozilirani proteini prilikom denaturirajuće elektroforeze često ostavljaju „šmir“ radi drugačije interakcije šećernih ostataka sa molekulama SDS, što na ovoj membrani nije bilo vidljivo

Druga karakteristika detektiranih proteina HSP90 je razlika u relativnom intezitetu obje vrpce iz istih uzoraka. Naime izgleda da dvije detektirane varijante HSP90 imaju nešto drugačiju količinu ekspresije ovisno o tretmanu. Samo količinski gledano varijante proteina veće molekularne mase ima više nego varijante proteina s manjom molekularnom masom. No ako se usporedi količina svake varijante sa kontrolom onda se uočava razlika između kultivara. Kod osjetljivoga kultivara 392, HSP90 proteina manje molekularne mase ima manje u tretmanima, dok kod otpornoga kultivara 411 tog proteina ima više. Taj porast vrlo je izražen kod tretmana povišenom temperaturom i kombiniranim tretmanom manitola i povišene temperature. To naravno dovodi do pitanja postoji li neka korelacija između varijante HSP90 manje molekularne mase i otpornosti na toplinski, te u manjoj mjeri i osmotski, stres. U *A. thaliana* identificano je 7 izoformi HSP90 (HSP90.1 – HSP.7), lokalizirani su u citosolu, mitohondrijima, kloroplastu i endoplazmatskom retikulumu (Kadota i Shirasu, 2012), te imaju

različite razvojne uloge i uzorak ekspresije (Kadota i Shirasu, 2012, Swindell i sur., 2007). S obzirom na srodnost raštike i *A. thaliana* lako je moguće da takav različiti uzorak ekspresije izoformi HSP90 i njihove uloge u stanici, postoje i u raštici.

Osjetljivi i otporni kultivar raštike pokazali su veliku razliku u količini velike podjedinice Rubisco proteina (RbcL). Otporni kultivar 411 u sva tri tretmana ne samo da je zadržao istu količinu RbcL nego se količina i povećala. Najzanimljivija je činjenica da se i u tretmanu manitolom povećala količina RbcL jer to je tretman koji se pokazao kao tretman sa najtežim posljedicama. To se djelomično može objasniti činjenicom da Rubisco ima poluživot od nekoliko dana što znači da i pod jačom sušom njegova količina, bar neko vrijeme, ostaje relativno nepromijenjena (Fahad i sur., 2017). Kod osjetljivog kultivara 392 u tretmanu manitolom Rubisco je jedva prisutan, dok je u ostalim tretmanima količina naspram kontrole smanjena. Količina Rubisca u kloroplastu regulirana je njegovom sintezom i razgradnjom, te u suši na količinu Rubisca najviše utječe manjak malih podjedinica (kodirane jezgrom, te se dostavljaju u kloroplast) (Fahad i sur., 2017). S obzirom na to da je Rubisco središnja komponenta u asimilaciji ugljika, očuvanje njegove količine i funkcije u stresnim uvjetima od vitalne je važnosti za biljku. Ovi rezultati ukazuju na to je odabrani otporni kultivar 411 u tome uspio ali postavlja se pitanje znači li veća količina RbcL, ujedno i veću količinu cijeloga proteina Rubisco, te da li je on u aktivnom stanju. Kao što je spomenuto, primarna protutijela koja su korištena vežu se na veliku podjedinicu Rubisca (RbcL) što samo govori o količini te podjedinice no ne daje informaciju o funkcionalnosti cijeloga kompleksa (u biljkama Rubisco protein ima heksadekamernu strukturu od osam malih i osam velikih podjedinica (Buchanan i sur., 2015)). Porastom temperature raste i afinitet toga enzima za kisik te dolazi do oksigenazne aktivnosti. To smanjuje količinu asimilacije ugljika jer dolazi do porasta fotorespiracije koja dodatno povećava i produkciju ROS (Fahad i sur., 2017). Čak i uz povećanu oksigenaznu aktivnost Rubisca, biljke održavaju cikluse koji regeneriraju krajnje akceptore elektrona u lancu prijenosa elektrona što donekle pomaže u suzbijanju proizvodnje ROS. Postavlja se pitanje da li su oksidativni parametri u kultivaru 411 povećani? Iz provedenih eksperimenata ne može se znati je li Rubisco aktivan jer oksidativni pokazatelji nisu dali razlike u odnosu na 392 ali bi se u daljnim eksperimentima mogla mjeriti njegova aktivnost. Na temelju sposobnosti rasta koju je kultivar 411 zadržao možemo pretpostaviti da je imao dovoljno produkata asimilacije za rast.

Četvrti protein testiran imunodetekcijom na membrani bio je aktin. To je jedan od *housekeeping* proteina koji se često koristi kao kontrola nanošenja u imunodetekciji (Western blot) ili kao endogena kontrola u analizi ekspresije gena. Dobra kontrola nanošenja jest protein

koji je u svim tkivima prisutan u sličnoj količini, koja ostaje stalna i nakon primjene nekoga tretmana. Ideja je bila provjeriti da li se aktin može koristiti i za raštiku. Količina detektiranoga aktina u tretmanu povišenom temperaturom kod otpornoga kultivara je narasla, dok je kod osjetljivoga ostala ista. No u tretmanima koji su uključivali manitol relativna količina aktina naspram kontrole drastično je smanjena. Prema tome je utvrđeno da aktin nije dobra kontrola nanošenja za raštiku prilikom testiranja osmotskoga i toplinskoga stresa.

Potruga za genima koji mogu služiti kao endogene kontrole u istraživanju ekspresije gena u raštici bila je uspješna. Za odabir početnica koje se koriste u ekspresiji gena važno je ne samo da su komplementarne genu unutar kojega se trebaju vezati već i da umnažaju samo jedan fragment. Gen *ACT7* se pokazao kao loš izbor jer su se početnice vezale na više mjesta u uzorcima i davale po nekoliko fragmenata. No treba napomenuti da se radilo o početnicama dizajniranim za genom kineskoga kupusa (*Brassica rapa*), a da su bile specifično dizajnirane za raštiku (*Brassica oleracea* var. *acephala*) možda bi i taj gen bio dobra kontrola. Kako genom raštike nije sekvenciran do trenutka pisanja ovoga diplomskoga rada to nisam mogla testirati. Međutim geni *OGIO* i *PUX* su se pokazali kao dobar izbor. Početnice za oba gena su umnažanjem cDNA dale samo jedan fragment i nisu pokazale veliku razliku u ekspresiji prilikom primjene tretmana, što znači da su *OGIO* i *PUX* dobri referentni geni, ne samo kod *A. thaliana* (Škiljaica i sur. 2022), nego i za vrste roda *Brassica* izložene temperaturnom i osmotskom stresu. Gen *OGIO* međutim je nešto bolji odabir jer ima stabilniju ekspresiju. Osim toga, pokazala sam da početnice za gen *OGIO* obuhvaćaju intron te je odabir ovih početnica dobar izbor jer se na taj način isključuje umnažanje fragmenata na kalupu eventualno zaostale genomske DNA u uzorku cDNA. Početnice za *OGIO* u genomu raštike vežu se na mjesto koje uključuje intron između dva egzona, pa fragment umnožen tim početnicama iz uzorka genomske DNA odgovara veličini od otprilike 200 pb, dok je fragment umnožen tim početnicama iz uzorka cDNA malo veći od 100 pb. Očekivana veličina toga fragmenta u *B. oleracea* var. *oleracea* je 121 pb, a izgleda kako je to slučaj i u raštici (*B. oleracea* var. *acephala*). Veličine fragmenata za korištene početnice izračunate su po simulaciji vezanja u genomu *B. oleracea* var. *oleracea* a dobiveni fragmente na raštici također imaju predviđene veličine.

Transkripcijski faktori NAC su velika porodica proteina od kojih neki imaju i konstitutivnu ekspresiju, neki tkivno specifičnu, a neki su povezani sa tolerancijom na sušu (Mao i sur., 2015), osmotski stres i povišenu temperaturu (Puranik i sur., 2012). Dva faktora kojima sam testirala zapravo su poznata iz kineskoga kupusa (*B. rapa*) ali pokazano je da se

početnice dizajnirane prema sekvencama gena u toj vrsti vežu i unutar gena raštike (*B. oleracea* var. *acephala*). Općenito gledano oba transkripcijska faktora pokazuju različitu ekspresiju prilikom primjene abiotičkih stresova povišene temperature i osmotskoga stresa, što znači da u raštici pripadaju među NAC koji su diferencijalno eksprimirani u abiotičkom stresu.

Kultivar raštike 392 i kineski kupus pokazali su slični uzorak ekspresije gena *NAC041*. Od odabranih, kultivar raštike 392 je manje otporan na stres manitolom i temperaturom, i sličniji je kineskom kupus za koji je također poznato da je manje otporan na abiotičke stresove (Pavlović i sur., 2018). Ekspresija gena *NAC041* statistički značajno se mijenja kod kultivara 392 i kineskog kupusa u tretmanu manitolom i kombiniranim tretman manitolom i povišenom temperaturom. To ukazuje na mogućnost da je taj gen negativno reguliran u uvjetima osmotskoga stresa, ali ne i uvjetima povišene temperature jer prilikom primjene samo povišene temperature nije zabilježen statistički značajan pad ekspresije *NAC041*. Kultivar 411 nije pokazao takav uzorak, no problem sa kultivarom 411 je to što su analizirane samo dvije biološke replike, a vrijednosti replika su bile vrlo različite. U budućim istraživanjima svakako treba dodatno istražiti ekspresiju gena *NAC041* u otpornijem kultivaru raštike.

Relativna ekspresija *NAC084* gena također pokazuje veće sličnosti između kultivara 392 i kineskoga kupusa. Kod oba došlo je do statistički značajno smanjene ekspresije *NAC084* u kombiniranom tretmanu manitolom i povišenom temperaturom. U kineskom kupusu dodatno je došlo i do statistički značajnog smanjenja ekspresije *NAC084* u tretmanu povišenom temperaturom. Ekspresija *NAC084* kod osjetljivijeg kultivara raštike 392 i kod kineskog kupusa bila je smanjena i kod tretmana manitolom, za razliku od ekspresije u otpornijem kultivaru 411. Premda su, zbog značajnog odstupanja ekspresije dvije u biološke replike za kultivar 411, potrebna dodatna istraživanja. Usporedbom ekspresije *NAC084* između svih tretmana manitolom pokazuje statistički značajnu razliku između kultivara 411 i kineskoga kupusa. Naime kineski kupus imao je statistički značajno manju ekspresiju nego kultivar raštike 411. Znači li to da *NAC084* ipak ima poveznicu i sa osmotskim stresom? Ova statistička značajnost zapravo otvara pitanje da li je povećana ekspresija toga gena zapravo povezana sa boljom tolerancijom osmotskoga stresa? Osjetljivi kultivar raštike 392 i osjetljivi kineski kupus ne pokazuju statistički značajnu razliku ekspresiji *NAC084*, dok kultivar raštike 411 ima povećanu ekspresiju. Za kultivar 411 je u ovom radu pokazano da ima bolju sposobnost očuvanja fotosintetskoga aparata nema pada količine Rubisca prilikom primjene osmotskoga i temperaturnoga stresa, te nema veliko povišenje količine prolina. Povećana ekspresija gena za NAC transkripcijske faktore povezana je sa povećanom akumulacijom prolina (Zarratini i

Forlani, 2017). U ovome slučaju došlo je do smanjenja ili odsutnosti promjene u ekspresiji oba NAC transkripcijska faktora, no do povećanja akumulacije prolina, što nije u skladu sa prethodno spomenutom korelacijom. Ipak ovdje je testirana ekspresija samo dva NAC transkripcijska faktora od kojih *NAC084* moguće sudjeluje u otpornosti kultivara raštike 411 na sušu uzrokovanu manitolom, ali ne regulirajući ekspresiju enzima sinteze prolina.

6. ZAKLJUČAK

Analizirani kultivari raštike iz različitih dijelova Hrvatske i Hercegovine razlikuju se po morfološkim karakteristikama, veličini i odgovoru na stres. Osmotski stres je imao teže posljedice jer je smanjio prirast korijena, sadržaj vode i biomasu te povećao akumulaciju prolina u klijancima većine kultivara dok je tretman povišenom temperaturom imao minimalan utjecaj.

Usporedba odabranih otpornih i osjetljivih kultivara ukazala je na nekoliko parametara po kojima se otporni razlikuju od osjetljivih. Odabrani otporni kultivari raštike, osobito 411, pokazali su bolju sposobnost očuvanja fotosintetske učinkovitosti i proteina Rubisco te povećanu količinu zaštitnih proteina HSP70 i HSP90. Mjerenja oksidativnih parametara nisu pokazala jasne razlike između otpornih i osjetljivih kultivara, ali su potvrdila kako na klijance raštike povišena temperatura ima manji utjecaj nego osmotski stres ili kombinacija oba stresa koji su uzrokovali najveća oksidativna oštećenja.

Imunodetekcija HSP90 u raštici pokazala je dva proteina malo drugačije molekularne mase, jedan nešto veći i bliži 90 kDa, a drugi nešto manje molekularne mase. Pronađeno je da aktin nije dobra kontrola nanošenja proteina za metodu imunodetekcije na uzorcima raštike tretirane osmotskim stresom i povišenom temperaturom.

Utvrđeno je da gen *ACT7* nije dobar izbor kao endogena kontrola praćenja ekspresije gena u raštici kod primijenjenih tretmana, no geni *PUX* i posebno *OGIO* jesu.

Analiza ekspresije dva NAC transkripcijska faktora pokazala je da tretmani osmotskim stresom i povišenom temperaturom utječu na ekspresiju ovih gena. Ekspresija gena *NAC041* bila je smanjena u osmotskom stresu. Osjetljivi kultivar raštike 392 imao je sličan uzorak ekspresije gena *NAC041* kao kineski kupus. Gen *NAC084* imao je smanjenu ekspresiju kod osjetljivog kultivara 392 u kombiniranom tretmanu osmotskim stresom i povišenom temperaturom, dok se kod otpornog kultivara 411 njegova ekspresija nije značajno mijenjala u stresnim uvjetima.

Ovim analizama pronađeno je da osmotski stres ima negativniji učinak na klijance raštike nego povišena temperatura, što se očituje na morfolškoj, fiziološkoj, biokemijskoj i razini ekspresije gena. Otporni i osjetljivi kultivari raštike razlikuju se po prirastu korijena, sadržaju vode, biomasi, akumulaciji prolina, očuvanju fotosintetske aktivnosti, akumulaciji šaperona HSP70 i HSP90 te ekspresiji NAC transkripcijskih faktora.

7. LITERATURA

- Aebi, H. (1984). Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*, 105, 121-126.
- Amara, I., Zaidi, I., Masmoudi, K., Ludevid, M. D., Pagès, M., Goday, A. i Brini, F. (2014). Insights into late embryogenesis abundant (LEA) proteins in plants: from structure to the functions. *American Journal of Plant Sciences*, 5(22), 3440.
- Arias, P.A. i sur. (2021). Technical Summary. U: Masson-Delmotte, V., P. Zhai, A. Pirani, S.L. Connors, C. Péan, S. Berger, N. Caud, Y. Chen, L. Goldfarb, M.I. Gomis, M. Huang, K. Leitzell, E. Lonnoy, J.B.R. Matthews, T.K. Maycock, T. Waterfield, O. Yelekçi, R. Yu, and B. Zhou (ur.). *Climate Change 2021: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Sixth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. Cambridge University Press. In Press.
- Balen, B., Pavoković, D., Peharec Štefanić, P. i Krsnik-Rasol, M. (2011). Elektroforetske tehnike istraživanja proteina. *Sveučilišni priručnik*, Zagreb: Hrvatska sveučilišna naklada
- Bitá, C. i Gerats, T. (2013). Plant tolerance to high temperature in a changing environment: scientific fundamentals and production of heat stress-tolerant crops. *Frontiers in Plant Science*, 4, 273.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
- Buchanan, B. B., Gruissem, W. i Jones, R. L. (2015). *Biochemistry and molecular biology of plants*. John Wiley & sons.
- Bussotti, F., Desotgiu, R., Pollastrini, M. i Cascio, C. (2010). The JIP test: a tool to screen the capacity of plant adaptation to climate change. *Scandinavian Journal of Forest Research*, 25(S8), 43-50.
- Carillo, P., Mastrolonardo, G., Nacca, F., Parisi, D., Verlotta, A. i Fuggi, A. (2008). Nitrogen metabolism in durum wheat under salinity: accumulation of proline and glycine betaine. *Functional Plant Biology*, 35(5), 412-426
- Clark, M. A., Domingo, N. G., Colgan, K., Thakrar, S. K., Tilman, D., Lynch, J., (...) i Hill, J. D. (2020). Global food system emissions could preclude achieving the 1.5 and 2 °C climate change targets. *Science*, 370(6517), 705-708.

- Corwin, D. L. i Scudiero, E. (2019). Review of soil salinity assessment for agriculture across multiple scales using proximal and/or remote sensors. *Advances in agronomy*, 158, 1-130.
- De Leon, J. A. D. i Borges, C. R. (2020). Evaluation of oxidative stress in biological samples using the thiobarbituric acid reactive substances assay. *Journal of Visualized Experiment*, 159, e61122.
- Draper, H. H. i Hadley, M. (1990). Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods in Enzymology*, 186, 421-431.
- Doyle J.J. i Doyle J.L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, 19, 11-15.
- Elavarthi, S. i Martin, B. (2010). Spectrophotometric assays for antioxidant enzymes in plants. U: Sunkar R. (ur) Plant Stress Tolerance. *Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*, vol 639. Humana Press.
- Fahad, S., Bajwa, A. A., Nazir, U., Anjum, S. A., Farooq, A., Zohaib, A., (...) i Huang, J. (2017). Crop production under drought and heat stress: plant responses and management options. *Frontiers in Plant Science*, 1147.
- Gupta, B. L. (1973). Microdetermination techniques for H₂O₂ in irradiated solutions. *Microchemical Journal*, 18(4), 363-374.
- Hadi, F., Ayaz, M., Ali, S., Shafiq, M., Ullah, R. i Jan, A. U. (2011). Comparative effect of polyethylene glycol and mannitol induced drought on growth (in vitro) of canola (*Brassica napus*), cauliflower (*Brassica oleracea*) and tomato (*Lycopersicon esculentum*) seedlings. *International Journal of Biosciences*, 4(9), 34-41.
- Hassan, M. U., Chattha, M. U., Khan, I., Chattha, M. B., Barbanti, L., Aamer, M., (...) i Aslam, M. T. (2021). Heat stress in cultivated plants: Nature, impact, mechanisms, and mitigation strategies—A review. *Plant Biosystems*, 155(2), 211-234.
- Hasanuzzaman, M., Nahar, K. i Fujita, M. (2013). Extreme temperature responses, oxidative stress and antioxidant defense in plants. *Abiotic stress-Plant responses and applications in agriculture*, 13, 169-205.
- Kadota, Y. i Shirasu, K. (2012). The HSP90 complex of plants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1823(3), 689-697.

- Kavi Kishor, P. B. i Sreenivasulu, N. (2014). Is proline accumulation per se correlated with stress tolerance or is proline homeostasis a more critical issue?. *Plant, cell & environment*, 37(2), 300-311.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680-685.
- Linić, I., Šamec, D., Grúz, J., Vujčić Bok, V., Strnad, M. i Salopek-Sondi, B. (2019). Involvement of phenolic acids in short-term adaptation to salinity stress is species-specific among Brassicaceae. *Plants*, 8(6), 155.
- Liu, T., Song, X., Duan, W., Huang, Z., Liu, G., Li, Y. i Hou, X. (2014). Genome-wide analysis and expression patterns of NAC transcription factor family under different developmental stages and abiotic stresses in Chinese cabbage. *Plant Molecular Biology Reporter*, 32(5), 1041-1056.
- Livak, K. J. i Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻ ΔΔCT method. *Methods*, 25(4), 402-408.
- Lu, Y., Zhao, P., Zhang, A., Ma, L., Xu, S. i Wang, X. (2020). Alternative splicing diversified the heat response and evolutionary strategy of conserved heat shock protein 90s in Hexaploid Wheat (*Triticum aestivum* L.). *Frontiers in Genetics*, 1471.
- Magné, C., & Larher, F. (1992). High sugar content of extracts interferes with colorimetric determination of amino acids and free proline. *Analytical biochemistry*, 200(1), 115-118.
- Major, N., Prekalj, B., Perković, J., Ban, D., Užila, Z. i Ban, S. G. (2020). The effect of different extraction protocols on *Brassica oleracea* var. *acephala* antioxidant activity, bioactive compounds, and sugar profile. *Plants*, 9(12), 1792.
- Mao, H., Wang, H., Liu, S., Li, Z., Yang, X., Yan, J., (...) i Qin, F. (2015). A transposable element in a NAC gene is associated with drought tolerance in maize seedlings. *Nature Communications*, 6(1), 1-13.
- Marias, D. E., Meinzer, F. C. i Still, C. (2017). Impacts of leaf age and heat stress duration on photosynthetic gas exchange and foliar nonstructural carbohydrates in *Coffea arabica*. *Ecology and Evolution*, 7(4), 1297-1310.

- Maurel, C., Santoni, V., Luu, D. T., Wudick, M. M. i Verdoucq, L. (2009). The cellular dynamics of plant aquaporin expression and functions. *Current Opinion in Plant Biology*, 12(6), 690-698.
- Mhamdi, A., Queval, G., Chaouch, S., Vanderauwera, S., Van Breusegem, F. i Noctor, G. (2010). Catalase function in plants: a focus on Arabidopsis mutants as stress-mimic models. *Journal of Experimental Botany*, 61(15), 4197-4220.
- Mittler, R., Finka, A. i Goloubinoff, P. (2012). How do plants feel the heat?. *Trends in Biochemical Sciences*, 37(3), 118-125.
- Moharramnejad, S., Sofalian, O., Valizadeh, M., Asgari, A., & Shiri, M. (2015). Proline, glycine betaine, total phenolics and pigment contents in response to osmotic stress in maize seedlings. *Journal of Bioscience & Biotechnology*, 4(3).
- Pavlović, I., Mlinarić, S., Tarkowská, D., Oklestkova, J., Novák, O., Lepeduš, H., (...) i Salopek-Sondi, B. (2019). Early Brassica crops responses to salinity stress: a comparative analysis between Chinese cabbage, white cabbage, and kale. *Frontiers in Plant Science*, 10, 450.
- Pavlović, I., Petřík, I., Tarkowská, D., Lepeduš, H., Vujčić Bok, V., Radić Brkanac, S., (...) i Salopek-Sondi, B. (2018). Correlations between phytohormones and drought tolerance in selected Brassica crops: Chinese cabbage, white cabbage and kale. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(10), 2866.
- Puranik, S., Sahu, P. P., Srivastava, P. S. i Prasad, M. (2012). NAC proteins: regulation and role in stress tolerance. *Trends in plant science*, 17(6), 369-381.
- 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.
- Shao, H., Wang, H. i Tang, X. (2015). NAC transcription factors in plant multiple abiotic stress responses: progress and prospects. *Frontiers in Plant Science*, 6, 902.
- Stirbet, A., Lazár, D. i Kromdijk, J. (2018). Chlorophyll *a* fluorescence induction: can just a one-second measurement be used to quantify abiotic stress responses?. *Photosynthetica*, 56(1), 86-104.

- Strasser, R. J., Tsimilli-Michael, M. i Srivastava, A. (2004). Analysis of the chlorophyll a fluorescence transient. U: Papageorgiou G.C., Govindjee (ur.) Chlorophyll a fluorescence. *Advances in Photosynthesis and Respiration*, vol 19. Springer, Dordrecht.
- Stothard, P. (2000) The Sequence Manipulation Suite: JavaScript programs for analyzing and formatting protein and DNA sequences. *Biotechniques* 28:1102-1104
- Swindell, W. R., Huebner, M. i Weber, A. P. (2007). Transcriptional profiling of Arabidopsis heat shock proteins and transcription factors reveals extensive overlap between heat and non-heat stress response pathways. *BMC genomics*, 8(1), 1-15.
- Šamec, D., Pavlović, I. i Salopek-Sondi, B. (2017). White cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata* f. *alba*): botanical, phytochemical and pharmacological overview. *Phytochemistry Reviews*, 16(1), 117-135.
- Šamec, D., Kruk, V. i Ivanišević, P. (2019). Influence of seed origin on morphological characteristics and phytochemicals levels in *Brassica oleracea* var. *acephala*. *Agronomy*, 9(9), 502.
- Šamec, D., Urlić, B. i Salopek-Sondi, B. (2019). Kale (*Brassica oleracea* var. *acephala*) as a superfood: Review of the scientific evidence behind the statement. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59(15), 2411-2422.
- Škiljaica, A., Jagić, M., Vuk, T., Leljak Levanić, D., Bauer, N. i Markulin, L. (2022). Evaluation of reference genes for RT-qPCR gene expression analysis in *Arabidopsis thaliana* exposed to elevated temperatures. *Plant Biology*. 24(2), 367-379.
- Whaibi, M. H. A. (2011). Plant heat-shock proteins: a mini review. *Journal of King Saud University-Science*, 23(2), 139-150.
- Xie, X., He, Z., Chen, N., Tang, Z., Wang, Q. i Cai, Y. (2019). The roles of environmental factors in regulation of oxidative stress in plant. *BioMed Research International*, 9732325, 1-11.
- Xiong, L. i Zhu, J. K. (2002). Molecular and genetic aspects of plant responses to osmotic stress. *Plant, Cell & Environment*, 25(2), 131-139.
- Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S. i Madden T. (2012). Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*, 13, 134, 1-11.

- Zampieri, M., Ceglar, A., Dentener, F. i Toreti, A. (2017). Wheat yield loss attributable to heat waves, drought and water excess at the global, national and subnational scales. *Environmental Research Letters*, 12(6), 064008.
- Zarattini, M. i Forlani, G. (2017). Toward unveiling the mechanisms for transcriptional regulation of proline biosynthesis in the plant cell response to biotic and abiotic stress conditions. *Frontiers in Plant Science*, 8, 927.
- Zhu, J. K., Hasegawa, P. M., Bressan, R. A. i Bohnert, H. J. (1997). Molecular aspects of osmotic stress in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 16(3), 253-277.

8. ŽIVOTOPIS

Rođena sam u Zagrebu, gdje sam završila osnovnu školu Ivana Gorana Kovačića i pohađala XV. Gimnaziju (IB Program) koju sam završila 2010. Nakon mature upisala sam Akademiju likovnih umjetnosti u Zagrebu, gdje sam diplomirala 2015. godine u klasi profesora Duje Jurića. Tokom studija sudjelovala sam na nekoliko umjetničkih kolonija. Izlagala sam na grupnoj izložbi “Neue kroatische Kunst” u galeriji AKC Medike i provela semestar na studentskoj razmjeni u Cuenci, gradiću u Španjolskoj.

Molekularnu biologiju na zagrebačkom Prirodoslovno-matematičkom fakultetu sam upisala 2015. godine i očekujem diplomirati sada na zimu 2021. Tokom studija radila sam studentsku praksu kod profesorice Mirte Tkalec gdje sam se upoznala s metodama istraživanja abiotičkih stresova u biljaka, a zatim drugu praksu kod profesorice Dunje-Ljeljak Levanić gdje je fokus bio na metodama lokalizacije i interakcije među proteinima. Moj diplomski rad rađen je na temu istraživanja različitih kultivara raštike (*Brassica oleracea* var. *acephala*), te biokemijskih i genetičkih mehanizama otpornosti na sušu i povišenu temperaturu u tih biljaka.

Ostvarila sam nešto iskustva tokom terenskoga rada iz botanike i zoologije, te sam bila demonstrator na predmetu Fiziologija biljaka. U sklopu BIUS-ove grupe Astrobotanika organizirala sam radionicu u Noći biologije za astrobiologiju, te održala predavanja na temu astrobotanike kao dio aktivnosti grupe. Sudjelovala sam na simpoziju AbGradE u Pragu (2018.) za studente i mlade istraživače zainteresirane za područje astrobiologije. Tečno govorim engleski, radi pohađanja srednje škole u Bonnu tečno govorim i njemački, a nakon provedenoga semestra u španjolskoj odlično pričam i taj jezik.