Učinak UVB-zračenja na uročnjak (Arabidopsis thaliana (L.) Heynh.) s promijenjenom ekspresijom gena BPM

Tandara, Antonija

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:217:035924

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**



Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb







Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Antonija Tandara

Učinak UVB-zračenja na uročnjak (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.) s promijenjenom ekspresijom gena *BPM*

Diplomski rad

Zagreb, 2022.

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Antonija Tandara

Effect of UV-B radiation on thale cress (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.) with modified *BPM*s expression

Master Thesis

Zagreb, 2022.

Ovaj rad je izrađen na Botaničkom zavodu Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu, pod voditeljstvom prof. dr. sc. Željke Vidaković-Cifrek. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra molekularne biologije.

Zahvale

Od srca zahvaljujem svojoj mentorici prof. dr. sc. Željki Vidaković-Cifrek na ljubaznosti, pomoći, podršci i savjetima, kako tijekom izvođenja eksperimentalnog dijela, tako i prilikom pisanja ovog rada.

Posebno zahvaljujem Sandri Vitko, mag. biol. exp. na strpljenju, pomoći i savjetima prilikom izvođenja eksperimentalnog dijela rada te na ugodnoj atmosferi u laboratoriju, kao i na savjetima prilikom pisanja rada.

Zahvaljujem svim profesorima koje sam susrela tijekom svog boravka na PMF-u, a posebno onima koji su me poticali i motivirali.

Zahvaljujem kolegici i dragoj prijateljici Leni Bonassin, mag. biol. mol. koja mi je bila spremna nesebično davati stručne savjete kad god mi je to bilo potrebno.

Zahvaljujem svojoj obitelji na podršci, ljubavi i strpljenju tijekom cijelog školovanja.

Veliko hvala Vilimu na pruženoj ljubavi i podršci.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

Učinak UVB-zračenja na uročnjak (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.) s promijenjenom ekspresijom gena *BPM*

Antonija Tandara

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Sunčevo zračenje je izvor energije za fotosintezu i važan signal za regulaciju rasta i razvoja biljaka. Međutim, svjetlost visokog intenziteta, a posebno ultraljubičasti zračenje, može izazvati stres u biljaka. Mjerenjem količine H_2O_2, prolina, stupnja lipidne peroksidacije, aktivnosti antioksidacijskih enzima i učinkovitosti fotosinteze moguće je procijeniti učinak stresnih uvjeta na biljke. Cilj ovog istraživanja bio je procijeniti učinak UVB-zračenja na modelnu biljku *Arabidopsis thaliana*. Osim divljeg tipa, koristila sam linije *oeBPM1* i *amiR-bpm* koje imaju promijenjenu ekspresiju gena *BPM*. Protein BPM1 pripada porodici proteina MATH-BTB (BPM) koji u biljci sudjeluju u razvojnim procesima i odgovoru na stresne uvjete. Imunodetekcijom proteina BPM1-GFP u linije *oeBPM1* potvrdila sam akumulaciju tog proteina nakon izlaganja dozi UV-zračenja od 831 J cm^{-2}. Primjenom te doze UVB-zračenja i usporedbom kontrolnih i tretiranih biljaka potvrdila sam razliku u količini H_2O_2 u biljaka divljeg tipa i liniji *oeBPM1*, u aktivnosti gvajakol peroksidaze i superoksid dismutaze u biljaka divljeg tipa te u maksimalnom kvantnom prinosu PSII u liniji *oeBPM1*. Veću razliku uočila sam između linija nego između kontrolnih i tretiranih biljaka. Linija *oeBPM1* pokazala je bolji odgovor na stres u odnosu na druge dvije linije zbog izrazitije aktivacije antioksidacijskih enzima, dok je linija *amiR-bpm* imala višu razinu H_2O_2 i lipidne peroksidacije u odnosu na divlji tip i liniju *oeBPM1*. Budući da se navedene linije razlikuju u ekspresiji gena *BPM*, moguća je njihova uključenost u odgovor na UVB-zračenje.

(66 stranica, 12 slika, 2 tablice, 110 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: antioksidacijski enzimi, linija *amiR-bpm*, linija *oeBPM1*, lipidna peroksidacija, OJIP-test, proteini MATH-BTB, vodikov peroksid

Voditelj: prof. dr. sc. Željka Vidaković-Cifrek

Ocjenitelji:

Prof. dr. sc. Željka Vidaković-Cifrek
Prof. dr. sc. Dunja Leljak-Levanić
Doc. dr. sc. Marin Ježić

Rad prihvaćen: 10. 2. 2022.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Master Thesis

Effect of UV-B radiation on thale cress (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.) with modified *BPMs* expression

Antonija Tandara

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Solar radiation is a source of energy for photosynthesis and an important signal for regulation of plant growth and development. However, high light intensity, and especially ultraviolet radiation, can cause stress in plants. H_2O_2 and proline content, lipid peroxidation level, activity of antioxidant enzymes and efficiency of photosynthesis are measurable parameters for assessing the stress effect on plants. The main goal of the research was to evaluate the effect of UV-B radiation on model plant *Arabidopsis thaliana*. Besides wild-type, the lines with modified expression of *BPM* genes (*oeBPM1* and *amiR-bpm*) were used. BPM1 protein belongs to the MATH-BTB (BPM) protein family that participate in developmental processes and stress response in plants. Immunodetection of BPM1-GFP protein in *oeBPM1* confirmed the highest accumulation of the protein after treatment with UV-B radiation dose of 831 J cm^{-2}. The comparison of control and treated plants showed that this dose of UV-B radiation induced changes in the content of H_2O_2 in wild type and *oeBPM1*, in guaiacol peroxidase and superoxide dismutase activity in wild type, and in the maximum quantum efficiency of PSII in *oeBPM1*. Moreover, a difference between tested lines was more pronounced than difference between control and treated plants of the same line. The *oeBPM1* line showed better stress response than other two lines due to more pronounced activation of antioxidant enzymes, while the *amiR-bpm* line had higher H_2O_2 content and lipid peroxidation level compared to wild type and *oeBPM1*. Because these lines differ in expression of *BPM* genes, their involvement in the UV-B radiation response is possible.

(66 pages, 12 figures, 2 tables, 110 references, original in: Croatian)

Thesis is deposited in Central Biological Library.

Keywords: *amiR-bpm* line, antioxidant enzymes, hydrogen peroxide, lipid peroxidation, MATH-BTB proteins, *oeBPM1* line, OJIP test

Supervisor: Prof. Željka Vidaković-Cifrek

Reviewers:
Prof. Željka Vidaković-Cifrek
Prof. Dunja Leljak-Levanić
Asst. Prof. Marin Ježić

Thesis accepted: 10. 2. 2022.

POPIS KRATICA

amiR-bpm – linija biljaka *Arabidopsis thaliana* koje imaju smanjenu ekspresije gena *BPM1*, *BPM4*, *BPM5* i *BPM6*

APX – askorbat peroksidaza (engl. *ascorbate peroxidase*)

BPM – proteini iz porodice proteina BTB-MATH, sadrže domene BTB i MATH

BSA – albumin iz goveđeg seruma (engl. *bovine serum albumin*)

CAT – katalaza (engl. *catalase*)

COP1 – multifunkcionalna E3 ubikvitin ligaza (engl. *constitutively photomorphogenic 1*)

DTT – ditiotreitol (engl. *dithiothreitol*)

EDTA – etilendiamintetraoctena kiselina (engl. *ethylenediaminetetraacetic acid*)

FW – masa svježeg (biljnog) tkiva (engl. *fresh weight*)

GFP – zeleni fluorescentni protein (engl. *green fluorescent protein*)

G-POD – gvajakol peroksidaza (engl. *guaiacol peroxidase*)

K – kontrolna grupa biljaka

MATH – domena koju sadrže proteini iz porodice proteina BPM (engl. *meprin and TRAF (tumor necrosis factor receptor-associated factor) homology*)

MDA – malondialdehid (engl. *malondialdehyde*)

MES – 2-(N-morfolino) etansulfonska kiselina (engl. *2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid sodium salt*)

MS – hranjivi medij prema Murashige i Skoog (1962)

NBT – nitro-plavi tetrazolij klorid (engl. *nitroblue tetrazolium*)

oeBPM1 – linija biljaka *Arabidopsis thaliana* koje imaju pojačanu razinu ekspresije gena *BPM1* (engl. *overexpression of BPM1*)

OJIP – označava porast fluorescencije od faze O do faze P u metodi mjerenja polifaznog rasta fluorescencije klorofila *a*

PFD – gustoća svjetlosnog toka (engl. *photon flux density*)

PSII – fotosustav II u lancu prijenosa elektrona u fotosintezi (engl. *photosystem II*)

PVPP – polivinilpolipirolidon (engl. *polyvinylpolypyrrolidone*)

RC – reakcijski centar fotosustava II (engl. *reaction center*)

ROS – reaktivni kisikovi oblici (engl. *reactive oxygen species*)

SDS – natrijev dodecil-sulfat (engl. *sodium dodecyl sulfate*)

SOD – superoksid dismutaza (engl. *superoxide dismutase*)

TBA – tiobarbituratna kiselina (engl. *thiobarbituric acid*)

TCA – trikloroctena kiselina (engl. *trichloroacetic acid*)

UV – ultraljubičasto zračenje (engl. *ultraviolet*)

UVB – dio spektra ultraljubičastog zračenja (ultraljubičasto zračenje B); u ovom radu ista se oznaka koristi i za grupu biljaka tretiranih UVB-zračenjem

UVR8 –fotoreceptor za UVB-zračenje (engl. *UV resistance locus 8*)

wt – biljke divljeg tipa (engl. *wild type*)

XOD – ksantin oksidaza (engl. *xanthine oxidase*)

SADRŽAJ

1. Uvod 1
1.1. Stres u biljaka 1
1.2. Učinak UVB-zračenja na biljke 2
1.2.1. Značenje istraživanja učinka UVB-zračenja na biljke 4
1.3. Pokazatelji učinka stresa u biljaka 5
1.3.1. Pokazatelji oksidacijskog stresa 5
1.3.2. Antioksidacijski sustav u biljaka 7
1.3.3. Fotosintetski pigmenti 10
1.3.4. Polifazni rast fluorescencije klorofila *a* – OJIP-test 11
1.4. Protein BPM1 11
1.5. Biljka *Arabidopsis thaliana* kao modelni organizam 12
1.5.1. Linija *oeBPM1* 13
1.5.2. Linija *amiR-bpm* 13
2. Opći i specifični ciljevi rada 15
3. Materijal i metode 16
3.1. Korišteni uređaji 16
3.2. Biljni materijal i uvjeti uzgoja klijanaca 16
3.3. Sterilizacija sjemena i uzgoj klijanaca 17
3.4. Izlaganje klijanaca UVB-zračenju 17
3.5. Razdvajanje proteina elektroforezom i imunodetekcija proteina BPM1-GFP (western analiza) 18
3.6. Određivanje stupnja lipidne peroksidacije 21
3.7. Određivanje količine prolina 22
3.8. Određivanje količine vodikovog peroksida 23
3.9. Ekstrakcija ukupnih topivih proteina 23

3.10. Mjerenje koncentracije ukupnih topivih proteina 24
3.11. Određivanje aktivnosti katalaze 24
3.12. Određivanje aktivnosti gvajakol peroksidaze 25
3.13. Određivanje aktivnosti askorbat peroksidaze 25
3.14. Određivanje aktivnosti superoksid dismutaze 26
3.15. Mjerenje polifaznog rasta fluorescencije klorofila *a* – OJIP-test 27
3.16. Priprema ekstrakata i određivanje udjela fotosintetskih pigmenata 28
3.17. Prikaz i statistička obrada podataka 29
4. Rezultati 30
4.1. Imunodetekcija proteina BPM1-GFP u cilju izbora doze UVB-zračenja 30
4.2. Sadržaj MDA 32
4.3. Sadržaj prolina 33
4.4. Sadržaj vodikovog peroksida 34
4.5. Aktivnost katalaze 35
4.6. Aktivnost gvajakol peroksidaze 36
4.7. Aktivnost askorbat peroksidaze 37
4.8. Aktivnost superoksid dismutaze 38
4.9. Mjerenje polifaznog rasta fluorescencije klorofila *a* – OJIP-test 39
4.9.1. Indeks fotosintetske učinkovitosti 39
4.9.2. Apsorpcija, hvatanje i rasipanje pobudne energije po aktivnom RC-u, maksimalni kvantni prinos PSII te gustoća aktivnih RC-a 40
4.10. Udio fotosintetskih pigmenata 42
5. Rasprava 46
6. Zaključak 54
7. Literatura 55
8. Životopis 66

1. Uvod

1.1. Stres u biljaka

Stresni uvjet se obično definira kao okolišni čimbenik koji ima nepovoljan utjecaj na biljke. Čimbenici kao što su suša, povećana vlažnost, visoke i niske temperature, povišeni salinitet, manjak mineralnih tvari, nedostatak kisika (hipoksija ili anoksija) u području korijena, prisutnost toksičnih tvari te previsok ili prenizak intenzitet svjetlosti (uključujući UVB-zračenje) nazivaju se abiotički čimbenici. Oni obuhvaćaju izravan ili neizravan utjecaj neživog okoliša na biljne organizme (Freeman i Beattie 2008). Osim navedenih abiotičkih čimbenika, stres u biljaka mogu uzrokovati različiti biotički čimbenici, odnosno drugi organizmi. Oni obuhvaćaju kompeticiju s drugim organizmima, kao što su parazitske biljke, herbivorni kukci te infekcije patogenima poput bakterija, gljiva, virusa i oblića (Suzuki i sur. 2014; Taiz i Zeiger 2010). Stresni čimbenici mogu se nadalje podijeliti na primarne i sekundarne. U primarne stresne čimbenike ubrajaju se ranije spomenuti biotički i abiotički stresni čimbenici, ali i antropogeni koji nastaju pod utjecajem čovjeka. Osim navedenih primarnih stresnih čimbenika postoje i sekundarni koji nastaju kao posljedica djelovanja primarnih. Primjerice, njima pripada oksidacijski stres, koji je rezultat djelovanja primarnih faktora poput ekstremnih temperatura, suše, napada patogena, te osmotski stres, koji je rezultat djelovanja suše, povećane koncentracije soli u tlu te visoke i niske temperature (Zhu 2016). Svaki od navedenih stresnih čimbenika uzrokuje u biljkama zapanjujuću kaskadu mehanizama odgovora i obrane, koji su regulirani aktivacijom raznih signalnih puteva i fitohormona (Suzuki i sur. 2014; Fujita i sur. 2006). Odgovor biljke na stres ovisi o trajanju i jačini nekog stresnog čimbenika. Također, kombinacija više stresnih čimbenika i njihovo istovremeno djelovanje može dovesti do potpuno drugačijeg odgovora biljke od djelovanja pojedinačnog stresnog čimbenika. Odgovor biljke može biti pokrenut stresnim čimbenikom izravno, kao što je to slučaj kod suše, ili biti rezultat oštećenja nastalih uslijed stresa, kao što je gubitak integriteta membrane. Otpornost ili osjetljivost biljke na bilo koji stresni čimbenik ovisi i o samoj biljnoj vrsti, genotipu biljke, razvojnom stadiju i organu ili tkivu na koji stres djeluje (Buchanan i sur. 2015). Posljedično tome, biljkama je vrlo važna regulacija signalnih puteva. Stanični, molekularni i biokemijski odgovori, a ponekad i promjena morfologije koja prati percepciju stresnih uvjeta, često dovode do indukcije sofisticiranih mehanizama prilagodbe na nepovoljne okolišne uvjete (Benikhlef i sur. 2013). Biljke mogu povećati svoju toleranciju na nepovoljne uvjete i za takve biljke kažemo da su aklimatizirane. Tijekom aklimatizacije organizam mijenja

svoju homeostazu s ciljem prilagodbe vanjskim uvjetima i osiguravanja boljeg preživljenja (Buchanan i sur. 2015).

1.2. Učinak UVB-zračenja na biljke

Biljke koriste Sunčevu svjetlost kao izvor energije i kao važan ekološki signal za reguliranje rasta i razvoja. Svjetlost utječe na veliki broj fizioloških i razvojnih stadija biljaka, u rasponu od klijanja sjemena do prijelaza iz vegetativnog rasta u cvatnje (Frohnmeyer i Staiger 2003). Više biljke, kao što je modelni organizam *Arabidopsis thaliana* koriste signale Sunčeve svjetlosti za regulaciju čitavog niza razvojnih procesa i prilagodbi, uključujući klijanje, deetiolaciju, izbjegavanje sjene, razvoj puči, cirkadijani ritam i cvjetanje. Osim regulacije rasta i razvoja, koja se danas naziva "normalna" fotomorfogeneza, jaka svjetlost, a posebno njen integralni ultraljubičasti (UV, engl. *ultraviolet*) dio, može izazvati stresne reakcije u biljkama (Müller-Xing i sur. 2014). Osim vidljive svjetlosti, Sunčevo zračenje koje ulazi u Zemljinu atmosferu također sadrži ultraljubičasto i infracrveno zračenje (IR, engl. *infrared*). Na temelju bioloških učinaka koje izaziva, UV-zračenje se dijeli na UVC-zračenje (100-280 nm), UVB-zračenje (280-320 nm) i UVA-zračenje (320-400 nm). Zbog formiranja stratosferskog ozonskog omotača koji u potpunosti apsorbira Sunčevo UVC-zračenje i veći dio UVB-zračenja, do površine Zemlje dopire samo UV-zračenje koje obuhvaća UVA-zračenje te dio UVB-zračenja (McKenzie i sur. 2011).

Sesilni način života prisiljava biljke da se prilagode promjenjivim uvjetima okoliša. Općenito, biljke različito reagiraju na zračenje niskim ili visokim dozama UVB-zračenja, bilo stimuliranjem zaštitnih mehanizama ili aktiviranjem mehanizama popravka. Najčešći zaštitni mehanizam protiv potencijalno štetnog UVB-zračenja je biosinteza spojeva koji to zračenje apsorbiraju (Hahlbrock i Scheel 1989). Sekundarni metaboliti, uglavnom fenolni spojevi, flavonoidi i esteri hidroksicinamata, nakupljaju se u vakuolama epidermalnih stanica kao odgovor na UVB-zračenje. Njihova biosinteza prigušuje prodor tog zračenja u dublje slojeve stanica i tkiva te se smatra najučinkovitijim mehanizmom zaštite koji se stimulira pod utjecajem UVB-zračenja (Frohnmeyer i Staiger 2003). Mnogi dijelovi biljnih stanica apsorbiraju UVB-zračenje sa štetnim posljedicama za stanicu te naposljetku i organizam. UVB-zračenje je citotoksično i oštećuje stanicu na mnogim razinama, uključujući nukleinske kiseline, lipide, fotosintetske pigmente i proteine, uzrokuje smanjenje otpornosti na patogene te izaziva promjenu staničnih procesa (Jenkins 2009; Li i sur. 2013). Izlaganje visokim dozama

UVB-zračenja uzrokuje razgradnju klorofila, smanjenje ekspresije gena važnih za proces fotosinteze i njezinu kasniju inhibiciju. S druge strane, subletalne doze UVB-zračenja koriste se u tehnologiji nakon žetve i/ili berbe kako bi se umanjilo žućenje lišća pri skladištenju, koje je posljedica razgradnje klorofila i smanjene ekspresije gena povezanih s fotosintezom. Slični simptomi postoje tijekom djelovanja mnogih abiotičkih i biotičkih stresnih uvjeta, kao i tijekom prirodnog starenja (Sztatelman i sur. 2015). Također, više razine UVB-zračenja izazivaju proizvodnju reaktivnih kisikovih oblika (ROS, engl. *reactive oxygen species*) i aktiviraju opće signalne putove odgovora na stres (Brown i Jenkins 2008; Caverzan i sur. 2012). No, osim uloge ROS-ova kao toksičnih nusproizvoda aerobnog metabolizma, danas je poznata i njihova uloga u kontroli i regulaciji bioloških procesa, kao što su rast i razvoj, stanični ciklus, programirana stanična smrt, hormonska signalizacija te odgovor na biotičke i abiotičke stresne čimbenike (Garg i Manchanda 2009). Rad koji su objavili Surplus i suradnici (1998) pokazao je da su ROS-ovi također uključeni u UVB-zračenjem aktivirane signalne puteve koji dovode do regulacije fotosintetskih transkripata u zelenim organima vrste *A. thaliana*. Do stvaranja ROS-ova uslijed djelovanja UVB-zračenja dolazi zbog metaboličkog poremećaja i oštećenja sastavnica fotosintetskog lanca prijenosa elektrona ili zbog povećane aktivnosti NADPH-oksidaza i peroksidaza (Hideg i sur. 2013) lokaliziranih u membranama. Nadalje, UVB-zračenje utječe na fotosustav II (PSII, engl. *photosystem II*) u mnogo većoj mjeri nego na fotosustav I (PSI, engl. *photosystem I*). Razgradnja integralnih komponenti reakcijskih centara (RC, engl. *reaction center*) PSII, uključujući proteine D1 i D2, te mehanizam popravka opsežno su proučavane posljedice učinka UVB-zračenja na fotosintezu (Hollósy 2002). Biljke prilagođavaju svoj rast i razvoj prema uvjetima osvjetljenja u okolišu koje se može dinamički mijenjati. Posljedično, biljke su razvile skup molekula aktiviranih svjetlom, poznatih kao fotoreceptori, koji reagiraju na promjenu kvalitete svjetlosti te na količinu, smjer i trajanje osvjetljenja. Fitokromi (u *A. thaliana* su prisutni phyA, phyB, phyC, phyD i phyE) su fotoreceptori koji apsorbiraju crveni i tamnocrveni dio svjetlosnog spektra, dok su kriptokromi (cry1 i cry2), fototropini (phot1 i phot2) i članovi obitelji fotoreceptora *Zeitlupe* (ZTL, FKF1 i LKP2) receptori koji reagiraju na UVA-zračenje i plavi dio svjetlosnog spektra, a UVR8 je UVB fotoreceptor (Müller-Xing i sur. 2014). UVB-zračenje inducira fotomorfogenezu biljaka kao i reakcije privikavanja na UVB-zračenje, što omogućuje biljkama da podnose UVB stres (Frohnmeyer i Staiger 2003). Kako bi se zaštitile od intenzivne Sunčeve svjetlosti biljke su razvile specifičan signalni put aktiviran UVB-zračenjem posredovan fotoreceptorom UVR8 (engl. *UV resistance locus 8*) koji regulira rast, razvoj i aklimatizaciju. UVB receptor UVR8, istraživanja potvrđuju, ima brzi odgovor na UV signalizaciju (Müller-Xing i sur. 2014). Od

identifikacije UVR8 kao UVB fotoreceptora, napravljen je značajan napredak u razumijevanju mehanizma njegovog djelovanja. Interakcija ovisna o UVB-zračenju između UVR8 i COP1 (multifunkcionalna E3 ubikvitin ligaza, engl. *constitutively photomorphogenic 1*) pojavila se kao ključni mehanizam u UVB signalnom putu (Ballaré i sur. 2011). Osim toga, postignut je napredak u razumijevanju ekspresije gena reguliranih s UVR8 te je otkriveno da je veći broj fizioloških odgovora povezan sa signalima koji ovise o UVR8, uključujući regulaciju odgovora induciranih različitim signalima iz okoline (Yin i Ulm 2017). COP1 je poznati represor fotomorfogeneze u tami kao i na svjetlosti, ali je promotor UVB-specifičnih odgovora. Mutante *cop1* uzgajane u tami imaju fenotip biljaka uzgojenih na svjetlu te pokazuju značajke pojačane fotomorfogeneze ako su uzgajani na svjetlosti, ali im nedostaju UVB fotomorfogeni odgovori (Yi i Deng 2005; Oravecz i sur. 2006). Mnogi aspekti UVR8 signalizacije su i dalje nepoznati i predmet su daljnjih istraživanja, uključujući podatke o tome kako UVR8 regulira transkripciju gena u jezgri, prirodu COP1 signalizacije u UVR8 putu i detalje o povezanosti između aktivacije UVR8 i potiskivanja biosinteze hormona i/ili signalizacije u kojoj sudjeluju. Daljnja istraživanja u ovim područjima trebala bi povećati naše razumijevanje UVR8-UVB signalnog puta i međudjelovanja između UVB-zračenja i drugih čimbenika okoliša.

1.2.1. Značenje istraživanja učinka UVB-zračenja na biljke

UVB je relativno mala komponenta Sunčevog zračenja, ali može potaknuti fiziološke procese povezane sa stresom ili UVB-specifične fotomorfogene odgovore u biljaka (Brown i Jenkins 2008). Razumijevanje mehanizama odgovora biljaka na različite stresne čimbenike, uključujući i UVB-zračenje, nužno je kako bismo osigurali opskrbu hranom i razvili visoko otporne biljne vrste u uvjetima današnjih nepovoljnih klimatskih promjena te brzog porasta broja stanovnika na Zemlji (Ballaré i sur. 2011). Brze i nepovoljne klimatske promjene te uništavanje ozonskog omotača djelovanjem klorofluorougljika rezultiralo je povećanjem razine UVB-zračenja koje dopire do površine Zemlje te se posljednjih desetljeća znatno povećao potencijal štetnog učinka UVB-zračenja (Moan 2001). Vrlo je važno istražiti djelovanje UVB-zračenja na različite biljne kulture koje se uzgajaju za prehranu jer ono utječe na prinose u poljoprivredi. Na primjer, učinak UVB-zračenja, kao i odgovor biljaka na UVB-zračenje, istraživan je na mnogim kulturama biljaka uključujući kukuruz (Casati i Walbot 2004; Falcone Ferreyra i sur. 2010; Casati i sur. 2011), ječam (Kravets i sur. 2012), krastavac (Shinkle i sur. 2010), vinovu lozu (Pontin i sur. 2010; Martínez-Lüscher i sur. 2013) i druge biljne vrste. Prošla dva desetljeća svjedočila su dramatičnom napretku u razumijevanju

mehanizama koji su inducirani UVB-zračenjem te izazivaju fotomorfogenezu ili stres u višim biljkama. S molekularnom karakterizacijom UVR8 kao UVB fotoreceptora (Rizzini i sur. 2011) i razjašnjavanjem njegove kristalne strukture (Christie i sur. 2012), postaje sve jasnije kako se UVB signali primaju i prenose kako bi se ostvario širok raspon odgovora.

1.3. Pokazatelji učinka stresa u biljaka

Na staničnoj razini odgovor na stresne uvjete uključuje promjene u staničnom ciklusu i diobi, promjene u unutarstaničnim membranskim sustavima i vakuolizaciji stanica te promjene u staničnoj membrani i staničnoj stijenci. U većini slučajeva stres izražavamo kao preživljavanje biljke, stopu rasta, akumulaciju biomase ili kao procese asimilacije ugljikova dioksida i mineralnih tvari. Na biokemijskoj razini dolazi do promjene metabolizma u biljnim stanicama sa svrhom prilagodbe biljaka okolišnim stresnim čimbenicima (Taiz i Zeiger 2010). Abiotički stresni čimbenici dovode do prekomjerne proizvodnje ROS-ova u biljaka što u konačnici rezultira oksidativnim stresom. Biljke posjeduju vrlo učinkovite enzimske (katalaza, gvajakol peroksidaza, askorbat peroksidaza, superoksid dismutaza) i neenzimske antioksidacijske obrambene sustave koji štite biljne stanice od oksidativnog oštećenja uklanjanjem ROS-ova (Gill i Tuteja 2010; Caverzan i sur. 2012). Osim mjerenja aktivnosti navedenih enzima oksidacijski stres se može detektirati mjerenjem količine H_2O_2, peroksidacije masnih kiselina te količine prolina (Quan i sur. 2008; Davies 2000; Mattioli i sur. 2009). Također, fiziološki parametri koji ukazuju na utjecaj stresnih čimbenika na biljke jesu učinkovitost procesa fotosinteze te količina fotosintetskih pigmenata.

1.3.1. Pokazatelji oksidacijskog stresa

Oksidacijski stres u stanicama pojavljuje se uslijed pojačanog nakupljanja ROS-ova kao odgovora na različite biotičke i abiotičke okolišne stresne čimbenike. ROS-ovi su djelomično reducirani ili aktivirani oblici atmosferskog kisika (O_2). U biološkim sustavima postoji veliki broj različitih vrsta ROS-ova, među kojima najbitniju ulogu u oksidacijskom stresu imaju singletni kisik ($^1O_2$), superoksidni radikal (O_2^-), vodikov peroksid (H_2O_2) i hidroksilni radikal (•OH) (Gill i Tuteja 2010). Oksidativni stres ovisi o reguliranom procesu održavanja ravnoteže između oksidativnih i antioksidativnih mehanizama koji određuju sudbinu biljke. U povoljnim uvjetima antioksidacijski obrambeni sustav pruža odgovarajuću zaštitu od ROS-ova koji u određenoj količini nastaju prijenosom elektrona u procesu

fotosinteze te u lancu prijenosa elektrona u mitohondriju. Kao odgovor na stresne uvjete, povećava se kapacitet antioksidativnog obrambenog sustava (Arora i sur. 2002). Pokazatelji oksidacijskog stresa su ROS-ovi od kojih su neki dovoljno stabilni da ih možemo mjeriti te parametri koji se pojavljuju ili mijenjaju kao posljedica djelovanja ROS-ova, kao što je npr. stupanj lipidne peroksidacije, sadržaj prolina, sadržaj vodikovog peroksida te aktivnost antioksidacijskh enzima (CAT, G-POD, APX i SOD).

Lipidna peroksidacija

Peroksidacija lipida smatra se štetnim procesom koji se može dogoditi u svakom živom organizmu. Lipidna peroksidacija, odnosno peroksidacija masnih kiselina kojom nastaju molekule poput malondialdehida (MDA), česti je marker oksidacijskog stresa (Noctor i sur. 2015). Predstavlja sekundarnu reakciju na stres izazvanu primarnim proizvodima stresa, odnosno ROS-ovima (Blokhina i sur. 2003). Proces lipidne peroksidacije odvija se u tri faze: inicijacija, propagacija i terminacija (Catalá 2006). Započinje uklanjanjem vodikovog atoma iz lanca masne kiseline u sastavu lipidne molekule uz pomoć hidroksilnog, alkoksilnog ili peroksilnog radikala, čime nastaje lipidni radikal koji može aktivirati molekulu kisika koja dalje nastavlja proces oksidacije lipida. Jedan događaj inicijacije stoga ima potencijal generiranja više molekula peroksida lančanom reakcijom. Nastali lipidni radikal može se lako razgraditi na nekoliko reaktivnih vrsta uključujući: lipidne alkoksilne radikale, aldehide (npr. MDA), alkane i lipidne epokside te alkohole (Davies 2000). Stoga se stupanj lipidne peroksidacije može odrediti na temelju spektrofotometrijskog mjerenja koncentracije MDA (Sunkar i sur. 2003). Posljedice lipidne peroksidacije jesu jaka oštećenja staničnih membrana, gubitak fluidnosti i funkcije membrane kao barijere, dezintegracija organela, inaktivacija receptora, enzima i ionskih kanala (Demidchik 2015).

Vodikov peroksid

Vodikov peroksid (H_2O_2) nastaje od superoksidnog aniona i uz djelovanje superoksid dismutaze, u lancu prijenosa elektrona u kloroplastima i mitohondrijima, djelovanjem NADPH oksidaza u plazmatskoj membrani, peroksisomalnim oksidazama, peroksidazama tipa III i drugim apoplastnim oksidazama. Difuziju H_2O_2 kroz membrane olakšavaju akvaporini, a uklanjaju ga katalaza, glutation peroksidaza i askorbat peroksidaza. Ti enzimi postoje u više

izoformi, specifičnih za stanični odjeljak (Smirnoff i Arnaud 2019). Vodikov peroksid jedan je od glavnih kisikovih spojeva koji nastaje u biljkama tijekom oksidativnog stresa. U usporedbi s drugim ROS-ovima je relativno stabilan i dulje se zadržava u tkivu (Demidchik 2015). H_2O_2 ima dvojaku ulogu u biljkama: pri niskim koncentracijama djeluje kao signalna molekula uključena u aklimatizacijsku signalizaciju pokrećući toleranciju na različite biotičke i abiotičke stresne čimbenike, a pri visokim koncentracijama pokreće autofagiju kloroplasta i peroksisoma te programiranu smrt stanica (Quan i sur. 2008). Glavni štetni učinci H_2O_2 očituju se u poticanju lipidne peroksidacije i inaktivaciji enzima. Oksidacija tiolne (-SH) skupine, koja potječe od aminokiseline cisteina, uzrokuje promjenu rasporeda disulfidnih veza, što posljedično dovodi do modifikacije i promjene funkcije proteina, modifikacije ciljnih enzima, receptorskih kinaza i transkripcijski faktora (Choudhury i sur. 2017).

1.3.2. Antioksidacijski sustav u biljaka

Kao što je ranije spomenuto, nastanak ROS-ova u biljnim stanicama neizbježan je dio normalnog metabolizma, međutim zbog potencijalno štetnog učinka njihove prekomjerne količine potrebno je regulirati njihovu razinu u stanici (Choudhury i sur. 2017). Budući da su biljke evoluirale uz prisutnost ROS-ova, razvile su i brojne prilagodbe na njihove toksične učinke (Demidchik 2015). Sastavnice antioksidacijskog sustava nalaze se u pojedinim staničnim odjeljcima upravo zbog postojanja proizvodnje specifičnih ROS-ova u tim odjeljcima (Apel i Hirt 2004). Tako su identificirani u mitohondrijima, kloroplastima, peroksisomima i citoplazmi (Mittler 2002). Glavna zadaća antioksidacijskog sustava jest održati ravnotežu nastajanja i neutralizacije učinka ROS-ova (Apel i Hirt 2004). Posljedično tomu, povećana aktivnost enzima antioksidacijskog sustava u izravnoj je vezi s boljim odgovorom biljaka na različite abiotičke i biotičke okolišne stresne čimbenike (Kapoor i sur. 2019). Za obranu od oksidacijskog stresa biljke posjeduju vrlo učinkovite enzime (CAT, G-POD, APX i SOD) i neenzimske antioksidanse (askorbinska kiselina, glutation, fenolni spojevi, alkaloidi, prolin, neproteinske aminokiseline, karotenoidin i α-tokoferol) koji djeluju zajedno kako bi kontrolirali kaskadu oksidacije i štitili biljne stanice od oksidativnog oštećenja uklanjanjem ROS-ova (Gill i Tuteja 2010).

Katalaza

Katalaza (CAT, engl. *catalase*) je tetramerni enzim koji sadrži hem i ima ulogu u razgradnji H_2O_2 na vodu i kisik te igra važnu ulogu u metabolizmu te obrani biljaka od posljedica stresnih čimbenika (Garg i Manchanda 2009). CAT je bio prvi antioksidacijski enzim koji je otkriven i opisan. Široko je rasprostranjen te visoko eksprimiran enzim koji predstavlja dio antioksidacijske zaštite stanice (Anjum i sur. 2016). U višim biljkama CAT je uglavnom lokaliziran u peroksisomima i mitohondrijima (Su i sur. 2014). Služi za razgradnju H_2O_2 koji nastaje tijekom transporta elektrona u lancu prijenosa elektrona u mitohondriju, β-oksidacije masnih kiselina te tijekom fotorespiracije. Izloženost stanice povišenim koncentracijama ROS-ova dovodi do snažne indukcije ovog enzima. Posljedično, CAT sprječava narušavanje membranskog integriteta i oksidaciju nukleinskih kiselina, proteina i lipida (Arora i sur. 2002; Mafakheri i sur. 2011). Iako ima visoku katalitičku učinkovitost, ima izrazito nizak afinitet prema supstratu (Willekens i sur. 1995).

Peroksidaze

Peroksidaze su glikoproteini koji sadrže hem te su prisutni u gljivama, biljkama i kralježnjacima. U biljaka su povezane s mnogim biokemijskim i fiziološkim procesima kao što su rast, razvoj ploda, biosinteza etilena, kao i odgovor na različite stresne uvjete (Matamoros i sur. 2003). Askorbat peroksidaza (APX, engl. *ascorbate peorxidase*) je najvažnija peroksidaza u detoksikaciji H_2O_2 te katalizira redukciju H_2O_2 u vodu korištenjem askorbata (askorbinska kiselina ili vitamin C) kao reducensa (Jebara i sur. 2005). Ekspresiju gena koji kodiraju APX moduliraju različiti okolišni stresni čimbenici, kao što su suša i solni stres, visoki intenzitet svjetlost, visoke i niske temperature, napadi patogena te nakupljanje H_2O_2 (Zhang i sur. 1997). Nadalje, transkripcijska ekspresija gena za APX ovisi o tkivu i stadiju razvoja (Teixeira i sur. 2004). U biljkama su identificirane različite izoforme APX-a te su klasificirane prema lokalizaciji u stanici. Tako postoje izoforme iz citosola, mitohondrija, kloroplasta te peroksisomalne i glioksisomalne izoforme i sve one funkcioniraju kao "čistači" H_2O_2 koji se kontinuirano stvara u stanicama (Miyake i Asada 1992). APX ima veći afinitet za H_2O_2 od CAT i koristi askorbat kao specifični donor elektrona za redukciju H_2O_2 u H_2O u organelima, uključujući kloroplaste, citosol, mitohondrije i peroksisome (Anjum i sur. 2016). Također, budući da CAT nije prisutan u kloroplastima, APX ima ključnu ulogu u ovom organelu (Madhusudhan i sur. 2003). Gvajakol peroksidaza (G-POD, engl. *guaiacol peroxidase*) za

redukciju H_2O_2 kao reducirajuće sredstvo preferira aromatske donore elektrona poput gvajakola te ju nalazimo u apoplastu, citosolu, vakuoli i staničnoj stijenci (Uarrota i sur. 2016). Za razliku od CAT koja je aktivna samo pri relativno visokim koncentracijama H_2O_2, G-POD, kao i APX, zbog većeg afiniteta za H_2O_2 uklanja niže koncentracije H_2O_2 (Erofeeva 2015).

Superoksid dismutaza

Superoksid dismutaza (SOD, engl. *superoxide dismutase*) je metaloenzim, a ovisno o kofaktoru metala u aktivnom mjestu (Mn, Fe ili CuZn) poznate su tri klase (Moran i sur. 2003). SOD štiti stanice od potencijalnih posljedica uzrokovanih citotoksičnim O_2^- katalizirajući njegovu pretvorbu u O_2 i H_2O_2. Stoga, enzimi SOD predstavljaju prvu liniju obrane protiv povećane količine ROS-ova i njihovih reakcijskih produkata induciranih abiotičkim stresnim uvjetima pa tako i UVB-zračenjem (Gill i sur. 2015). U stanicama se SOD nalazi na svim mjestima gdje se događa lanac prijenosa elektrona, što uključuje mitohondrije, kloroplaste, te u peroksisomima, apoplastu, i citosolu. Ovisno o staničnom odjeljku u kojem djeluje, SOD u aktivnom mjestu ima drugačiji metalni kofaktor (Alscher i sur. 2002).

Prolin

Prolin je jedna od aminokiselina do čijeg nakupljanja dolazi prilikom izlaganja biljaka različitim stresnim čimbenicima. Osim u biljkama, to se događa i u eubakterijama, protozoama te morskim beskralješnjacima (Verbruggen i Hermans 2008). Zabilježeno je da se u biljkama akumulacija prolina događa nakon solnog stresa, suše, visoke i niske temperature, djelovanja teških metala, infekcije patogenima, hipoksije, nedostatka hranjivih tvari, zagađenja atmosfere te UVB-zračenja (Hare i Cress 1997; Siripornadulsil i sur. 2002). Osim što je izvrstan osmolit, prolin ima tri važne uloge u stresnim uvjetima: djeluje kao kelirajući agens, kao molekula antioksidacijskog sustava i kao signalna molekula. Akumulacija prolina uslijed stresnih uvjeta poboljšava toleranciju stresa tako što održava turgor i osmotsku ravnotežu u stanici, stabilizira membrane te pridonosi kontroli koncentracije ROS-ova, održava ravnotežu redoks-stanja u stanici, kako bi spriječio oksidacijski stres u biljaka (Hayat i sur. 2012). Također je predloženo da prolin funkcionira kao molekularni šaperon koji stabilizira strukturu proteina. Konačno, prolin može sudjelovati u prijenosu signala koji utječe na adaptivne odgovore biljke na stres te na aklimatizaciju (Maggio i sur. 2002). Uz njegovu ulogu u sintezi proteina i odgovoru biljnih

stanica na stresne čimbenike iz okoliša, postoje dokazi koji upućuju na to da prolin također može igrati ulogu u cvjetanju i razvoju, i kao metabolit i kao signalna molekula (Mattioli i sur. 2009).

1.3.3. Fotosintetski pigmenti

Fotosinteza je jedan od najosjetljivijih metaboličkih procesa, a budući da je izravno povezana s proizvodnjom i prinosom biomase, vrlo je važno proučavati učinak stresa na fotosintezu (Kataria i sur. 2014). Djelovanje abiotičkih stresnih čimbenika izaziva brze promjene učinkovitosti fotosintetskog sustava kao i promjene sastava pigmenata. U fiziološke promjene uzrokovane UVB-zračenjem ubrajaju se smanjenje fotosintetske aktivnosti koje je uglavnom povezano s razgradnjom proteina u sastavu PSII (Sullivan i sur. 2003), promjene sadržaja klorofila i karotenoida (Surabhi i sur. 2009), smanjena aktivnost Rubisco-a (Yu i sur. 2013) i učinak na puči (Cooley i sur. 2000). UVB-zračenje utječe na fotosintetske pigmente, bilo putem inhibicije njihove sinteze ili djelovanjem na enzime uključene u biosintezu (Ranjbarfordoei i sur. 2011). Pojačanim UVB-zračenjem dolazi do smanjenja sadržaja fotosintetskih pigmenta koje je proporcionalno s povećanjem intenziteta zračenja, a također dolazi i do oštećenja strukture tilakoida te kloroplasta (Chu i Chen 2017). Fotosintetski pigmenti u viših biljaka jesu klorofil *a*, klorofil *b* i karotenoidi. Klorofili su glavni pigmenti u zelenim biljkama odgovorni za proces fotosinteze te je u nepovoljnim okolišnim uvjetima pad razine klorofila dobar pokazatelj fotosintetske aktivnosti pa tako i fiziološkog stanja biljke (Xu i sur. 2008). Karotenoidi su raznolika skupina terpenoidnih pigmenata koji su neophodni za normalno funkcioniranje biljnih organizama (Britton 1995). Mogu se razlikovati dvije glavne grupe karotenoida: neoksigenirani karotenoidi, nazvani karoteni (npr. β-karoten i likopen) i njihovi derivati koji sadrže kisik, nazvani ksantofili (npr. lutein i zeaksantin) (Havaux 2014). Prisutnost između tri i 13 konjugiranih dvostrukih veza u molekuli karotenoida omogućuje im apsorpciju svjetlosti raspona valnih duljina od 450-570 nm, čime djelomično pokrivaju dio spektra koji klorofili ne apsorbiraju, tj. smanjuju „zelenu rupu“ u apsorpcijskom spektru klorofila. Posljedično, karotenoidi mogu funkcionirati kao pomoćni pigmenti u fotosintezi, (Edge i sur. 1997). Osim toga, doprinose fotozaštiti i strukturnom integritetu fotosintetskog sustava (Solovchenko i Neverov 2017). Neki dokazi sugeriraju da je nakupljanje karotenoida, koje se događa u biljkama u uvjetima jakog svjetlosnog stresa i tijekom starenja, povezano s njihovom sposobnošću da apsorbiraju štetno zračenje i tako doprinose fotozaštiti (Merzlyak i Solovchenko 2002).

1.3.4. Polifazni rast fluorescencije klorofila *a* – OJIP-test

Mjerenje fluorescencije klorofila *a* je prilično brza, visoko osjetljiva, nedestruktivna i pouzdana metoda za procjenu fotosintetske učinkovitosti (Stirbet 2011). Uzimajući u obzir da je fotosintetski sustav prva meta djelovanja nekih abiotičkih stresnih čimbenika kao što su povišeni intenzitet svjetlosti, UVB-zračenje, nedostatak hranjivih tvari i suša, praćenje upravo ovog parametra vrijedan je alat za procjenu kako stresni uvjeti utječu na fiziološke mehanizme uključene u proces fotosinteze (Stirbet i sur. 2018). Kako je ranije već spomenuto, UVB-zračenje uzrokuje smanjenje fotosintetske učinkovitosti, što je uglavnom povezano s razgradnjom proteina PSII (Sullivan i sur. 2003), a ima i utjecaj na sadržaj klorofila i karotenoida (Surabhi i sur. 2009). U povoljnim okolišnim uvjetima za biljku većina se apsorbirane svjetlosne energije koristi za reakcije fotosinteze, dok se manji dio energije gubi u obliku topline i svjetlosti (fluorescencije). Nakon izlaganja biljke određenom stresnom čimbeniku, povećava se udio energije koja se gubi u obliku topline i fluorescencije (Lichtenthaler i Babani 2000). OJIP-test temelji se na brzom porastu fluorescencije klorofila *a* u uvjetima *in vivo* pri kontinuiranom osvjetljavanju listova biljke, odnosno pri pokretanju procesa fotosinteze. U biljaka prilagođenih na uvjete tame, svi fotosintetski RC-i su u „otvorenom“ stanju pri čemu su plastokinon A i plastokinon B potpuno oksidirani (Strasser i sur. 2004). Kada su RC-i u takvom „otvorenom“ stanju, fluorescencija klorofila *a* je minimalna. Apsorbirana svjetlost pokreće razdvajanje naboja u RC-ima nakon čega se nastavlja prijenos elektrona preko plastokinona A i B. Prelazak većeg broja molekula plastokinona, kao i drugih sastavnica lanca prijenosa elektrona, u reducirano stanje dovest će do porasta fluorescencije. Budući da tijekom kontinuiranog osvjetljavanja lista fluorescencija raste od minimalne vrijednosti F_0 ili O (engl. *open state*) do najviše vrijednosti P, a na prikazu, tj. krivulji se mogu uočiti i međukoraci J (označava redukciju plastokinon A) te I (označava redukciju plastokinona B) (Küpper i sur. 2019), krivulja polifaznog rasta fluorescencije klorofila *a* nazvana je OJIP krivuljom, a metoda mjerenja fluorescencije klorofila metodom OJIP ili OJIP-testom.

1.4. Protein BPM1

Protein BPM1 pripada porodici proteina MATH-BTB, koji se nazivaju i proteini BPM, a djeluju kao adapteri za vezanje supstrata na ubikvitin ligazu E3 baziranu na kulinu 3 (CUL3). Proteini MATH-BTB se povezuju s CUL3 preko domene BTB, a sa supstratnim proteinom

preko domene MATH (Pintard i sur. 2003). Kao podjedinice multimernih E3 ubikvitin ligaza, kompleksi CUL3-BTB posreduju u obilježavanju proteina ubikvitinom, nakon čega se obilježeni proteini usmjeravaju u razgrađuju putem proteasoma (Chen i Hellman 2013; Genschik i sur. 2013). Budući da je degradacija proteina posredovana ubikvitinom uključena u regulaciju brojnih staničnih procesa, proteini BPM kao sastavni dio tog mehanizma, također sudjeluju u kontroli važnih razvojnih procesa u biljaka (Weber i Hellman 2009). Nadalje, proteini BPM igraju važnu ulogu u cvjetanju, razvoju sjemena kao i u odgovoru biljaka na abiotičke stresne čimbenike. U genomu *A. thaliana* postoji šest gena *BPM* koji kodiraju najmanje 16 različitih izoformi proteina zbog odvijanja procesa alternativnog prekrajanja gena (engl. *alternative splicing*) (Lechner i sur. 2011). Okolišni uvjeti i abiotički stresni čimbenici značajno utječu na ekspresiju gena *BPM1* te nakupljanje proteina BPM1 (Škiljaica i sur. 2020). U nekoliko istraživanja dokazana je uloga proteina BPM u regulaciji transkripcijskih faktora čime je dokazana njihova uloga kao posrednika u transkripciji gena (Lechner i sur. 2011; Chen i sur. 2015; Morimoto i sur. 2017). Proteini BPM iz *A. thaliana* vežu transkripcijske faktore obitelji ERF/AP2, transkripcijske faktore s motivom leucinskog zatvarača klase I, kao i transkripcijske faktore obitelji R2R3 MYB i proteinske fosfataze tipa 2C (Škiljaica i sur. 2020). Lokalizacijske analize s fuzijskim proteinima GFP (engl. *green fluorescent protein*) otkrile su da se GFP, odnosno protein BPM-GFP nalazi u jezgri i/ili citoplazmi (Weber 2010).

Do danas su opisane tri različite linije mutanata biljke *A. thaliana* sa smanjenom razinom ekspresije određenih proteina BPM (Lechner i sur. 2011; Chen i sur. 2015; Morimoto i sur. 2017) za koje su utvrđene promjene u razvoju. Fenotip tih linija donekle se razlikovao, što upućuje na to da pojedini geni *BPM* imaju specifične uloge u biljci (Škiljaica i sur. 2020). Također, istraživači su generirali i opisali mutirane linije biljke *A. thaliana* s pojačanom razinom ekspresije gena *BPM1* obilježenog genom za protein GFP pod jakim konstitutivnim promotorom 35S. Otkriveno je kako su svi primarni transformanti eksprimirali punu duljinu BPM1-GFP mRNA, međutim rekombinantni protein BPM1-GFP otkriven je fluorescentnom mikroskopijom samo u dvije među više od stotinu pregledanih linija (Škiljaica i sur. 2020).

1.5. Biljka *Arabidopsis thaliana* kao modelni organizam

Biljka *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., uročnjak ili talijin uročnjak, jednogodišnja je zeljasta cvjetnjača iz porodice kupusnjača ili krstašica (Brassicaceae) koja je prihvaćena kao modelni organizam prikladan za biljnu biologiju, ali i za širu primjenu, tj. za rješavanje

temeljnih pitanja vezanih uz biološku strukturu i funkciju, koja mogu biti zajedničkih svim eukariotima. Široke je geografske rasprostranjenosti u Europi, a porijeklom je iz Azije (Meinke i sur. 1998). Cvjetovi su dugi 2 mm, samooprašuju se kako se pupoljci otvaraju, a mogu se križati nanošenjem peluda na površinu stigme. Sjemenke su u zrelosti dugačke 0,5 mm i proizvode se u uskim plodovima poznatim kao "komuške". Listovi su prekriveni malim jednostaničnim dlačicama, trihomima, koji su prikladni modeli za proučavanje morfogeneze i stanične diferencijacije. Cijeli životni ciklus je kratak te od klijanja sjemenki do sazrijevanje prvih sjemenki traje 6 tjedana. Laboratorijski uzgoj je jednostavan kao i genetička manipulacija. Genom je veličine oko 135 Mb, sadrži 27 655 gena, organiziran je u pet kromosoma te je u potpunosti sekvenciran (Weigel i Mott 2009). Sva ta svojstva čine uročnjak idealnim biljnim modelnim organizmom u području genetike, molekularne i razvojne biologije. Postoji mnogo različitih ekotipova prikupljenih iz prirodnih populacija i dostupnih za eksperimentalnu analizu, a ekotip Columbia (Col) prihvaćen je kao standard za genetičke i molekularne studije. Biljke *A. thaliana* koje sam odabrala i koristila u ovom istraživanju su divlji tip (wt), linija s pojačanom ekspresijom gena *BPM1* (*oeBPM1*) (Škiljaica i sur. 2020) te linija sa smanjenom ekspresijom gena *BPM1, BPM4, BPM5* i *BPM6* (*amiR-bpm*) (Lechner i sur. 2011).

1.5.1. Linija *oeBPM1*

Linija *oeBPM1* ili linija *L104* dobivena je transformacijom divljeg tipa *A. thaliana* s konstruktom u kojem je gen *BPM1* fuzioniran s genom za protein GFP. Ekspresija ovog rekombinantnog gena je pod kontrolom jakog, konstitutivnog promotora 35S, te ova linija konstitutivno proizvodi rekombinantni protein BPM1-GFP. Ekspresija gena za ovaj rekombinantni protein BPM1-GFP pojačana je u odnosu na gen *BPM1* u divljeg tipa (Škiljaica i sur. 2020).

1.5.2. Linija *amiR-bpm*

Lechner i suradnici (2011) su uz pomoć tehnologije amiR (engl. *artificial microRNA*) dobili mutante u kojima je utišano nekoliko gena *BPM*. Poravnavanjem nukleotidnih sekvenci pokazano je savršeno podudaranje između sekvenci gena *BPM1, BPM4* i *BPM6* i sekvenci odabranih mikroRNA tako da je utišavanje navedenih gena očekivano. Dobivene transgenične linije su dalje istražili i dokazali smanjenu akumulaciju transkripta gena *BPM1*, *BPM4*, *BPM5*

i *BPM6*. Na ovaj je način smanjena ekspresija gena *BPM1*, *BPM4*, *BPM5* i *BPM6*, dok je ekspresija gena *BPM2* i *BPM3* normalna, pa čak i blago pojačana u odnosu na ekspresiju ovih gena u divljem tipu (Lechner i sur. 2011).

2. Opći i specifični ciljevi rada

Opći cilj ovog rada bio je istražiti učinak UVB-zračenja na biljku uročnjak, *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. te doprinijeti boljem razumijevanju odgovora biljke na takvu vrstu stresnog čimbenika. Također, cilj je bio utvrditi razliku u odgovoru na stres u linija biljaka s promijenjenom ekspresijom gena *BPM* u usporedbi s biljkama divljeg tipa te ima li promjena ekspresije spomenutih gena učinak na odgovor biljaka na UVB-zračenje.

Specifični ciljevi rada bili su sljedeći:

- utvrditi dozu UVB-zračenja kojoj ću izlagati klijance te vremensku točku sakupljanja uzoraka nakon izlaganja UVB-zračenju
- istražiti učinak UVB-zračenja na pokazatelje stresa u biljaka mjerenjem količine vodikovog peroksida, sadržaja prolina i određivanjem stupnja lipidne peroksidacije
- istražiti učinak UVB-zračenja na aktivaciju antioksidacijskog sustava u biljaka određivanjem aktivnosti antioksidacijskih enzima (katalaze, askorbat peroksidaze, gvajakol peroksidaze i superoksid dismutaze)
- istražiti učinak UVB-zračenja na fotosintezu u biljaka određivanjem udjela fotosintetskih pigmenata u klijancima i mjerenjem polifaznog rasta fluorescencije klorofila *a* OJIP-testom
- usporediti rezultate dobivene na biljkama uročnjaka divljeg tipa (wt), biljkama s pojačanom razinom ekspresije gena *BPM1* (*oeBPM1*) i biljkama s utišanom ekspresijom gena *BPM1*, *BPM4*, *BPM5* i *BPM6* (*amiR-bmp*)

3. Materijal i metode

3.1. Korišteni uređaji

Prilikom izvođenja pokusa korišteni su sljedeći uređaji: autoklav AMB240N, Astel Scientific, UK; spektrofotometar UV-VIS Specord 40, Analytic Jena, Njemačka; magnetna miješalica Rotamix 550 MMH, Tehtnica, Slovenija; centrifuga 3-18K, Sigma; centrifuga 5804 R, Eppendorf, Njemačka; vrtložna miješalica Vibromix 204 EV, Tehtnica, Slovenija; termoblok AccuBlock, Labnet, SAD; pH-metar MA 5736, Metrel, Slovenija; analitička vaga BL 120S, Sartorius, Hrvatska; uređaj za izlaganje uzoraka UVB-zračenju - UV Cross-linker CL-508, Uvitec, UK; NanoDrop 100 spektrofotometar, Thermo Fisher Scientific, SAD; miješalica Roto-Shake Genie, Scientific industries, SAD; uređaj za mjerenje fluorescencije klorofila a FluorPen FP 100, Photon Systems Instruments, Češka; komora s horizontalnim strujanjem sterilnog zraka (laminar) Heraeus, Njemačka; digestor, Waldner, Njemačka; mali sustav za gel-elektroforezu i prijenos proteina na membranu (Mini-Protean 3 i Trans-Blot Cell), Bio-Rad, SAD.

3.2. Biljni materijal i uvjeti uzgoja klijanaca

U pokusu sam koristila klijance triju linija biljke uročnjaka (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.), ekotip Columbia (Col-0). Linije koje sam koristila su divlji tip (wt), linija s pojačanom ekspresijom gena *BPM1* (*oeBPM1*) te linija sa smanjenom ekspresijom gena *BPM1*, *BPM4*, *BPM5* i *BPM6* (*amiR-bpm*). Biljke sam uzgajala u steriliziranoj tekućoj hranjivoj podlozi u plastičnim Petrijevim zdjelicama promjera 6 cm. Modificirani medij MS (Murashige i Skoog 1962) sadržavao je 1% (w/v) saharoze (Lach-Ner) i 2,5 mM MES-a (engl. *2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid sodium salt*, Sigma), a pH-vrijednost medija bila je 5,7. Sterilizirala sam ga autoklaviranjem pri temperaturi od 121 ºC i tlaku od 0,15 MPa u trajanju od 18 minuta. Klijanci su nakon sterilizacije sjemenki i stratifikacije (postupak je opisan u poglavlju 3.3.) uzgajani u komori za uzgoj biljaka u uvjetima dugog dana (16 sati svjetla i 8 sati tame) te pri temperaturi od 24 ± 1 ºC. Gustoća svjetlosnog toka (PFD) u komori za uzgoj biljaka iznosi 80-85 μmol $m^{-2}s^{-1}$ na razini klijanaca. Petrijeve zdjelice s klijancima bile su nasumično raspoređene na polici te im je raspored mijenjan svaki dan uzgoja. Za pokus sam koristila klijance stare 11 dana.

3.3. Sterilizacija sjemena i uzgoj klijanaca

Na analitičkoj vagi sam izvagala po 1,8-2,5 mg sjemenki linije *oeBPM1* za potrebe prvog dijela pokusa. Prilikom vaganja sjemenke sam stavljala u 12 plastičnih mikroepruveta volumena 2 mL. Također sam na isti način izvagala 3-3,5 mg sjemenki svih triju linija biljaka, i pripremila ukupno 36 mikroepruveta (po 12 za svaku liniju) za drugi dio pokusa (mjerenje fizioloških parametara). Sjemenke sam sterilizirala u laminaru tako da sam pomoću automatske pipete s nastavkom u mikroepruvete dodala po 1 mL 70%-tnog etanola (Gram-mol). Sjemenke sam inkubirala u etanolu 1 minutu uz povremeno potresanje. Uklonila sam etanol pomoću pipete i isprala sjemenke sterilnom destiliranom vodom koju sam također dodavala uz pomoć automatske pipete s plastičnim nastavkom. Zatim sam sjemenke inkubirala 10 minuta u 1 mL vodene otopine koja je sadržavala Izosan G (1% w/v, Pliva) i mukazol (0,1% w/v, Pliva), također uz povremeno potresanje, te ponovno isprala četiri puta u sterilnoj destiliranoj vodi. Nakon ispiranja pažljivo sam odstranila svu sterilnu destiliranu vodu i dodala 1 mL tekućeg medija MS. Sjemenke s medijem sam iz mikroepruveta premjestila u male Petrijeve zdjelice s poklopcem (promjera 6 cm), koje sam prethodno označila, te po opsegu zdjelice zalijepila traku parafilma (dva sloja). Nakon toga Petrijeve zdjelice sa sjemenkama ostavila sam tri dana u hladnjaku na 4 ºC radi stratifikacije sjemenki. Četvrti dan sam Petrijeve zdjelice premjestila u komoru za uzgoj biljaka u kontrolirane uvjete pogodne za rast. Dodavala sam cca 1 mL tekućeg medija MS dva puta tijekom 11 dana uzgoja klijanaca.

3.4. Izlaganje klijanaca UVB-zračenju

Cilj prvog dijela pokusa bio je odrediti dozu UVB-zračenja koja uzrokuje pojačano nakupljanje proteina BPM1, a pri tome ne uzrokuje venuće klijanca. To sam radila izlaganjem UVB-zračenju linije *oeBMP1* koja ima pojačanu ekspresiju gena *BPM1* obilježenog GFP-om te primjenom western analize. Drugi dio pokusa bio je izložiti sve tri linije istoj dozi UVB-zračenja te pratiti izabrane fiziološke parametre kao pokazatelje stresa radi utvrđivanja utjecaja proteina BPM1 na odgovor klijanaca na stres uzrokovan UVB-zračenjem.

Za potrebe prvog dijela pokusa pripremila sam 12 Petrijevih zdjelica sa sjemenkama linije *oeBPM1*. Sterilizaciju, stratifikaciju i uzgoj sjemenki provela sam na način kako sam ranije opisala. Nakon uzgoja, koji je trajao 11 dana, Petrijeve zdjelice s klijancima sam prije tretmana otvorila i pincetom namjestila na sredinu površine zdjelice. Najprije sam izdvojila tri Petrijeve zdjelice koje su služile kao kontrola, tj. nisam ih izlagala UVB-zračenju. Zatim sam

ostale zdjelice s klijancima stavila u uređaj s izvorom UVB-zračenja i pričekala da zračenje dosegne određenu dozu. Primijenila sam doze UVB-zračenja od 421 J cm^{-2} (3,39 mW cm^{-2}, 14 sek), 831 J cm^{-2} (4,04 mW cm^{-2}, 24 sek) i 2,332 kJ cm^{-2} (4,13 mW cm^{-2}, 60 sek). Nakon izlaganja klijanaca, a prije uzimanja uzoraka zatvorila sam Petrijeve zdjelice te ih 1 sat inkubirala na svjetlosti u komori za rast biljaka. Uvjeti u komori bili su isti kao i pri uzgoju klijanaca. Zatim sam izvagala po 50 mg tkiva za provođenje western analize, a uzorke sam tijekom vaganja zapakirala u prethodno označene aluminijske folije te čuvala u tekućem dušiku, a po završetku vaganja u zamrzivaču pri -80 ºC.

U drugom djelu pokusa sam klijance linija wt, *oeBPM1* i *amiR-bpm*, ukupno u 36 Petrijevih zdjelica, namjestila pincetom na sredinu površine zdjelice te izložila dozi UVB-zračenja od 809 J cm^{-2} (3,889 mW cm^{-2}, 21 sek). Ta je doza, kao i vrijeme inkubacije od tretmana do uzorkovanja (1 sat), odabrana na temelju rezultata prvog dijela pokusa. Dakle, nakon tretmana UVB-zračenjem klijance sam inkubirala 1 sat u komori za rast biljaka na svjetlu (24 °C) te prije uzorkovanja isprala destiliranom vodom kako bih uklonila tekući MS medij sa tkiva. Najprije sam dio tkiva izdvojila za potrebe provođenja OJIP-testa. Za ekstrakciju topivih proteina, mjerenje koncentracije ukupnih topivih proteina i mjerenje aktivnosti antioksidacijskih enzima koristila sam cca 150 mg tkiva. Zatim sam izvagala dva puta po 50 mg tkiva za provođenje pokusa određivanja količine vodikovog peroksida, odnosno određivanja udjela fotosintetskih pigmenata te 100 mg tkiva za provođenje pokusa određivanja stupnja lipidne peroksidacije i određivanja količine prolina. Kao i ranije sve uzorke sam tijekom vaganja zapakirala u prethodno označene aluminijske folije te čuvala u tekućem dušiku, a po završetku vaganja u hladnjaku pri -80 ºC.

3.5. Razdvajanje proteina elektroforezom i imunodetekcija proteina BPM1-GFP (western analiza)

U okviru prvog dijela pokusa, kojem je bio cilj detekcija nakupljanja proteina BPM1-GFP nakon izlaganja različitim dozama UVB-zračenja te utvrđivanje u kojem je vremenu nakon zračenja moguća uspješna detekcija proteina BPM1, primijenila sam western analizu. Prvog dana pokusa sastavila sam sustav za izradu gelova koje ću upotrijebiti za izvođenje vertikalne denaturirajuće diskontinuirane elektroforeze u poliakrilamidnom gelu u smjeru anode (Laemmli 1970). Pripremila sam 10 mL smjese za pripremu 7,5%-tnog gela za razdvajanje koji je sadržavao 2,5 mL otopine akrilamida/bis-akrilamida (koja sadrži 29,2% w/v

akrilamida i 0,8% w/v bis-akrilamida, Sigma), 2,5 mL 1,5 M Tris-HCl (pH 8,8, Sigma), 100 µL 10% (w/v) SDS (natrijev dodecil-sulfat, PlusOne), 50 µL 10% (w/v) APS (Sigma) i 15 µL (v/v) TEMED (Sigma) te 4,8 mL dH_2O. Nakon što sam pomiješala sve komponente potrebne za gel za razdvajanje u digestoru, pipetirala sam otopinu u sustav za elektroforezu, u prostor između dviju staklenih ploča. Na površinu smjese za gel pažljivo sam nanijela dH_2O i ostavila da gel polimerizira, najmanje 45 minuta. Za to vrijeme pripremila sam ekstrakte za koje sam koristila 50 mg tkiva klijanaca zamrznutog u tekućem dušiku. Ekstrakciju sam radila u hladnom tarioniku u 200 µL ekstrakcijskog pufera PEB50 koji je sadržavao 50 mM HEPES (Sigma), 50 mM KCl, 2,5 mM $MgCl_2$, 1 mM EDTA (etilendiamintetraoctena kiselina, Kemika), 0,1 % (v/v) TritonaX-100 (Fisher Scientific, Belgija), inhibitor proteaza (Roche, Švicarska), 1 mM DTT (ditiotreitol, Sigma) i miliQ H_2O. Po ekstrakciji uzorke sam čuvala na ledu te ih centrifugirala 20 minuta na 16000 g pri 4 °C. Dok je trajalo centrifugiranje pripremila sam 4 mL 4%-tnog gela za sabijanje koji je sadržavao 333 µL otopine akrilamida/bis-akrilamida (koja sadrži 29,2% w/v akrilamida i 0,8% w/v bis-akrilamida), 625 µL 0,5 M Tris-HCl (pH 6,8, Sigma), 25 µL 10% (w/v) SDS, 17,5 µL 10% (w/v) APS i 10 µL TEMED te 1,525 mL dH_2O. Najprije sam izlila vodu s površine gela za razdvajanje pa na njega dodala priređenu smjesu za gel za sabijanje te nakon jedne minute uronila "češalj" koji određuje dubinu i širinu jažica za nanošenje uzoraka. Gelove sam ostavila da polimeriziraju najmanje 45 minuta. U novi set mikroepruveta pipetirala sam 150 µL supernatanta ranije centrifugiranih ekstrakata. Ovim uzorcima izmjerila sam koncentraciju proteina spektrofotometrijski na uređaju *NanoDrop 100*. Uređaj mjeri koncentraciju proteina u 2 µL ekstrakta pri valnoj duljini od 280 nm. Po mjerenju koncentracije proteina u ekstraktima izračunala sam koliki volumen uzoraka je potrebno nanijeti u jažice tako da je koncentracijama u svim jažicama jednaka. Uzorke sam zatim razrijedila puferom LSB (*engl. Laemmli sample buffer*). U mikroepruvetu sam stavila 80 µL uzorka i 20 µL pufera LSB koji služi za denaturaciju proteina. Taj pufer je sadržavao 0,125 M Tris-HCl (pH 6,8), 4% (w/v) SDS, 20% (v/v) glicerola (Kemika), 10% (v/v) 2-merkaptoetanola i 0,04% (w/v) boje bromfenol modrilo (Sigma). Smjesu uzorka i pufera LSB inkubirala sam 10 minuta pri 80 °C. U međuvremenu je gel za sabijanje polimerizirao te sam pažljivo uklonila "češljeve" i sastavila mali sustav za gel-elektroforezu. U kadici su se nalazili gelovi uronjeni u elektrodni pufer (pH 8,3) koji je sadržavao 0,19 M Tris-HCl, 0,1% (w/v) SDS i 1,92 M glicina (Kemika). Na gelove sam nanijela prethodno izračunate volumene uzoraka, a u prvu jažicu na gelu nanijela sam otopinu markera molekularnih masa u rasponu 8-220 kDa (Thermo Fisher Scientific, SAD). Prvih 30 minuta elektroforeze napon je bio namješten na 80 V (25 mA, 2 W) nakon čega sam napon povisila na 180 V (27 mA, 5 W). Elektroforeza je u tim uvjetima trajala

još otprilike 30 minuta. Prekinula sam ju kada se boja bromfenol modrilo približila donjem rubu gela. Zatim sam pripremila sustav za prijenos proteina na PVDF membranu (kazetu za prijenos, Immobilon-P). U velike Petrijeve zdjelice stavila sam destiliranu vodu i namočila potreban pribor (plastične dijelove kazete, spužvice, filter-papire). Po završetku elektroforeze na namočeni filter-papir stavila sam izrezanu PVDF membranu, prethodno namočenu u metanolu te ispranu u destiliranoj vodi, na koju sam položila gel odmah nakon elektroforeze. Na jednu stranicu kazete položila sam spužvicu, filter-papir, membranu, gel, drugi filter-papir i drugu spužvicu. Iz tako složenog „sendviča" pomoću staklene epruvete položene na površinu „sendviča", valjajućim pokretima, istisnula sam sav zrak koji bi mogao ometati prijenos i tek nakon toga sam zatvorila kazetu. U sustav za prijenos složila sam kazete pazeći na njihovu orijentaciju, stavila posudu s ledom u kadicu i ulila pufer za prijenos (pH 8,3) koji je sadržavao 0,03 M Tris, 0,02 M glicina i 0,1% (v/v) metanola (Sigma). Namjestila sam napon na 12 V (19 mA, 0 W) i pokrenula prijenos koji je trajao preko noći (18 sati).

Drugog dana pokusa rastavila sam sustav za prijenos te izvadila PVDF membrane iz kazeta. Membrane sam isprala u dH_2O te ih obojila otopinom koja je sadržavala 0,05% (w/v) boje Rouge Ponceau S (Biochemika) u 5%-tnoj (v/v) octenoj kiselini. Nakon što su se proteini obojili, markere molekularnih masa lagano sam označila grafitnom olovkom. Poslije postupka bojenja membrane sam isprala s dH_2O sve do obezbojenja. Membrane sam pažljivo premjestila pincetom u plastične kutijice s poklopcem u 20 mL 2% (w/v) mlijeka u prahu (Delikat Italija) otopljenog u 1 × PBS puferu koji je sadržavao 68,44 mM NaCl, 1,34 mM KCl, 2,63 mM $Na_2HPO_4 \times 2\ H_2O$ i 734,81 μM KH_2PO_4. Blokiranje u otopini 2%-tnog (w/v) mlijeka u 1 × PBS puferu trajalo je 7 sati na miješalici, nakon čega sam membrane isprala dva puta po 5 minuta u 1× PBS puferu. Pripremila sam primarno protutijelo *Anti-GFP mouse IgG Antibody* (Roche) u 1× PBS puferu u omjeru 1:1000 te su se membrane inkubirale preko noći.

Trećeg dana pokusa membrane sam isprala tri puta u 10 mL 1× PBS pufera po 5 minuta i inkubirala sat vremena u sekundarnom antitijelu *Goat anti-Mouse IgG Secondary Antibody* (HRP-conjugate, Merck) pripremljenom u otopini 2%-tnog (w/v) mlijeka u 1× PBS puferu u omjeru 1:5000. Na kraju sam membranu isprala još tri puta u 10 mL 1 × PBS pufera po 5 minuta te ju pohranila u 20 mL 1 × PBS pufera na 4 °C. Kako bih detektirala nakupljanje proteina BPM1-GFP, upotrijebila sam film koji sam kasnije razvila u tamnoj sobi. Najprije sam pripremila 15%-tni (v/v) razvijač i 15%-tni (v/v) fiksir u dH_2O. Zatim sam pripremila sav potreban pribor te ostatak detekcije radila u tamnoj sobi s upaljenim crvenim svjetlom. U tri kadice ulila sam pripremljeni razvijač, fiksir i vodu. Rub membrane iz 1 × PBS pufera sam

prislonila na filter papir i stavila na prozirnu plastičnu foliju tako da je prema gore okrenuta strana koja je bila prislonjena na gel kod prijenosa. Preko membrane sam pipetirala 600 µL supstrata *Immobilon Forte Western HRP* (Merck) te inkubirala 2 minute. Za to vrijeme sam izrezala film na veličinu membrane. Nakon inkubacije sam foliju s membranom prislonila na filter papir kako bih uklonila većinu supstrata. Foliju s membranom sam zatim odložila u kazetu tako da je membrana poravnata sa skalom na kazeti. Preko membrane stavila sam drugu foliju te pričvrstila folije ljepljivom trakom, a zatim sam pažljivo na foliju položila film, zatvorila kazetu i odložila ju u ormarić kako se ne bi osvijetlila. Izlaganje filma membrani u cilju detekcije GFP-a trajalo je 45 minuta nakon čega sam u tamnoj sobi otvorila kazetu, izvadila film te ga razvila. Film sam najprije stavila u razvijač, protresla kadicu kako bi cijeli film bio prekriven razvijačem te pričekala pojavu preslike. Nakon toga film sam premjestila u kadicu s vodom, protresla da se ispere pa premjestila u kadicu s fiksirom. Film sam u fiksiru protresla i nakon par sekundi pažljivo primila pincetom za rubove, izvadila iz fiksira te pričekala da se osuši. Nakon toga sam uz pomoć skale na filmu i skale u kazeti precrtala markere s membrane na film. Sliku dobivenu na filmu sam skenirala i izrezala te kvantificirala razinu nakupljanja proteina uz pomoć računalnog programa *ImageJ*.

3.6. Određivanje stupnja lipidne peroksidacije

Stupanj lipidne peroksidacije odredila sam spektrofotometrijskim mjerenjem količine malondialdehia (MDA) prema metodi Sunkar i sur. (2003). Za pripremu ekstrakta koristila sam 100 mg tkiva klijanaca zamrznutog u tekućem dušiku uz dodatak 1 mL 0,1%-tne (w/v) TCA (6,12 mM trikloroctena kiselina, Acros Organics). Ekstrakciju sam radila u hladnom tarioniku i uzorke čuvala na ledu. Nakon ekstrakcije uzorke sam centrifugirala 10 minuta na 15000 g pri 4 °C. Supernatant sam prelila u novi set mikroepruveta te pripremila vodenu otopinu 20%-tne (w/v) TCA i otopinu 0,5%-tne TBA (tiobarbituratna kiselina, Sigma) (w/v) u 20%-tnoj TCA. Pripremila sam dva seta mikroepruveta s navojem i čepićima i u jedan set pipetirala 750 µL 20% TCA i 250 µL uzorka, a u drugi set 750 µL 0,5% TBA u 20% TCA i 250 µL uzorka. Kao slijepe probe za dva navedena seta mikroepruveta pipetirala sam umjesto ekstrakta 250 µL 0,1% TCA. Mikroepruvete sam zatvorila čepićima i uzorke inkubirala u termobloku 30 minuta pri 100 °C nakon čega sam ih naglo ohladila na ledu u trajanju 5 minuta. Uzorke sam ponovno centifugirala 5 minuta na 15000 g pri 4 °C te ih prelila u plastične kivete. Apsorbanciju sam mjerila spektrofotometrom pri valnim duljinama od 440 nm, 532 nm i 600 nm. Stupanj lipidne peroksidacije računala sam prema formulama iz Hodges i sur. (1999):

$$A = (A_{532+TBA} - A_{600+TBA}) - (A_{532-TBA} - A_{600-TBA})$$

$$B = (A_{440+TBA} - A_{600+TBA}) \cdot 0{,}0571$$

$$sadržaj\ MDA = \frac{A - B}{\varepsilon} \times \frac{V_{r.s.}}{V_{u.z.} \cdot l \cdot m_{FW}} \times 1\,000\,000\ [nmol\ g_{FW}{}^{-1}]$$

u kojima su: $A_{440+TBA}$ - apsorbancija reakcijske smjese koja sadrži TBA izmjerena pri 440 nm; $A_{532+TBA}$ - apsorbancija reakcijske smjese koja sadrži TBA izmjerena pri 532 nm; $A_{600+TBA}$ - apsorbancija reakcijske smjese koja sadrži TBA izmjerena pri 600 nm; $A_{532-TBA}$ - apsorbancija reakcijske smjese koja ne sadrži TBA izmjerena pri 532 nm; $A_{600-TBA}$ - apsorbancija reakcijske smjese koja ne sadrži TBA izmjerena pri 600 nm; 0,0571 - omjer molarnog ekstinkcijskog koeficijenta saharoze koncentracija 1-10 mM za valne duljine 532 i 440 nm; $V_{r.s.}$ - volumen reakcijske smjese (1000 μL); $V_{uz.}$ - volumen uzorka (250 μL); ε - molarni ekstinkcijski koeficijent MDA (157000 $M^{-1}cm^{-1}$); l - duljina optičkog puta (1 cm); $m_{FW.}$- masa svježeg tkiva [g_{FW}].

Stupanj lipidne peroksidacije izrazila sam kao nmol MDA po masi svježeg tkiva [nmol $g_{FW}{}^{-1}$].

3.7. Određivanje količine prolina

Ukupnu koncentraciju prolina odredila sam prema metodi Bates i sur. (1973). Za određivanje sadržaja prolina koristila sam ekstrakte pripremljene u 0,1% (v/v) TCA koje sam također koristila kod određivanja stupnja lipidne peroksidacije pa je postupak ekstrakcije opisan u poglavlju 3.6. U mikroepruvete s navojem pipetirala sam 400 μL ledene octene kiseline (Gram-mol), 400 μL kiselog ninhidrina i 200 μL ekstrakta. Za izradu standardne krivulje pripremila sam otopine različitih koncentracija prolina. Kiseli ninhidrin pripremila sam od 0,14 M ninhidrina (Sigma) otopljenog u smjesi od 18 mL ledene octene kiseline i 12 mL 6 M fosforne kiseline (Carlo Erba Reagents). Otopine prolina za izradu standardne krivulje pripremila sam tako što sam iz matične vodene otopine L-prolina (Sigma) koncentracije 1000 μM napravila sedam razrjeđenja kako bih dobila koncentracije otopina L-prolina od 1, 10, 25, 50, 100, 250 i 500 μM. Dobivenu smjesu ledene octene kiseline, kiselog ninhidrina i ekstrakata (odnosno otopina različitih koncentracija prolina za standardnu krivulju) promiješala sam 15 sekundi na vrtložnoj miješalici i uzorke inkubirala u termobloku 60 minuta na 100 °C. Uzorke sam pažljivo premjestila iz termobloka na led i nakon 5 minuta dodala 1 mL toluena (Kemika), zatvorila mikroepruvete čepićima i promiješala na vrtložnoj miješalici 15 sekundi. Nakon kratkog vremena razdvojile su se dvije faze - gornja, toluenska i donja, vodena

faza. Produkt koji je nastao reakcijom prolina s ninhidrinom, se otopio u toluenu i njega sam pipetirala u novi set mikroepruveta. Apsorbanciju sam mjerila spektrofotometrijski pri valnoj duljini od 520 nm. Za mjerenje sam koristila staklenu kivetu, a kao slijepu probu koristila sam toluen. Sadržaj prolina izračunala sam pomoću standardne krivulje i izrazila ga kao μmol prolina po masi svježeg tkiva [μmol g_{FW}^{-1}].

3.8. Određivanje količine vodikovog peroksida

Količinu vodikovog peroksida (H_2O_2) odredila sam prema metodi Mátai i Hideg (2017). Za ekstrakciju sam koristila 50 mg tkiva kojeg sam homogenizirala u hladnom tarioniku s 500 μL 70%-tnog (v/v) etanola. Dobiveni ekstrakt sam potom centrifugirala 10 minuta na 15000 g pri temperaturi od 4 ºC, te sam u novi set mikroepruveta odvojila supernatant. Pripremila sam radnu otopinu koja se sastoji od 124 μM ksilenola narančastog (Sigma), 99 mM sorbitola (Sigma) i 0,248 mM $(NH_4)_2$ $Fe(SO_4)_2$ × 6 H_2O, čija je matična otopina priređena otapanjem $(NH_4)_2$ $Fe(SO_4)_2$ × 6 H_2O u 2,5 M H_2SO_4 (Kemika). U novi set mikroepruveta pipetirala sam 1 mL radne otopine i 100 μL ekstrakta, te sam smjesu inkubirala 30 minuta na sobnoj temperaturi (24 °C). Za izradu standardne krivulje koristila sam otopinu 30%-tnog H_2O_2 (8,82 M, Lach-Ner) i priredila otopine H_2O_2 sljedećih koncentracija: 1,82; 3,64; 7,28; 16,38; 25,48; 40,04; i 72,8 μM. Te otopine sam također inkubirala 30 minuta na sobnoj temperaturi (24 °C). Apsorbanciju sam mjerila spektrofotometrijski pri valnoj duljini od 560 nm. Za slijepu probu sam umjesto ekstrakta koristila 100 μL 70%-tnog (v/v) etanola. Nakon što sam izmjerila apsorbanciju uzoraka, pomoću standardne krivulje i mase svježeg tkiva izračunala sam sadržaj H_2O_2 te izrazila dobivene vrijednosti kao μmol H_2O_2 po g svježeg tkiva [μmol g_{FW}^{-1}].

3.9. Ekstrakcija ukupnih topivih proteina

Pripremila sam ekstrakcijski pufer koji se sastojao od 100 mM kalij-fosfatnog pufera i 0,1 mM EDTA (pH 7,0) te sam pufer čuvala na ledu. Klijance zamrznute u tekućem dušiku sam homogenizirala u 1,4 mL ekstrakcijskog pufera u hladnom tarioniku, uz dodatak oko 10 mg PVPP (polivinilpolipirolidon, Sigma) te sam dobivene ekstrakte prelila u mikroepruvete koje sam također čuvala na ledu a zatim ih centrifugirala 30 minuta pri 20000 g i temperaturi od 4 °C. Nakon centrifugiranja odvojila sam supernatant, kojeg sam koristila za mjerenje ukupne koncentracije topivih proteina te za određivanje aktivnosti enzima katalaze, askorbat peroksidaze, gvajakol peroksidaze i superoksid dismutaze.

3.10. Mjerenje koncentracije ukupnih topivih proteina

Koncentraciju topivih proteina odredila sam prema metodi Bradforda (1976). Za spektrofotometrijsko mjerenje proteina u uzorcima najprije sam razrijedila ekstrakte ukupnih topivih proteina u omjeru 1:2, odnosno 40 µL uzorka u 80 µL ekstrakcijskog kalij-fosfatnog pufera. Za svaki uzorak pripremila sam dvije tehničke replike te pripremila dva seta mikroepruveta od 1,5 mL u koje sam dodala 1 mL radne otopine po Bradfordu i 50 µL razrijeđenog proteinskog ekstrakta. Slijepa proba sadržavala je umjesto proteinskog ekstrakta 50 µL ekstrakcijskog pufera. Dobivenu smjesu kratko sam promiješala na vrtložnoj miješalici i inkubirala 10 minuta na sobnoj temperaturi. Apsorbanciju uzoraka izmjerila sam spektrofotometrijski pri valnoj duljini od 595 nm. Kod izračuna koncentracije proteina koristila sam srednju vrijednost apsorbancija dviju tehničkih replika. Za izradu standardne krivulje koristila sam niz otopina albumina iz goveđeg seruma (BSA, Sigma). Od matične otopine koncentracije 1 mg mL^{-1}, priređen je niz otopina u rasponu koncentracija od 0,1 do 0,8 mg mL^{-1}. Koncentraciju ukupnih topivih proteina u uzorcima izračunala sam pomoću standardne krivulje. Dobivene vrijednosti sam izrazila kao µg proteina po mg svježeg tkiva [µg g_{FW}^{-1}].

3.11. Određivanje aktivnosti katalaze

Aktivnost enzima katalaze (CAT) odredila sam prema metodi Aebi (1984). Pripremila sam reakcijsku smjesu koja se sastojala od 50 mM kalij-fosfatnog pufera s 10 mM H_2O_2 (pH 7,0). U kvarcnu kivetu od 2 mL pipetirala sam 950 µL reakcijske smjese i 50 µL proteinskog ekstrakta nakon čega sam brzo okrenula kivetu s čepićem kako bi se sadržaj promiješao i stavila kivetu u spektrofotometar. Mjerila sam apsorbanciju pri valnoj duljini od 240 nm, 12 puta svakih 10 sekundi tijekom 2 minute. Za slijepu probu umjesto proteinskog ekstrakta dodala sam 50 µL ekstrakcijskog pufera (100 mM kalij-fosfatni pufer s 0,1 mM EDTA, pH 7,0). Aktivnost CAT izračunala sam prema formuli:

$$CAT = \frac{\Delta A_{s.v.} \cdot 6 \cdot V_{r.s.} \cdot 1000}{V_{uz.} \cdot \varepsilon \cdot l \cdot \gamma}$$

u kojoj su: $\Delta A_{s.v.}$ - srednja vrijednost promjene apsorbancije u 10 sekundi; 6 - faktor korekcije, za izražavanje rezultata po minuti; $V_{r.s.}$ - volumen reakcijske smjese (1000 µL); $V_{uz.}$ - volumen

uzorka (50 μL); ε - molarni ekstinkcijski koeficijent (40 mM^{-1} cm^{-1}); l - duljina optičkog puta (1 cm); γ - masena koncentracija proteina u ekstraktu [mg mL^{-1}].
Aktivnost CAT izrazila sam kao nmol H_2O_2 po min po mg proteina [nmol min^{-1} $mg_{prot.}^{-1}$].

3.12. Određivanje aktivnosti gvajakol peroksidaze

Aktivnost enzima gvajakol peroksidaze (G-POD) odredila sam prema metodi Chance i Maehly (1995) koja uključuje spektrofotometrijsko mjerenje nastanka tetragvajakola u reakciji gvajakola i H_2O_2. Reakcijska smjesa za mjerenje aktivnosti G-POD sastojala se od 50 mM kalij-fosfatnog pufera s 0,1 mM EDTA (pH 7,0), 18 mM gvajakola (Sigma) i 4,5 mM H_2O_2. U plastičnu kivetu sam pipetirala 980 μL reakcijske smjese i 20 μL uzorka, promiješala sadržaj jednim preokretanjem kivete te mjerila apsorbanciju pri valnoj duljini od 470 nm 10 puta svakih 15 sekundi tijekom 2 minute. Za slijepu probu umjesto uzorka dodala sam 20 μL ekstrakcijskog pufera (100 mM kalij-fosfatni pufer s 0,1 mM EDTA, pH 7,0). Aktivnost G-POD izračunala sam prema formuli:

$$G - POD = \frac{\Delta A_{s.v.} \cdot 4 \cdot V_{r.s.}}{V_{uz.} \cdot \varepsilon \cdot l \cdot \gamma}$$

u kojoj su: $\Delta A_{s.v.}$ - srednja vrijednost promjene apsorbancije u 15 sekundi; 4 - faktor korekcije, za izražavanje rezultata po minuti; $V_{r.s.}$ - volumen reakcijske smjese (1000 μL); $V_{uz.}$ - volumen uzorka (20 μL); ε - molarni ekstinkcijski koeficijent za tetragvajakol (26,6 mM^{-1} cm^{-1}); l - duljina optičkog puta (1 cm); γ - masena koncentracija proteina u ekstraktu [mg mL^{-1}]. Konačnu aktivnosti G-POD izrazila sam kao μmol tetragvajakola po min po mg proteina [μmol min^{-1} $mg_{prot.}^{-1}$].

3.13. Određivanje aktivnosti askorbat peroksidaze

Aktivnost enzima askorbat peroksidaze (APX) odredila sam prema metodi Nakano i Asada (1981) koja uključuje mjerenje pada koncentracije supstrata, odnosno askorbinske kiseline. U kvarcnu kivetu sam pipetirala 820 μL reakcijske smjese i 180 μL uzorka. Reakcijska smjesa sastojala se od 795 μL 50 mM kalij-fosfatnog pufera s 0,1 mM EDTA, 5 μL 20 mM askorbata (Sigma) i 20 μL 12 mM H_2O_2. Slijepa proba umjesto proteinskog ekstrakta sadržavala je ekstrakcijski pufer (100 mM kalij-fosfatni pufer s 0,1 mM EDTA, pH 7,0).

Svakom uzorku izmjerila sam apsorbanciju pri valnoj duljini od 290 nm, 15 puta svake sekunde tijekom 15 sekundi. Aktivnost APX izračunala sam prema formuli:

$$APX = \frac{\Delta A_{s.v.} \cdot 60 \cdot V_{r.s.}}{V_{uz.} \cdot \varepsilon \cdot l \cdot \gamma}$$

u kojoj su: $\Delta A_{s.v.}$ - srednja vrijednost promjene apsorbancije svake sekunde; 60 - faktor korekcije, za izražavanje rezultata po minuti; $V_{r.s.}$ - volumen reakcijske smjese (1000 µL); $V_{uz.}$ - volumen uzorka (180 µL); ε - molarni ekstinkcijski koeficijent za askorbat (2,8 $mM^{-1}cm^{-1}$); l - duljina optičkog puta (1 cm); γ - masena koncentracija proteina u ekstraktu [mg mL^{-1}]. Konačnu aktivnost enzima APX izrazila sam u µmol po min po mg proteina [µmol min^{-1} $mg_{prot.}^{-1}$].

3.14. Određivanje aktivnosti superoksid dismutaze

Aktivnost superoksid dismutaze (SOD) odredila sam prema metodi Beauchamp i Fridovich (1971). Najprije sam pripremila reakcijsku smjesu za SOD koja je sadržavala 50 mM kalij-fosfatnog pufera (pH 7,8), 75 µM NBT (nitro-plavi tetrazolij klorid, Sigma) i 0,1 M EDTA. Također pripremila sam vodenu otopinu 10,8 mM ksantina (Sigma) kojeg sam dodavala u reakcijsku smjesu neposredno prije mjerenja apsorbancije. Spektrofotometar sam kalibrirala pomoću slijepe probe koja se sastojala od 825 µL reakcijske smjese za SOD, 75 µL 10,8 mM ksantina, 45 µL ekstrakcijskog pufera i 55 µL dH_2O. Apsorbanciju sam mjerila u plastičnim kivetama pri valnoj duljini od 560 nm. Nakon kalibracije provjerila sam aktivnost ksantin oksidaze (XOD, Sigma) i odredila maksimalnu brzinu redukcije NBT-a u NBT-diformazan koja bi pri valnoj duljini od 560 nm trebala odgovarati promjeni apsorbancije od cca 0,025 po minuti. Smjesa se sastojala od 825 µL reakcijske smjese za SOD, 75 µL 10,8 mM ksantina, 45 µL ekstrakcijskog pufera i 55 µL 0,05 U mL^{-1} XOD-a. Za spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti SOD u uzorcima mjerila sam apsorbanciju 7 puta svakih 30 sekundi u trajanju od 3 minute. Smjesa se sastojala od 825 µL reakcijske smjese za SOD, 75 µL 10,8 mM ksantina, 45 µL ekstrakcijskog pufera, 5 µL uzorka i 50 µL 0,05 U mL^{-1} XOD-a. Aktivnost SOD za svaki uzorak izračunala sam korištenjem recipročne vrijednosti izmjerene promjene apsorbancije u minuti (average ΔA_{min}^{-1}) i baždarne krivulje, dobivene uz pomoć različitih koncentracija goveđe SOD kao standarda, u rasponu od 0,005 do 0,5 U μL^{-1} te sam dobivene vrijednosti podijelila s koncentracijom proteina u ekstraktu. Konačnu aktivnost SOD-a izrazila sam u jedinicama aktivnosti enzima (U, engl. *unit*) po mg proteina [U $mg_{prot.}^{-1}$].

3.15. Mjerenje polifaznog rasta fluorescencije klorofila *a* – OJIP-test

OJIP-test se temelji na mjerenju polifaznog rasta fluorescencije klorofila *a* u biljaka koje su prije početka mjerenja bile u tami te se mjerenje također odvija u uvjetima tame (Strasser i sur. 2004). Za određivanje fotosintetske učinkovitosti u klijancima koristila sam uređaj *FluorPen FP 100* (Photon Systems Instruments, Češka). Klijance sam iz Petrijevih zdjelica u malim skupinama premjestila na vlažnu podlogu i inkubirala ih 30 minuta u tami pri sobnoj temperaturi (24 °C) kako bi osigurala da sve molekule RC-a PSII budu u oksidiranom stanju i da je fluorescencija minimalna, što je u metodi označeno kao korak O. Po isteku vremena inkubacije u tami namjestila sam uređaj na jednu skupinu klijanaca i pregradom osigurala da prilikom mjerenja ne osvijetlim ostale skupine klijanaca. Početkom mjerenja uređaj je klijance osvijetlio pulsom plave svjetlosti kojoj je maksimum emitirane svjetlosti pri valnoj duljini od 455 nm (PFD = 3000 μmol m^{-2} s^{-1}) i time su potaknuti fotokemijski procesi u RC-u, uključujući porast fluorescencije. Na krivulji koja predstavlja rezultat mjerenja fluorescencije može se uočiti nekoliko dijelova koji su rezultat određenih događaja u procesu prijenosa elektrona u primarnim reakcijama fotosinteze. Kada je reducirana većina molekula plastokinona A RC-a, postignut je korak J, te kada je reducirana većina molekula plastokinona B, postignut je korak I. Naposljetku, događa se redukcija većine molekula tzv. plastokinonskog bazena između PSII i PSI te je postignut korak P (Küpper i sur. 2019). Uz pomoć fluorimetra *FluorPen* omogućeno je mjerenje promjene u intenzitetu fluorescencije klorofila *a* tijekom 1 sek, pri čemu se bilježe podaci o intenzitetu fluorescencije nakon 50 μsek (F_0), 2 msek (F_J), 30 msek (F_I) te maksimalni intenzitet fluorescencije (F_m). Pomoću navedenih izmjerenih parametara izračunati su i preostali parametri (Tablica 1) koji opisuju glavna funkcionalna svojstva PSII te uz njihovu pomoć mogu doći do zaključaka o fotosintetskoj učinkovitosti klijanaca.

Tablica 1. Parametri dobiveni mjerenjem polifaznog rasta klorofila *a* OJIP-testom. RC-reakcijski centar

Parametar	**Opis**
$\mathbf{F_0}$	intenzitet fluorescencije nakon 50 μs (stupanj O)
$\mathbf{F_J}$	intenzitet fluorescencije nakon 2 ms (stupanj J)
$\mathbf{F_I}$	intenzitet fluorescencije nakon 30 ms (stupanj I)
$\mathbf{F_m}$	maksimalni intenzitet fluorescencije (stupanj P)
$\mathbf{F_v}$	maksimalna varijabilna fluorescencija
$\mathbf{F_v/F_m = (F_m\text{-}F_0)/F_m}$	maksimalni kvantni prinos fotosustava II
$\mathbf{V_j}$	varijabilna fluorescencija između koraka O i J
$\mathbf{M_0}$	ukupna brzina zatvaranja RC
$\mathbf{RC/CS_0} = F_v/F_m \times (V_J/M_0) \times F_0$	gustoća aktivnih RC po osvijetljenoj površini lista (CS_0)
$\mathbf{ABS/RC} = M_0 \times (1/V_J) \times [1/(F_v/F_m)]$	apsorpcija svjetlosti (ABS) po aktivnom RC
$\mathbf{TR_0/RC} = M_0 \times (1/V_J)$	protok uhvaćenih fotona (TR_0) po aktivnom RC
$\mathbf{ET_0/RC} = M_0 \times (1/V_J) \times (1\text{-}V_J)$	prijenos elektrona (ET_0) po aktivnom RC
$\mathbf{DI_0/RC} = (ABS/RC) - (TR_0/RC)$	rasipanje energije (DI_0) po aktivnom RC
$\mathbf{PI_{abs}} = (RC/ABS) \times (TR_0/DI_0) \times [ET_0/(TR_0 – ET_0)]$	indeks fotosintetske učinkovitosti (PI_{abs})

3.16. Priprema ekstrakata i određivanje udjela fotosintetskih pigmenata

Količinu fotosintetskih pigmenata klorofila *a*, klorofila *b* i karotenoida odredila sam prema metodi Wellburn (1994). Pripremu ekstrakata radila sam u uvjetima minimalnog osvjetljenja te sam uzorke čuvala na ledu. Za ekstrakciju u hladnom tarioniku sam koristila 50 mg tkiva zamrznutog u tekućem dušiku i 1 mL hladnog 80%-tnog (v/v) acetona (Kemika) i oko 20 mg kalcijevog karbonata ($CaCO_3$, Gram-mol). Tijekom ekstrakcije uzorke sam iz tarionika prikupljala u tamne mikroepruvete, promiješala na vrtložnoj miješalici i centrifugirala 10 minuta na 5000 g pri 4 °C. Supernatant sam prebacila u novi set tamnih mikroepruveta od 1,5 mL, a na talog preostao u prvom nizu epruveta dodala sam još 500 μL hladnog 80%-tnog (v/v) acetona, promiješala na vrtložnoj miješalici te ponovno centrifugirala pri istim uvjetima. Supernatant dobiven drugim centrifugiranjem dodala sam prethodnom supernatantu i provjerila da svaka mikroepruveta sadrži 1,5 mL ekstrakta te u one uzorke u kojima je bilo potrebno dodala nekoliko kapi 80 %-tnog (v/v) acetona da bi volumen ekstrakta bio točno 1,5 mL. Apsorbanciju dobivenog ekstrakta mjerila sam spektrofotometrijski pri valnim duljinama od 470 nm, 646 nm i 663 nm. Količinu fotosintetskih pigmenata sam računala prema

formulama preuzetim iz rada Wellburn (1994) za 80%-tni aceton kao ekstrakcijsko otapalo. Najprije sam izračunala koncentraciju fotosintetskih pigmenata koju sam izrazila kao μg pigmenta po mL [μg mL^{-1}], a računala sam prema formulama:

$$c_a = 12{,}21\ A_{663} - 2{,}81\ A_{646}$$

$$c_b = 20{,}13\ A_{646} - 5{,}03\ A_{663}$$

$$c_k = \frac{1000\ A_{470} - 3{,}27 \times c_a - 104 \times c_b}{198}$$

Iz dobivenih koncentracija računala sam količinu fotosintetskih pigmenata u svježem biljnom tkivu. Dobivene koncentracije fotosintetskih pigmenata klorofila *a*, klorofila *b* i karotenoida izrazila sam kao μg pigmenta po g svježeg tkiva [μg g_{FW}^{-1}], a računala sam prema formuli:

$$c = \frac{c_{pig.} \times V_{e.p.}}{m_{FW}}$$

U formulama su korištene kratice: c_a - količina klorofila *a* [μg mL^{-1}]; c_b - količina klorofila *b* [μg mL^{-1}]; c_k - količina karotenoida [μg mL^{-1}]; $c_{pig.}$ - količina pojedinog pigmenta [μg mL^{-1}]; A_{470} - absorbancija pri 470 nm; A_{646} - absorbancija pri 646 nm; A_{663} - absorbancija mjerenja pri 663 nm; m_{FW} - masa svježeg tkiva [g_{FW}]; $V_{e.p.}$ - volumen ekstrakcijskog pufera (1,5 mL)

3.17. Prikaz i statistička obrada podataka

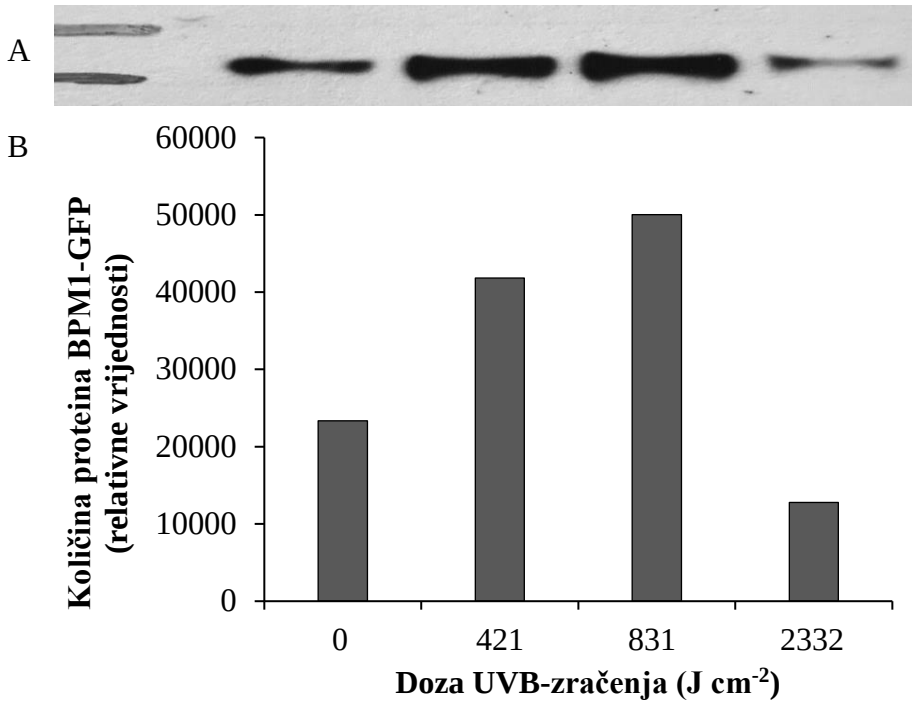
Sve dobivene brojčane podatke obradila sam računalnim programom Microsoft Excel 2016. Konačne rezultate prikazala sam kao srednje vrijednosti od četiri ili pet bioloških replika, a odstupanje od srednje vrijednosti izrazila sam kao standardnu pogrešku. Podatke sam statistički obradila računalnim programom *Statistica 13* (TIBCO Software Inc., SAD). Provela sam *t*-test kako bih odredila razliku između kontrolnih uzoraka i uzoraka tretiranih UVB-zračenjem unutar pojedine linije biljaka. Također, provela sam jednosmjernu analizu varijance (engl. *one-way ANOVA*), nakon čega sam izvela Tukeyjev test za nejednaki broj uzoraka (engl. *Tukey HSD for unequal N*) s ciljem određivanja značajnosti razlika između kontrolnih uzoraka svih triju linija, te tretiranih uzoraka svih triju linija, odnosno divljeg tipa biljaka, biljaka s pojačanom razinom ekspresije gena *BPM1* (*oeBPM1*) i biljaka s utišanim genima *BPM* (*amiR-bpm*). Kod svih dobivenih rezultata statistički značajnima smatrala sam one kod kojih sam dobila razinu značajnosti manju ili jednaku 0,05 ($p \leq 0{,}05$).

4. Rezultati

U prvom dijelu pokusa odredila sam dozu UVB-zračenja koja uzrokuje pojačano nakupljanje proteina BPM1 u klijanaca linije *oeBPM1* koja ima pojačanu ekspresiju gena *BPM1*. Primijenjene doze od 421 J cm^{-2}, 831 J cm^{-2} i 2,332 kJ cm^{-2} nisu uzrokovale vidljivu morfološku promjenu klijanaca, npr. venuće. Vrijeme između tretmana odabranom dozom i uzorkovanja bilo je 1 sat tijekom kojeg su biljke bila na svjetlosti. Nakon toga sam provela western analizu i izabrala dozu UVB-zračenja od ~800 J cm^{-2} koju sam zatim primijenila u nastavku istraživanja. U drugom dijelu pokusa izložila sam sve tri linije (divlji tip, liniju s pojačanom ekspresijom gena *BPM1* i liniju sa smanjenom ekspresijom gena *BPM1, BPM4, BPM5 i BPM6*) odabranoj dozi od ~800 J cm^{-2} UVB-zračenja te izmjerila odabrane fiziološke parametre i pokazatelje oksidacijskog stresa.

4.1. Imunodetekcija proteina BPM1-GFP u cilju izbora doze UVB-zračenja

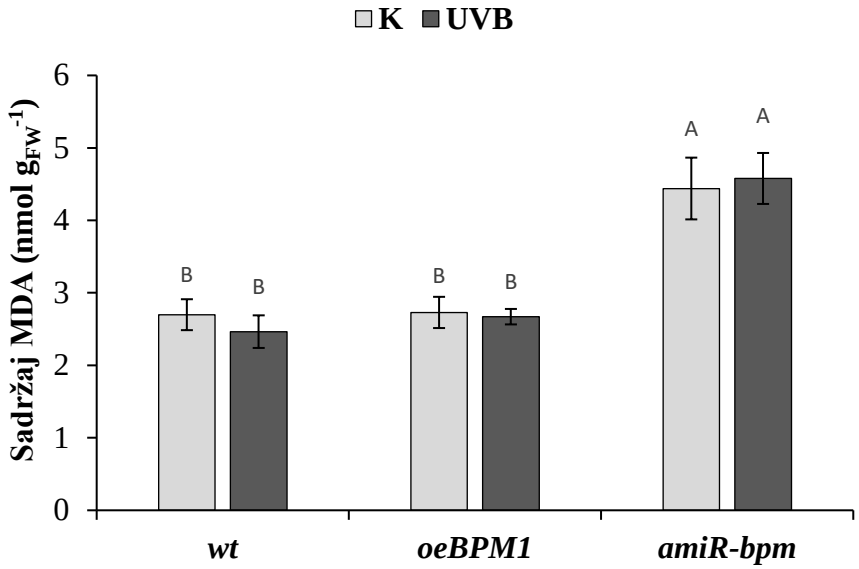
Dozu UVB-zračenja odredila sam na klijancima linije s pojačanom ekspresijom gena *BPM1* (*oeBPM1*) imunodetekcijom proteina BPM1-GFP western analizom (Slika 1A). Uz pomoć računalnog programa *ImageJ* izradila sam grafički prikaz kvantifikacije nakupljanja proteina BPM1-GFP (Slika 1B). Rezultat koji sam dobila ukazao je da razina nakupljanja proteina BPM1-GFP raste primjenom jačih doza UVB-zračenja te je najveća u klijanaca koji su tretirani dozom od 831 J cm^{-2}. Međutim, najveća primijenjena doza UVB-zračenja, 2,3 kJ cm^{-2}, izazvala je smanjenje količine proteina BPM1-GFP (Slika 1B). Zbog toga sam za izvođenje drugog dijela istraživanja koristila dozu od otprilike 800 J cm^{-2}. Nadalje, 1 sat inkubacije klijanaca na svjetlosti po tretmanu UVB-zračenjem bilo je vrijeme nakon kojeg sam dokazala nakupljanje proteina BPM1 pa sam to vrijeme inkubacije primijenila i u drugom dijelu pokusa.



Slika 1. Količina proteina BPM1-GFP u klijancima biljke *Arabidopsis thaliana* linije s pojačanom ekspresijom proteina BPM1 (*oeBPM1*) nakon tretmana dozama UVB-zračenja od 421 J cm^{-2}, 831 J cm^{-2} i 2,332 kJ cm^{-2} te u kontrolnih klijanaca koji nisu bili izloženi UVB-zračenju (0 J cm^{-2}). Vrijeme inkubacije klijanaca između primjene UVB-zračenja i prikupljanja uzoraka za ekstrakciju bilo je 1 sat (na svjetlosti i temperaturi 24 °C).
A - Rezultat dobiven imunodetekcijom proteina BPM1-GFP western analizom
B - Relativne vrijednosti količine proteina BPM1-GFP dobive uz pomoć računalnog programa *ImageJ*

4.2. Sadržaj MDA

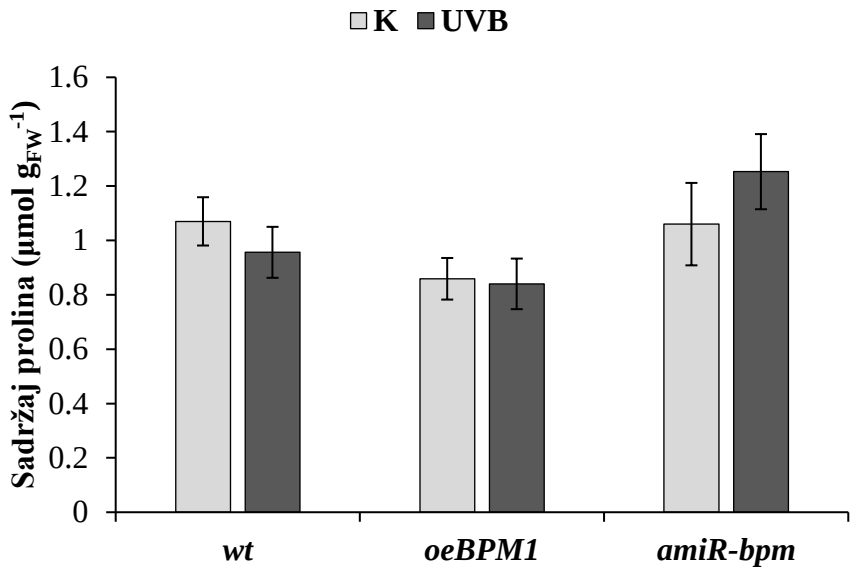
Mjerenjem količine MDA odredila sam stupanj lipidne peroksidacije nakon izlaganja klijanaca biljke *A. thaliana* UVB-zračenju jačine 809 J cm^{-2} (Slika 2). Rezultati pokazuju da nije bilo značajne razlike u sadržaju MDA između kontrolnih biljaka (K) i biljaka izloženih UVB-zračenju (UVB) unutar svake pojedine linije. Međusobnom usporedbom triju korištenih linija dokazana je statistički značajna razlika u sadržaju MDA linije sa smanjenom ekspresijom gena *BPM* (*amiR-bpm*) u odnosu na liniju divljeg tipa (wt) i liniju s pojačanom ekspresijom gena *BPM1* (*oeBPM1*). Ti rezultati upućuju na to da je u linije *amiR-bpm* stupanj lipidne peroksidacije viši u odnosu na druge dvije linije.



Slika 2. Sadržaj MDA, izražen u nmol g_{FW}^{-1}, u klijancima *Arabidopsis thaliana* divljeg tipa (wt), u linije s pojačanom ekspresijom gena *BPM1* (*oeBPM1*) i linije sa smanjenom ekspresijom gena *BPM* (*amiR-bpm*). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti od četiri ili pet bioloških replika ± standardna pogreška. Nije bilo statistički značajne razlike između kontrolnih biljaka i biljaka tretiranih UVB-zračenjem unutar pojedine linije (*t*-test, $p \leq 0,05$). Različita velika slova predstavljaju statistički značajnu razliku između kontrolnih biljaka svih triju linija, odnosno biljaka svih triju linija tretiranih UVB-zračenjem (Tukeyjev test za nejednaki broj uzoraka, $p \leq 0,05$).
K - kontrolne biljke, UVB - biljke tretirane UVB-zračenjem (809 J cm^{-2})

4.3. Sadržaj prolina

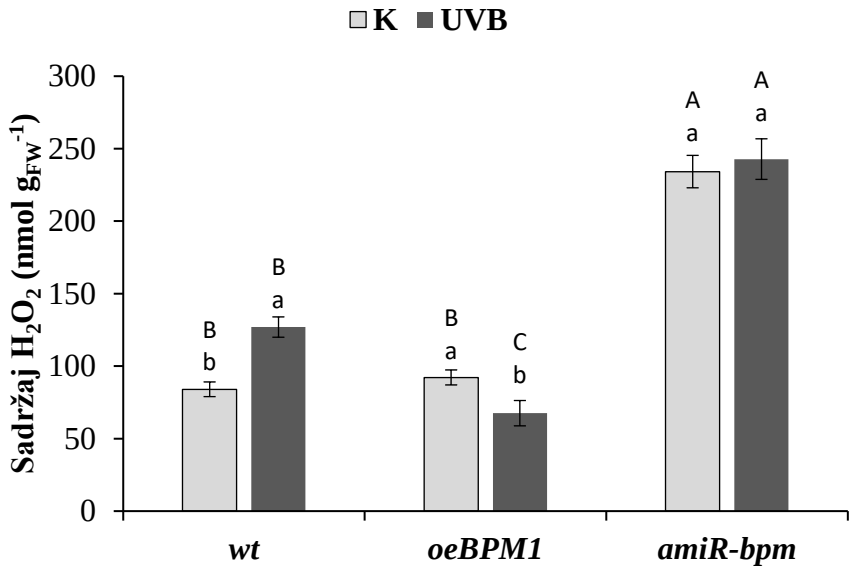
Rezultati mjerenja sadržaja prolina nakon izlaganja klijanaca biljke *A. thaliana* UVB-zračenju jačine 809 J cm^{-2} pokazuju da nije bilo statistički značajne razlike između kontrolne skupine biljaka (K) i biljaka tretiranih UVB-zračenjem (UVB) unutar svake pojedine linije (Slika 3). Također, nije bilo značajne razlike u sadržaju prolina između linije divljeg tipa (wt), linije s pojačanom ekspresijom gena *BPM1* (*oeBPM1*) i linije sa smanjenom ekspresijom gena *BPM* (*amiR-bpm*).



Slika 3. Sadržaj prolina, izražen u µmol g_{FW}^{-1}, u klijancima *Arabidopsis thaliana* divljeg tipa (wt), u linije s pojačanom ekspresijom gena *BPM1* (*oeBPM1*) i linije sa smanjenom ekspresijom gena *BPM* (*amiR-bpm*). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti od četiri ili pet bioloških replika ± standardna pogreška. Nije bilo statistički značajne razlike između kontrolnih biljaka i biljaka tretiranih UVB-zračenjem unutar pojedine linije (*t*-test, $p \leq 0,05$), kao niti između kontrolnih biljaka svih triju linija, odnosno biljaka svih triju linija tretiranih UVB-zračenjem (Tukeyjev test za nejednaki broj uzoraka, $p \leq 0,05$).
K - kontrolne biljke, UVB - biljke tretirane UVB-zračenjem (809 J cm^{-2})

4.4. Sadržaj vodikovog peroksida

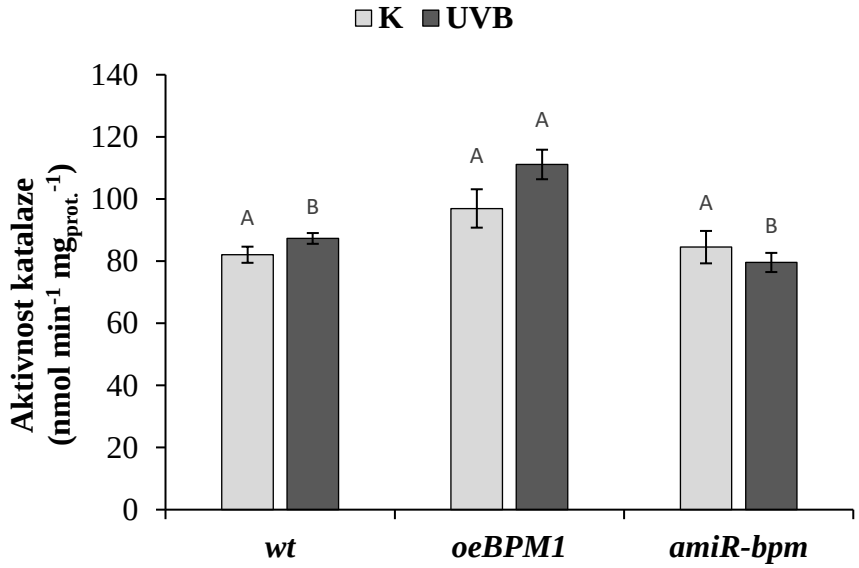
Mjerenje sadržaja vodikovog peroksida (H_2O_2) pokazuje da je u divljeg tipa (wt) nakon izlaganja UVB-zračenju (UVB) jačine 809 J cm^{-2} došlo do pojačanog nakupljanja H_2O_2 u odnosu na kontrolnu skupinu biljaka (K) (Slika 4). Nasuprot tome, kod klijanaca linije s pojačanom ekspresijom gena *BPM1* (*oeBPM1*) nakon izlaganja UVB-zračenju došlo je do smanjenja sadržaja H_2O_2 u odnosu na kontrolnu skupinu biljaka. Linija sa smanjenom ekspresijom gena *BPM* (*amiR-bpm*) nije pokazala značajnu razliku u sadržaju H_2O_2 između kontrolnih i tretiranih biljaka, ali je ista linija pokazala statistički značajno viši sadržaj H_2O_2 u odnosu na kontrolne i tretirane biljke drugih dviju linija. Nadalje, biljke linije s pojačanom ekspresijom gena *BPM1* (*oeBPM1*) koje su tretirane UVB-zračenjem imale su najmanji sadržaj H_2O_2 u odnosu na sve ostale, tretirane i netretirane linije biljaka.



Slika 4. Sadržaj vodikovog peroksida (H_2O_2), izražen u nmol g_{FW}^{-1}, u klijancima *Arabidopsis thaliana* divljeg tipa (wt), u linije s pojačanom ekspresijom gena *BPM1* (*oeBPM1*) i linije sa smanjenom ekspresijom gena *BPM* (*amiR-bpm*). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti od četiri ili pet bioloških replika ± standardna pogreška. Različita mala slova predstavljaju statistički značajnu razliku između kontrolnih biljaka i biljaka tretiranih UVB-zračenjem unutar pojedine linije (*t*-test, $p \leq 0,05$). Različita velika slova predstavljaju statistički značajnu razliku između kontrolnih biljaka svih triju linija, odnosno biljaka svih triju linija tretiranih UVB-zračenjem (Tukeyjev test za nejednaki broj uzoraka, $p \leq 0,05$).
K - kontrolne biljke, UVB - biljke tretirane UVB-zračenjem (809 J cm^{-2})

4.5. Aktivnost katalaze

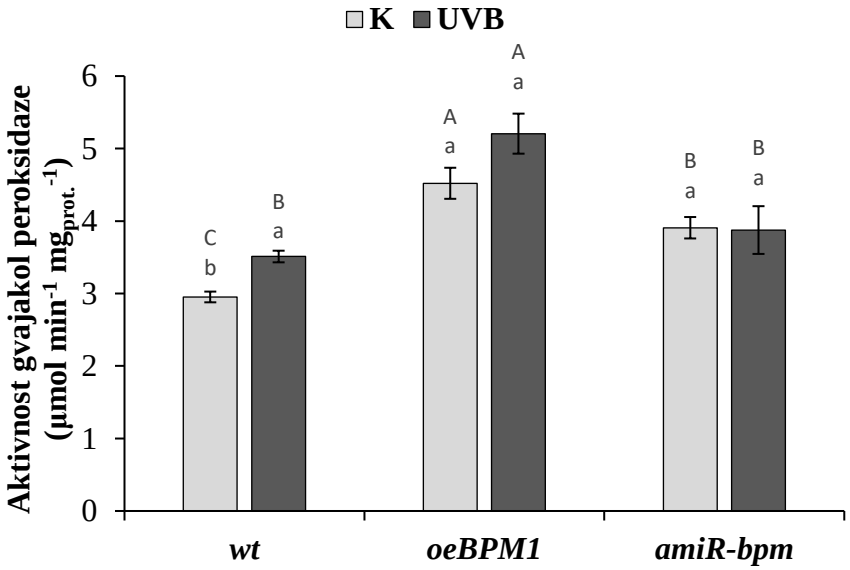
Rezultati mjerenja aktivnosti katalaze (CAT) pokazali su kako između kontrolnih biljaka (K) i biljaka tretiranih UVB-zračenjem (UVB) nije bilo značajne razlike u aktivnosti katalaze niti kod jedne od triju linija (Slika 5). Klijanci linije divljeg tipa (wt) te klijanci linije sa smanjenom ekspresijom gena *BPM* (*amiR-bpm*) koji su tretirani UVB-zračenjem imali su statistički značajno nižu aktivnost katalaze od klijanaca linije s pojačanom ekspresijom gena *BPM1* (*oeBPM1*). Kontrolne skupine klijanaca svih triju linija nisu pokazale značajnu razliku u aktivnosti katalaze.



Slika 5. Aktivnost katalaze (CAT), izražena je u nmol min^{-1} $mg_{prot.}^{-1}$, u klijancima *Arabidopsis thaliana* divljeg tipa (wt), u linije s pojačanom ekspresijom gena *BPM1* (*oeBPM1*) i linije sa smanjenom ekspresijom gena *BPM* (*amiR-bpm*). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti od četiri ili pet bioloških replika ± standardna pogreška. Nije bilo statistički značajne razlike između kontrolnih biljaka i biljaka tretiranih UVB-zračenjem unutar pojedine linije (*t*-test, $p \leq 0,05$). Različita velika slova predstavljaju statistički značajnu razliku između kontrolnih biljaka svih triju linija, odnosno biljaka svih triju linija tretiranih UVB-zračenjem (Tukeyjev test za nejednaki broj uzoraka, $p \leq 0,05$).
K - kontrolne biljke, UVB - biljke tretirane UVB-zračenjem (809 J cm^{-2})

4.6. Aktivnost gvajakol peroksidaze

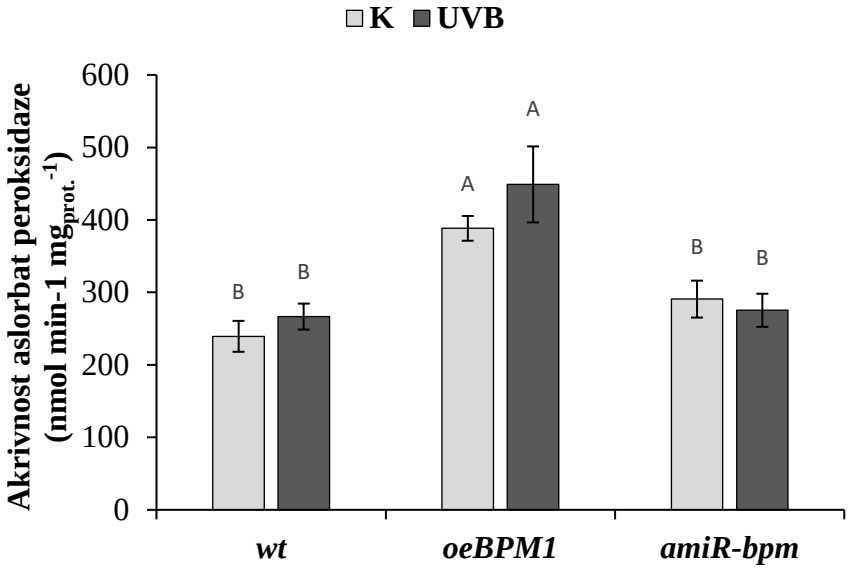
Aktivnost gvajakol peroksidaze (G-POD) u biljaka divljeg tipa (wt) tretiranih UVB-zračenjem (UVB) bila je povišena u odnosu na kontrolne biljke (K) (Slika 6). Ta razlika nije bila uočena kod klijanaca drugih dviju linija. Klijanci linije s pojačanom ekspresijom gena *BPM1* (*oeBPM1*) imali su najvišu aktivnost gvajakol peroksidaze u odnosu na druge dvije linije. Klijanci kontrolne skupine biljaka divljeg tipa (wt) imali su statistički značajno najnižu aktivnost gvajakol peroksidaze u odnosu na liniju s pojačanom ekspresijom gena *BPM1* (*oeBPM1*) i liniju sa smanjenom ekspresijom gena *BPM* (*amiR-bpm*).



Slika 6. Aktivnost gvajakol peroksidaza (G-POD), izražena je u μmol min^{-1} $mg_{prot.}^{-1}$, u klijancima *Arabidopsis thaliana* divljeg tipa (wt), u linije s pojačanom ekspresijom gena *BPM1* (*oeBPM1*) i linije sa smanjenom ekspresijom gena *BPM* (*amiR-bpm*). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti od četiri ili pet bioloških replika ± standardna pogreška. Različita mala slova predstavljaju statistički značajnu razliku između kontrolnih biljaka i biljaka tretiranih UVB-zračenjem unutar pojedine linije (*t*-test, $p \leq 0,05$). Različita velika slova predstavljaju statistički značajnu razliku između kontrolnih biljaka svih triju linija, odnosno biljaka svih triju linija tretiranih UVB-zračenjem (Tukeyjev test za nejednaki broj uzoraka, $p \leq 0,05$).
K - kontrolne biljke, UVB - biljke tretirane UVB-zračenjem (809 J cm^{-2})

4.7. Aktivnost askorbat peroksidaze

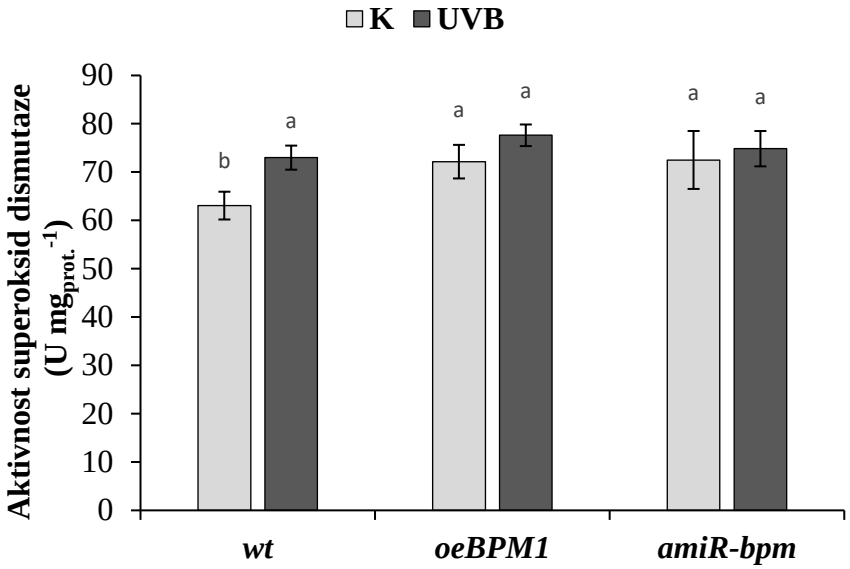
Rezultati mjerenja aktivnosti askorbat peroksidaze (APX) po izlaganju klijanca biljke *A. thaliana* UVB-zračenju jačine 809 J cm^{-2} pokazali su kako između kontrolnih biljaka (K) i biljaka tretiranih UVB-zračenjem (UVB) nije postojala značajna razlika niti kod jedne od triju linija (Slika 7). Klijanci linije divljeg tipa (wt) te klijanci linije sa smanjenom ekspresijom gena *BPM* (*amiR-bpm*) općenito su imali statistički značajno nižu aktivnost askorbat peroksidaze od klijanaca linije s pojačanom ekspresijom gena *BPM1* (*oeBPM1*).



Slika 7. Aktivnost askorbat peroksidaze (APX), izražena je u nmol min^{-1} $mg_{prot.}^{-1}$, u klijancima *Arabidopsis thaliana* divljeg tipa (wt), u linije s pojačanom ekspresijom gena *BPM1* (*oeBPM1*) i linije sa smanjenom ekspresijom gena *BPM* (*amiR-bpm*). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti od četiri ili pet bioloških replika ± standardna pogreška. Nije bilo statistički značajne razlike između kontrolnih biljaka i biljaka tretiranih UVB-zračenjem unutar pojedine linije (*t*-test, $p \leq 0,05$). Različita velika slova predstavljaju statistički značajnu razliku između kontrolnih biljaka svih triju linija, odnosno biljaka svih triju linija tretiranih UVB-zračenjem (Tukeyjev test za nejednaki broj uzoraka, $p \leq 0,05$).
K - kontrolne biljke, UVB - biljke tretirane UVB-zračenjem (809 J cm^{-2})

4.8. Aktivnost superoksid dismutaze

Aktivnost superoksid dismutaze (SOD) je nakon izlaganja klijanca biljke *A. thaliana* UVB-zračenju (UVB) jačine 809 J cm^{-2} bila povišena u biljaka divljeg tipa (wt) u odnosu na kontrolne biljke (K) (Slika 8). Ta razlika nije bila uočena kod klijanaca drugih dviju linija. Usporedbom aktivnosti SOD u klijanaca divljeg tipa (wt), klijanaca linije sa smanjenom ekspresijom gena *BPM* (*amiR-bpm*) i klijanaca linije s pojačanom ekspresijom gena *BPM1* (*oeBPM1*) nije utvrđena statistički značajna razlika.

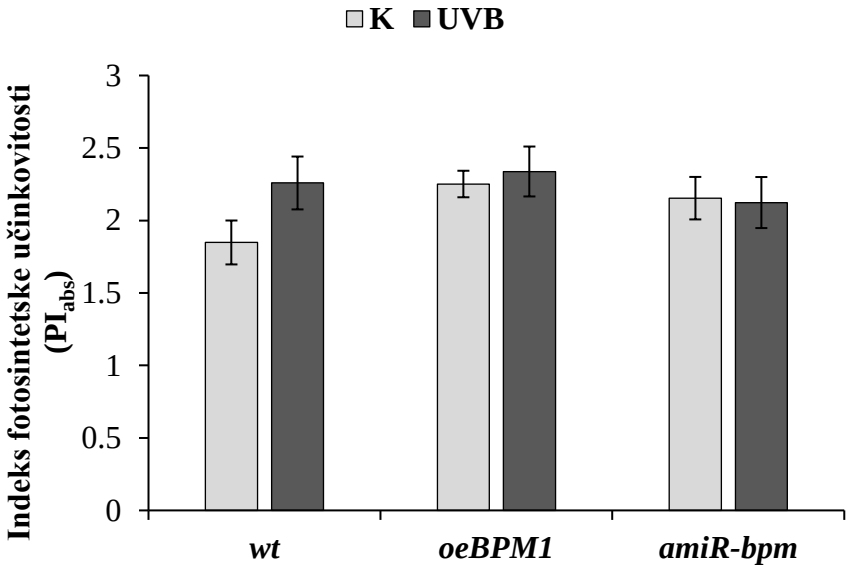


Slika 8. Aktivnost superoksid dismutaze (SOD), izražena je u U $mg_{prot.}^{-1}$, u klijancima *Arabidopsis thaliana* divljeg tipa (wt), u linije s pojačanom ekspresijom gena *BPM1* (*oeBPM1*) i linije sa smanjenom ekspresijom gena *BPM* (*amiR-bpm*). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti od četiri ili pet bioloških replika ± standardna pogreška. Različita mala slova predstavljaju statistički značajnu razliku između kontrolnih biljaka i biljaka tretiranih UVB-zračenjem unutar pojedine linije (*t*-test, $p \leq 0,05$). Nije bilo statistički značajne razlike između kontrolnih biljaka svih triju linija, odnosno biljaka svih triju linija tretiranih UVB-zračenjem (Tukeyjev test za nejednaki broj uzoraka, $p \leq 0,05$).
K - kontrolne biljke, UVB - biljke tretirane UVB-zračenjem (809 J cm^{-2})

4.9. Mjerenje polifaznog rasta fluorescencije klorofila *a* – OJIP-test

4.9.1. Indeks fotosintetske učinkovitosti

OJIP-testom mjerila sam polifazni rast fluorescencije klorofila *a* te kao rezultate dobila više parametara od kojih je jedan indeks fotosintetske učinkovitosti (PI_{abs}) (Slika 9). Po izlaganju klijanca biljke *A. thaliana* UVB-zračenju jačine 809 J cm^{-2} nije bila utvrđena statistički značajna razlika u vrijednosti PI_{abs} između kontrolnih klijanaca (K) i klijanaca tretiranih UVB-zračenjem (UVB). Također, nije bilo značajne razlike u PI_{abs} između linija.



Slika 9. Indeks fotosintetske učinkovitosti (PI_{abs}) u klijancima *Arabidopsis thaliana* divljeg tipa (wt), u linije s pojačanom ekspresijom gena *BPM1* (*oeBPM1*) i linije sa smanjenom ekspresijom gena *BPM* (*amiR-bpm*). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti od četiri ili pet bioloških replika ± standardna pogreška. Nije bilo statistički značajne razlike između kontrolnih biljaka i biljaka tretiranih UVB-zračenjem unutar pojedine linije (*t*-test, $p \leq 0,05$), kao niti između kontrolnih biljaka svih triju linija, odnosno biljaka svih triju linija tretiranih UVB-zračenjem (Tukeyjev test za nejednaki broj uzoraka, $p \leq 0,05$).
K - kontrolne biljke, UVB - biljke tretirane UVB-zračenjem (809 J cm^{-2})

4.9.2. Apsorpcija, hvatanje i rasipanje pobudne energije po aktivnom RC-u, maksimalni kvantni prinos PSII te gustoća aktivnih RC-a

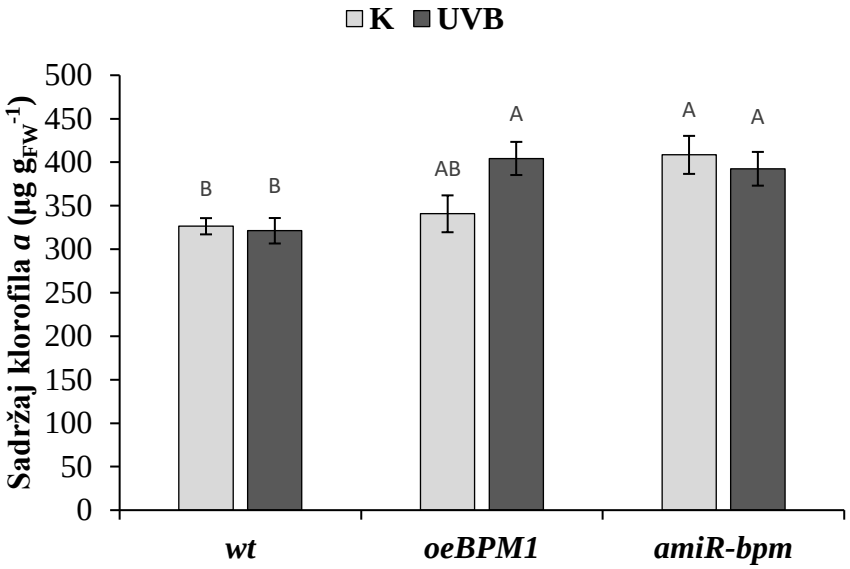
Osim PI_{abs}, prikazani su i sljedeći parametri: apsorpcija svjetlosti po aktivnom RC-u (ABS/RC), protok uhvaćenih fotona po aktivnom RC-u (TR_0/RC), prijenos elektrona po aktivnom RC-u (ET_0/RC), rasipanje energije po aktivnom RC-u (DI_0/RC), maksimalni kvantni prinos PSII (F_v/F_m) i gustoća aktivnih RC-a po osvijetljenoj površini lista (RC/CS_0) (Tablica 2). Između klijanaca kontrolnih skupina (K) te klijanaca tretiranih UVB-zračenjem (UVB) u svakoj zasebnoj liniji općenito nije dokazana statistički značajna razlika, ali kontrolna skupina biljaka linije s pojačanom ekspresijom gena *BPM1* (*oeBPM1*) pokazala je viši maksimalni kvantni prinos PSII (F_v/F_m) u odnosu na tretirane biljke iste linije. Nadalje, statistički značajna razlika među linijama postojala je samo kod parametra gustoća aktivnih RC-a po osvijetljenoj površini lista (RC/CS_0). Rezultati su pokazali kako su biljke tretirane UVB-zračenjem linije sa smanjenom ekspresijom gena *BPM* (*amiR-bpm*) imale nižu gustoću aktivnih RC-a po osvijetljenoj površini lista u odnosu na divlji tip (wt) i liniju s pojačanom ekspresijom gena *BPM1* (*oeBPM1*).

Tablica 2. Parametri dobiveni mjerenjem polifaznog rasta fluorescencije klorofila *a* OJIP-testom – apsorpcija svjetlosti po aktivnom RC (ABS/RC), protok uhvaćenih fotona po aktivnom RC (TR_0/RC), prijenos elektrona po aktivnom RC (ET_0/RC), rasipanje energije po aktivnom RC (DI_0/RC), maksimalni kvantni prinos fotosustava II (F_v/F_m) i gustoća aktivnih RC po osvijetljenoj površini lista (RC/CS_0) u klijancima *Arabidopsis thaliana* divljeg tipa (wt), u linije s pojačanom ekspresijom gena *BPM1* (*oeBPM1*) i linije sa smanjenom ekspresijom gena *BPM* (*amiR-bpm*). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti od četiri ili pet bioloških replika ± standardna pogreška. Različita mala slova kod parametara F_v/F_m i RC/CS_0 predstavljaju statistički značajnu razliku između kontrolnih biljaka i biljaka tretiranih UVB-zračenjem unutar pojedine linije (*t*-test, $p \leq 0,05$). Različita velika slova kod parametara F_v/F_m i RC/CS_0 predstavljaju statistički značajnu razliku između kontrolnih biljaka svih triju linija, odnosno biljaka svih triju linija tretiranih UVB-zračenjem (Tukeyjev test za nejednaki broj uzoraka, $p \leq 0,05$). Kod parametara ABS/RC, TR_0/RC, ET_0/RC i DI_0/RC nije bilo statistički značajne razlike između kontrolnih biljaka i biljaka tretiranih UVB-zračenjem unutar pojedine linije, kao niti između kontrolnih biljaka svih triju linija, odnosno biljaka svih triju linija tretiranih UVB-zračenjem.
K - kontrolne biljke, UVB - biljke tretirane UVB-zračenjem (809 J cm^{-2})

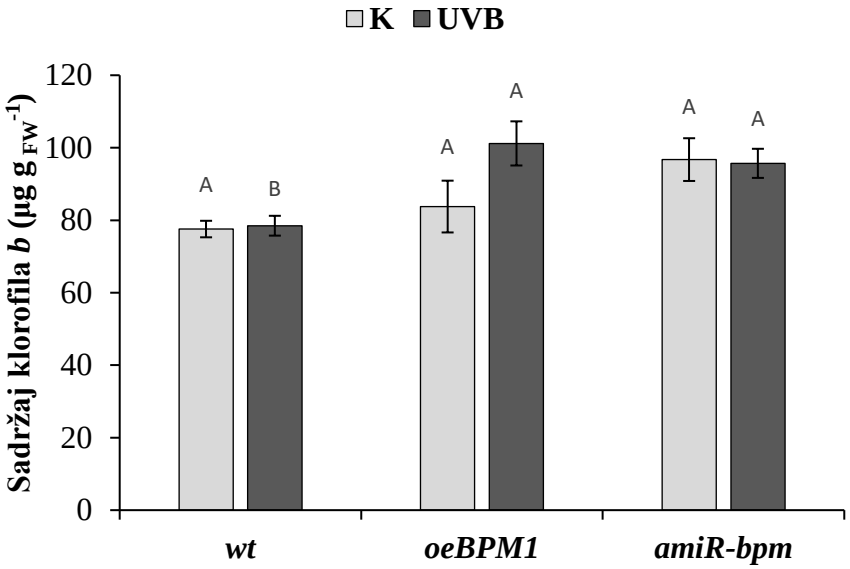
	linija	**K**	**UVB**
ABS/RC	wt	2,9766±0,104	2,6844±0,108
	oeBPM1	2,7864±0,045	2,744±0,063
	amiR-bpm	2,797±0,034	2,7884±0,053
TR_0/RC	wt	2,3046±0,07	2,0736±0,086
	oeBPM1	2,1666±0,034	2,101±0,044
	amiR-bpm	2,15725±0,034	2,1256±0,039
ET_0/RC	wt	1,409±0,049	1,3238±0,076
	oeBPM1	1,3888±0,019	1,385±0,031
	amiR-bpm	1,3795±0,04	1,37±0,031
DI_0/RC	wt	0,672±0,038	0,6106±0,029
	oeBPM1	0,6198±0,017	0,64280,02
	amiR-bpm	0,63975±0,019	0,6634±0,021
F_v/F_m	wt	0,7748±0,006 **a**	0,7724±0,006 **a**
	oeBPM1	0,7778±0,004 **a**	0,7658±0,003 **b**
	amiR-bpm	0,77125±0,007 **a**	0,7622±0,005 **a**
RC/CS_0	wt	4729,2±240,553 **A**	5084,23±92,12 **A**
	oeBPM1	4854,95±54,109 **A**	5030,86±114,74 **AB**
	amiR-bpm	4514,33±85,642 **A**	4537,88±179,06 **B**

4.10. Udio fotosintetskih pigmenata

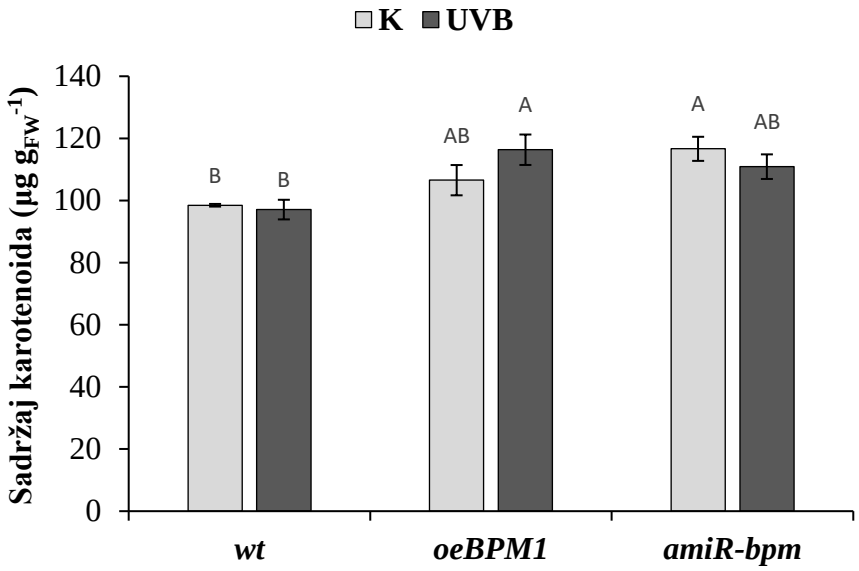
Mjerenje udjela fotosintetskih pigmenata klorofila *a*, klorofila *b* i karotenoida u klijanaca biljke *A. thaliana* izloženih UVB-zračenju jačine 809 J cm^{-2} pokazalo je kako između kontrolnih biljaka (K) i biljaka tretiranih UVB-zračenjem (UVB) u pojedinim linijama nije postojala statistički značajna razlika (Slike 10, 11 i 12). Klijanci kontrolne skupine biljaka divljeg tipa (wt) imali su značajno niži udio klorofila *a* u odnosu na liniju sa smanjenom ekspresijom gena *BPM* (*amiR-bpm*), dok linija s pojačanom ekspresijom gena *BPM1* (*oeBPM1*) nije imala statistički značajno različiti udio klorofila *a* u odnosu na druge dvije linije (Slika 10). Nadalje, klijanci linije divljeg tipa (wt) tretirani UVB-zračenjem imali su statistički značajno niži udio klorofila *a* u odnosu na druge dvije linije. Klijanci kontrolne skupine biljaka svih triju linija općenito nisu pokazali statistički značajnu razliku u udjelu klorofila *b*, dok su klijanci linije divljeg tipa (wt) tretirani UVB-zračenjem pokazali statistički značajno niži udio klorofila *b* u odnosu na druge dvije linije (Slika 11). Naposljetku, klijanci kontrolne skupine biljaka linije divljeg tipa (wt) imali su značajno niži udio karotenoida u odnosu na liniju sa smanjenom ekspresijom gena *BPM1* (*amiR-bpm*), dok linija s pojačanom ekspresijom gena *BPM1* (*oeBPM1*) nije imala statistički značajno različiti udio karotenoida u odnosu na druge dvije linije (Slika 12). Klijanci linije divljeg tipa (wt) tretirani UVB-zračenjem imali su statistički značajno niži udio karotenoida u odnosu na liniju s pojačanom ekspresijom gena *BPM1* (*oeBPM1*), dok linija sa smanjenom ekspresijom gena *BPM* (*amiR-bpm*) nije imala značajno različiti udio karotenoida u odnosu na druge dvije linije.



Slika 10. Sadržaj klorofila *a*, izražen u µg g_{FW}^{-1}, u klijancima *Arabidopsis thaliana* divljeg tipa (wt), u linije s pojačanom ekspresijom gena *BPM1* (*oeBPM1*) i linije sa smanjenom ekspresijom gena *BPM* (*amiR-bpm*). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti od četiri ili pet bioloških replika ± standardna pogreška. Nije bilo statistički značajne razlike između kontrolnih biljaka i biljaka tretiranih UVB-zračenjem unutar pojedine linije (*t*-test, $p \leq 0,05$). Različita velika slova predstavljaju statistički značajnu razliku između kontrolnih biljaka svih triju linija, odnosno biljaka svih triju linija tretiranih UVB-zračenjem (Tukeyjev test za nejednaki broj uzoraka, $p \leq 0,05$).
K - kontrolne biljke, UVB - biljke tretirane UVB-zračenjem (809 J cm^{-2})



Slika 11. Sadržaj klorofila *b*, izražen u µg g_{FW}^{-1}, u klijancima *Arabidopsis thaliana* divljeg tipa (wt), u linije s pojačanom ekspresijom gena *BPM1* (*oeBPM1*) i linije sa smanjenom ekspresijom gena *BPM* (*amiR-bpm*). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti od četiri ili pet bioloških replika ± standardna pogreška. Nije bilo statistički značajne razlike između kontrolnih biljaka i biljaka tretiranih UVB-zračenjem unutar pojedine linije (t-test, $p \leq 0,05$). Različita velika slova predstavljaju statistički značajnu razliku između kontrolnih biljaka svih triju linija, odnosno biljaka svih triju linija tretiranih UVB-zračenjem (Tukeyjev test za nejednaki broj uzoraka, $p \leq 0,05$).
K - kontrolne biljke, UVB - biljke tretirane UVB-zračenjem (809 J cm^{-2})



Slika 12. Sadržaj karotenoida, izražen u µg g_{FW}^{-1}, u klijancima *Arabidopsis thaliana* divljeg tipa (wt), u linije s pojačanom ekspresijom gena *BPM1* (*oeBPM1*) i linije sa smanjenom ekspresijom gena *BPM* (*amiR-bpm*). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti od četiri ili pet bioloških replika ± standardna pogreška. Nije bilo statistički značajne razlike između kontrolnih biljaka i biljaka tretiranih UVB-zračenjem unutar pojedine linije (t-test, $p \leq 0,05$). Različita velika slova predstavljaju statistički značajnu razliku između kontrolnih biljaka svih triju linija, odnosno biljaka svih triju linija tretiranih UVB-zračenjem (Tukeyjev test za nejednaki broj uzoraka, $p \leq 0,05$).
K - kontrolne biljke, UVB - biljke tretirane UVB-zračenjem (809 J cm^{-2})

5. Rasprava

Dosadašnjim istraživanjima potvrđeno je da stresni okolišni uvjeti djeluju na ekspresiju gena za protein BPM1 i na njegovu stabilnost. Škiljaica i sur. (2020) istraživali su utjecaj tame, solnog stresa, manitola i povišene temperature na ekspresiju gena *BPM1* u liniji *oeBPM1*. Pokazali su kako tama i solni stres utječu na smanjenje ekspresije gena *BPM1*, povišena temperatura uzrokovala je pojačano nakupljanje proteina BPM1, dok manitol nije utjecao na razinu proteina BPM1.

U cilju izrade ovog rada najprije je bilo potrebno utvrditi dozu UVB-zračenja kojoj sam u drugom dijelu pokusa izlagala klijance biljke *A. thaliana* divljeg tipa (wt), linije s pojačanom ekspresijom gena *BPM1* (*oeBPM1*) te linije sa smanjenom ekspresijom gena *BPM1*, *BPM4*, *BPM5* i *BPM6* (*amiR-bpm*) te odrediti vremensku točku sakupljanja uzoraka nakon tretmana. Od nekoliko primijenjenih doza UVB-zračenja kojima sam u prvom dijelu pokusa izlagala klijance linije *oeBPM1*, odabrala sam onu koja je imala učinak na akumulaciju proteina BPM1, a nije izazvala vidljivu morfološku promjenu, kao npr. venuće klijanaca. Rezultat dobiven imunodetekcijom proteina BPM1-GFP western analizom (Slika 1A) ukazao je na akumulaciju tog proteina nakon primjene srednje jakih doza UVB-zračenja te je najveća količina detektirana u klijanaca koji su tretirani dozom od 831 J cm^{-2}. Kako je ranije spomenuto, okolišni uvjeti i abiotički stresni čimbenici značajno utječu na količinu proteina BPM1 (Škiljaica i sur. 2020). Dobivenim rezultatima pokazala sam kako isto vrijedi i za primjenu UVB-zračenja. Prilikom izlaganja biljaka UVB-zračenju pokreče se specifičan UVB signalni put posredovan fotoreceptorom UVR8 koji regulira rast, razvoj i aklimatizaciju (Yin i Ulm 2017). Nadalje, dobiveni rezultati pokazali su kako je inkubacija klijanaca od 1 sata nakon tretmana dovoljna za detekciju proteina što može ukazivati na njegovu stabilnost u tim uvjetima ili na pojačanu ekspresiju gena *BPM1*. Stoga je uz dozu od 831 J cm^{-2} kod izvođenja drugog dijela istraživanja korišteno upravo to vrijeme inkubacije. Najveća primijenjena doza UVB-zračenja, 2,3 kJ cm^{-2}, izazvala je smanjenje količine proteina BPM1-GFP (Slika 1B). Jedno od objašnjenja pada količine proteina BPM1 kod primjene dovoljno velike doze UVB-zračenja je moguće pokretanje drugih postojećih puteva regulacije u odgovoru na stresne uvjete uzrokovane UVB-zračenjem (Brown i Jenkins 2008).

Cilj preostalog dijela istraživanja bio je utvrditi razliku u odgovoru na stres u divljeg tipa biljaka i linija s promijenjenom ekspresijom gena *BPM1* te ima li promjena ekspresije tog

gena učinak na odgovor biljaka na UVB-zračenje. Lipidnom peroksidacijom nastaju reaktivne vrste molekula, poput MDA, koje se često koriste kao markeri oksidacijskog stresa (Noctor i sur. 2015). MDA predstavlja sekundarni produkt djelovanja stresa jer je induciran ROS-ovima kao primarnim proizvodima stresnih uvjeta (Blokhina i sur. 2003). Nakon tretmana klijanaca svih triju linija UVB-zračenjem rezultati mjerenja količine MDA (Slika 2) pokazali su kako nema razlike u sadržaju MDA između kontrolnih biljaka i biljaka izloženih UVB-zračenju niti kod jedne linije biljaka. Ovakvi rezultati ukazuju da stres izazvan odabranom dozom UVB-zračenja nije izazvao lipidnu peroksidaciju. Također je moguće da je vremenski period inkubacije od sat vremena bio dovoljan da dođe do popravka nastalih oštećenja u klijanaca. Međusobna usporedba triju korištenih linija upućuje na to da je kod linije *amiR-bpm* bio viši stupanj lipidne peroksidacije u odnosu na druge dvije linije. S obzirom da nije uočena razlika u sadržaju MDA između kontrolnih i tretiranih biljaka, ali je uočen viši sadržaj MDA u biljaka linije *amiR-bpm*, dolazim do zaključka kako na to nije utjecalo UVB-zračenje već da je nakupljanju primarnih proizvoda stresa jedno od svojstava te linije. Slične spoznaje o liniji *amiR-bpm* otkrili su i Lechner i suradnici (2011). Fenotipskom analizom biljaka linije *amiR-bpm* otkrili su da su proteini BPM potrebni za normalan razvoj biljaka. Također su otkrili kako biljke linije *amiR-bpm* imaju smanjenu površinu lisnih plojki, nazubljene zrele listove, smanjen i grmoliki rast te promjene u razvoju cvjetova i smanjenu plodnost. Uz to, otkrili su kako biljke linija sa smanjenom ekspresijom gena *BPM*, uključujući liniju *amiR-bpm*, pokazuju veću osjetljivost na sušu.

Akumulacija aminokiseline prolin uslijed izlaganja stresnom čimbeniku poboljšava toleranciju na stres tako što održava turgor i osmotsku ravnotežu u stanici, stabilizira membrane te pridonosi održavanju koncentracije ROS-ova kako bi se spriječio oksidacijski stres u biljaka (Hayat i sur. 2012). Kao i kod lipidne peroksidacije, sadržaj prolina ostao je sličan između kontrolnih biljaka i biljaka tretiranih UVB-zračenjem (Slika 3). Također, nije bilo razlike u sadržaju prolina između divljeg tipa, linije *oeBPM1* i linije *amiR-bpm*. Iako rezultat ne pokazuje značajnu razliku, linija *amiR-bpm* pokazala je povišeni sadržaj prolina u odnosu na druge dvije linije. Budući da prolin, kao što je ranije navedeno, pridonosi održavanju količine ROS-a u stanici, njegova povišena količina može biti uzrokovana povišenim sadržajem H_2O_2, kojeg, pokazalo se, kod linije *amiR-bpm* ima u povišenoj količini u odnosu na druge dvije linije. Nasuprot tome, linija *oeBPM1* ima najmanju količinu prolina te isto tako i najmanji sadržaj H_2O_2. Vodikov peroksid jedan je od glavnih ROS-ova koji nastaje u biljkama tijekom oksidativnog stresa. U usporedbi s drugim ROS-ovima, relativno je stabilan i dulje se zadržava

u tkivu (Demidchik 2015). Rezultati mjerenja sadržaja H_2O_2, koje je kao što sam ranije napomenula provedeno 1 sat nakon izlaganja klijanaca UVB-zračenju, pokazali su kako je u divljeg tipa došlo do pojačanog nakupljanja H_2O_2 u odnosu na kontrolnu skupinu biljaka (Slika 4) što je očekivano. Nadalje, kod klijanaca linije *oeBPM1* nakon izlaganja UVB-zračenju došlo je do smanjenja sadržaja H_2O_2 u odnosu na kontrolnu skupinu biljaka. Naposljetku, kod linije *amiR-bpm* nema razlike u sadržaju H_2O_2 između kontrolnih i tretiranih biljaka, međutim ova linija općenito pokazuje znatno viši sadržaj H_2O_2 u odnosu na druge dvije linije. Štoviše, važno je ovdje spomenuti već ranije uočen rezultat usporedbe triju korištenih linija pri mjerenju stupnja lipidne peroksidacije. Naime, kod linije *amiR-bpm* bio je uočen viši stupanj lipidne peroksidacije u odnosu na druge dvije linije, što upravo može biti posljedica višeg sadržaja H_2O_2. Nasuprot tome, linija *oeBPM1* pokazuje bolju toleranciju stresa, odnosno bolji odgovor na UVB-zračenje čemu u prilog govori činjenica da je sadržaj H_2O_2 kod tretiranih klijanaca značajno smanjen u odnosu na kontrolnu skupinu biljaka te u odnosu na divlji tip i *amiR-bpm*. Promatrajući rezultate usporedbe sadržaja H_2O_2 između kontrolnih biljaka i biljaka tretiranih UVB-zračenjem u linije *oeBPM1* možemo doći do zaključka kako biljke izložene UVB-zračenju, u kojih je imunodetekcijom dokazana povišena količina proteina BPM1, pokazuju niži sadržaj H_2O_2 u odnosu na kontrolne biljke. H_2O_2 pri niskim koncentracijama djeluje kao signalna molekula uključena u aklimatizacijsku signalizaciju pokrećući toleranciju na različite stresne čimbenike (Quan i sur. 2008). Tako naizgled neobičan rezultat, koji govori kako su biljke izložene stresu u boljem oksidacijskom stanju, može značiti da postoji utjecaj proteina BPM1 koji je u ovoj liniji pojačano eksprimiran.

Za obranu od oksidacijskog stresa biljke posjeduju vrlo učinkovite enzime, CAT, G-POD, APX i SOD, koji su sastavni dio antioksidacijskog sustava te su raspodijeljeni u pojedinim staničnim odjeljcima upravo zbog proizvodnje specifičnih ROS-ova u tim odjeljcima (Apel i Hirt 2004). Posljedično tome, povećana aktivnost enzima antioksidacijskog sustava u izravnoj je vezi s boljim odgovorom biljaka na različite abiotičke stresne čimbenike (Kapoor i sur. 2019). Rezultati mjerenja aktivnosti CAT pokazali su kako između kontrolnih biljaka i biljaka tretiranih UVB-zračenjem nije postojala razlika niti kod jedne od triju linija (Slika 5). Klijanci linije *oeBPM1* tretirani UVB-zračenjem imali su višu aktivnost CAT od klijanaca divljeg tipa i linije *amiR-bpm*. U klijanaca kontrolne skupine svih triju linija nije dobivena razlika u aktivnosti CAT. Linija *oeBPM1* pokazala je općenito povišenu razinu aktivnosti CAT, iako kod kontrolne skupine biljaka razlika nije statistički značajna u odnosu na druge dvije linije. Ti rezultati upućuju na to kako biljke linije *oeBPM1* imaju bolji odgovor

na UVB-zračenje, u ovom slučaju zbog povećane aktivnosti enzima CAT koji ima ulogu u razgradnji H_2O_2 na vodu i kisik (Garg i Manchanda 2009). CAT je široko rasprostranjen te visoko eksprimiran enzim koji predstavlja dio antioksidacijske zaštite stanice (Anjum i sur. 2016). Obzirom na to da ranije prikazani podaci o sadržaju H_2O_2 pokazuju kako je u linije *oeBPM1* niži sadržaj H_2O_2, dolazi se do zaključka kako je moguće da je povišena aktivnost enzima CAT utjecala na sadržaj H_2O_2. Nadalje, rezultati mjerenja aktivnosti G-POD pokazali su da je došlo do povišenja aktivnosti kod biljaka divljeg tipa tretiranih UVB-zračenjem u odnosu na kontrolne biljke (Slika 6). Ta razlika nije bila uočena kod klijanaca drugih dviju linija. Stoga je moguće da UVB-stres u divljeg tipa uzrokuje povećanu aktivnost G-POD. Klijanci linije *oeBPM1* općenito imaju najvišu aktivnost G-POD u odnosu na druge dvije linije te se također može donijeti zaključak kako zbog povećane aktivnosti G-POD linija *oeBPM1* pokazuje niži sadržaj H_2O_2. Općenito su klijanci kontrolne skupine divljeg tipa pokazali najnižu aktivnost G-POD u odnosu na liniju *oeBPM1* i *amiR-bpm*. Kod linije *amiR-bpm* povišena aktivnost G-POD u odnosu na kontrolnu skupinu divljeg tipa vjerojatno je uzrokovana time da je viša razina ROS-ova u te linije jedno od njenih svojstava pa je u svrhu kontrole količine ROS-ova prisutna i povišena aktivnost G-POD. Rezultati mjerenja aktivnosti APX pokazali su kako između kontrolnih biljaka i biljaka tretiranih UVB-zračenjem nije bilo značajne razlike u aktivnosti niti kod jedne od triju linija (Slika 7). Klijanci linije divljeg tipa te klijanci linije *amiR-bpm* općenito su imali nižu aktivnost APX od klijanaca linije *oeBPM1*. Ovi rezultati također su u skladu s ranije opisanim opažanjima povišene aktivnosti koju pokazuju CAT i G-POD u linije *oeBPM1*. G-POD i APX, zbog većeg afiniteta za H_2O_2 u usporedbi s CAT, učinkovitije uklanjaju niže koncentracije H_2O_2 te je posljedično niska razina H_2O_2 rezultat povišene aktivnosti G-POD i APX (Erofeeva 2015). Nadalje, zanimljivo opažanje su niže aktivnosti CAT u usporedbi s aktivnosti G-POD i APX te da su aktivnosti ta dva enzima povišene kod linije *oeBPM1* koja je, kao što sam ranije spomenula, sadržavala najmanje H_2O_2. Naposljetku, mjerena je aktivnost i SOD, a rezultati su ukazali da je do povišenja aktivnosti došlo samo kod biljaka divljeg tipa tretiranih UVB-zračenjem u odnosu na kontrolne biljke (Slika 8). Također, klijanci divljeg tipa, linije *amiR-bpm* i linije *oeBPM1* općenito nisu pokazali značajnu razliku u aktivnosti SOD. Iako dobivena razlika nije bila statistički značajna, uočila sam da divlji tip pokazuje slabiju aktivnost SOD u odnosu na druge dvije linije. Važno je napomenuti kako postoji trend koji se ponavlja u rezultatima mjerenja aktivnosti antioksidacijskih enzima, a to je činjenica da kod većine mjerenih parametara nije bilo značajne razlike u aktivnosti enzima između klijanaca kontrolne skupine u odnosu na klijance skupine tretirane UVB-zračenjem svih triju linija. Time dolazim do zaključka da

UVB-zračenje u primijenjenoj dozi nije izazvalo značajno povećanu aktivnost enzima. Obzirom na to da je kod drugih fizioloških parametara ipak postignuta razlika između kontrolnih i tretiranih klijanaca, antioksidacijski sustav ne pokazuje veliku angažiranost u odgovoru na korištenu dozu UVB-zračenja, ali pokazuje razliku, u nekim slučajevima i značajnu razliku, između linija. Međutim, antioksidacijski enzimi u biljaka su uključeni u više mehanizama od same obrane od stresnih čimbenika. U višim biljkama CAT je uglavnom lokaliziran u mitohondrijima i mikrotjeleščima (Su i sur. 2014) gdje služi za razgradnju H_2O_2 koji nastaje u lancu prijenosa elektrona u mitohondriju te tijekom β-oksidacije masnih kiselina i fotorespiracije u glioksisomima odnosno peroksisomima. Također, budući da CAT nije prisutan u kloroplastima, APX ima ključnu ulogu razgradnje H_2O_2 u tom organelu (Madhusudhan i sur. 2003). Nadalje, G-POD je lokaliziran u apoplastima, citosolu, vakuoli i staničnoj stijenci (Uarrota i sur. 2016). U stanicama se SOD, slično kao CAT, nalazi na svim mjestima gdje se nalazi lanac prijenosa elektrona, što uključuje mitohondrije i kloroplaste, ali nalazimo ga i u peroksisomima, apoplastu i citosolu (Alscher i sur. 2002) gdje štiti stanice od potencijalnih posljedica uzrokovanih citotoksičnim superoksidnim radikalom katalizirajući njegovu pretvorbu u O_2 i H_2O_2 (Gill i sur. 2015).

Uzimajući u obzir da je fotosintetski sustav prvi na udaru abiotičkih stresnih čimbenika kao što su jaki intenzitet svjetlosti te UVB-zračenje, praćenje parametara koji ukazuju na promjene fotosintetskog aparata vrijedan su alat za procjenu utjecaja stresnih uvjeta na proces fotosinteze (Stirbet i sur. 2018). Parametri koje sam mjerila pomoću OJIP-testa opisuju glavna funkcionalna svojstva PSII pa samim time i utjecaj stresnog čimbenika na fotosintezu. Kao rezultat primjene OJIP-testa dobila sam više parametara od kojih je jedan indeks fotosintetske učinkovitosti (PI_{abs}) (Slika 9). Općenito rezultati nisu pokazali razlike u PI_{abs}-u između linija kao niti između kontrolne i tretirane skupine klijanaca. Također, osim PI_{abs}, mjerila sam i sljedeće parametre: maksimalni kvantni prinos fotosustava II (F_v/F_m), apsorpciju svjetlosti po aktivnom RC-u (ABS/RC), protok uhvaćenih fotona po aktivnom RC-u (TR_0/RC), prijenos elektrona po aktivnom RC-u (ET_0/RC), rasipanje energije po aktivnom RC-u (DI_0/RC) i gustoću aktivnih RC-a po osvijetljenoj površini lista (RC/CS_0) (Tablica 2). U većini ovih parametara dobiveni su slični rezultati kao za PI_{abs}, tj. nije bilo razlike između tretiranih i kontrolnih klijanaca kao niti između linija. Jedine razlike uočene su kod kontrolne skupine biljaka linije *oeBPM1* koja je pokazala viši F_v/F_m u odnosu na tretirane biljke iste linije te kod parametra RC/CS_0 koji je pokazao kako su biljke tretirane UVB-zračenjem linije *amiR-bpm* imale nižu gustoću aktivnih RC-a po osvijetljenoj površini lista u odnosu na divlji tip i liniju

oeBPM1. Budući da stresni uvjeti koji uzrokuju oštećenje fotosintetskog aparata uzrokuju smanjenje vrijednosti F_v/F_m (Strasser i sur. 2004), mogu pretpostaviti da je primijenjena doza UV-B zračenja takav učinak imala jedino u biljaka linije *oeBPM1*. Naime, na temelju ostalih mjerenih parametara teško je objasniti zašto je baš kod te linije smanjen maksimalni prinos PSII, tj. Vrijednost F_v/F_m. Ta je linija imala visoke aktivnosti antioksidacijskih enzima i manju količinu H_2O_2 pa je teško reći zašto je dobivena manja vrijednost F_v/F_m. Niža gustoća aktivnih RC-a po osvijetljenoj površini lista u linije *amiR-bpm* u odnosu na divlji tip i liniju *oeBPM1* mogla bi biti uzrokovana višom razinom H_2O_2 i lipidne peroksidacije u odnosu na preostale dvije linije. Za normalno funkcioniranje procesa fotosinteze vrlo su važne membrane i njihov integritet. Obzirom na to da je upravo u linije *amiR-bpm* povišen stupanj lipidne peroksidacije moguće je da je došlo do oštećenja tilakoidnih membrana. Nadalje, povišena razina H_2O_2, osim što može doprinijeti procesu lipidne peroksidacije, može i drugim mehanizmima doprinijeti oštećenju fotosintetskog aparata, što je posljedično moglo dovesti do niže gustoće aktivnih RC u listovima. Općeniti zaključak o svim rezultatima dobivenih OJIP-testom može biti da odabrana doza UVB-zračenja nije značajno narušila fotosintetsku učinkovitost u tretiranih biljaka.

Fiziološke promjene uzrokovane UVB-zračenjem uključuju utjecaj na sadržaj klorofila i karotenoida (Surabhi i sur. 2009) djelovanjem na enzime uključene u put biosinteze (Ranjbarfordoei i sur. 2011). Pojačano UVB-zračenje utječe na smanjenje sadržaja fotosintetskih pigmenta, uključujući klorofil *a*, klorofil *b* i karotenoide, a smanjenje sadržaja proporcionalno je povećanju intenziteta zračenja (Chu i Chen 2017). Po izlaganju klijanaca biljke *A. thaliana* UVB-zračenju, rezultati mjerenja udjela fotosintetskih pigmenata klorofila *a*, klorofila *b* te karotenoida između kontrolnih biljaka i biljaka tretiranih UVB-zračenjem općenito nisu pokazali značajnu razliku kod svake pojedine linije (Slike 10, 11 i 12). To ponovno može potvrditi ranije spomenuti zaključak kako upotrijebljena doza UVB-zračenja nije bila dovoljna kako bi imala utjecaj na udio fotosintetskih pigmenata. Klorofili su glavni pigmenti u zelenim biljkama, odgovorni za proces fotosinteze, te je razina klorofila dobar pokazatelj fotosintetske aktivnosti pa tako i fiziološkog stanja biljke (Xu i sur. 2008). Nadalje, usporedbom triju linija biljaka utvrdila sam da su klijanci kontrolne skupine biljaka divljeg tipa imali značajno niži udio klorofila *a* u odnosu na liniju *amiR-bpm*, dok linija *oeBPM1* nije imala značajno različiti udio u odnosu na druge dvije linije (Slika 10) te da su klijanci linije divljeg tipa tretirani UVB-zračenjem imali niži udio klorofila *a* u odnosu na druge dvije linije. Klijanci kontrolne skupine biljaka svih triju linija općenito nisu pokazali razliku u udjelu klorofila *b*,

dok su klijanci linije divljeg tipa koji su tretirani UVB-zračenjem pokazali značajno niži udio klorofila *b* u odnosu na druge dvije linije (Slika 11). U ovom slučaju, iako rezultati ne pokazuju statističku značajnost u razlikama količine pigmenata između kontrolnih i tretiranih biljaka, kod linije *oeBPM1* uočen je porast udjela klorofila *a* i *b* u klijanaca tretiranih UVB-zračenjem u odnosu na kontrolu. Nasuprot tome, linija *amiR-bpm* pokazala je pad udjela klorofila *a* i *b* kod klijanaca tretiranih UVB-zračenjem u odnosu na kontrolnu skupinu. Linija *oeBPM1* ovime ponovno pokazuje bolju toleranciju stresa od drugih dviju linija, iako razlika udjela pigmenata nije statistički značajna. Sljedeća skupina pigmenata su karotenoidi, koji imaju značajnu ulogu u uvjetima jakog svjetlosnog stresa i tijekom starenja (Merzlyak i Solovchenko 2002) pa se stoga u tim uvijetima njihova količina može povećati. U ovom istraživanju uočeno je da su klijanci kontrolne skupine biljaka divljeg tipa imali statistički značajno niži udio karotenoida u odnosu na liniju *amiR-bpm*, dok linija *oeBPM1* nije imala značajno različiti udio karotenoida u odnosu na druge dvije linije (Slika 12). Klijanci linije divljeg tipa tretirani UVB-zračenjem imali su statistički značajno niži udio karotenoida u odnosu na liniju *oeBPM1*, dok linija *amiR-bpm* nije imala značajno različiti udio karotenoida u odnosu na druge dvije linije. Svi ovi rezultati mjerenja fotosintetskih pigmenata pokazuju da postoji razlika u udjelu fotosintetskih pigmenata između linija te se općenito može uočiti kako dvije linije s promijenjenom ekspresijom gena *BPM* nakupljanju više pigmenata od linije divljeg tipa.

Već je do sada ustanovljeno kako je linija *oeBPM1* pokazala značajno bolji odgovor na UVB-stres u odnosu na divlji tip i liniju *amiR-bpm*. To je vidljivo na temelju nekih pokazatelja stresa gdje se ova linija razlikovala od druge dvije. Npr. niža razina H_2O_2, viša aktivnost antioksidacijskih enzima CAT, G-POD i APX, ali i niži maksimalni prinos PSII. Obzirom da je glavna razlika linije *oeBPM1* i linije *amiR-bpm* razina ekspresije gena *BPM1*, ukazuje na to da upravo protein BPM1 može doprinijeti odgovoru na UVB-zračenje. Budući da je degradacija proteina posredovana ubikvitinom uključena u regulaciju brojnih staničnih procesa, protein BPM kao sastavni dio tog mehanizma također sudjeluje u mehanizmima odgovora na stresne uvjete (Weber i Hellman 2009). Kako je pokazano u prvom dijelu ovog istraživanja, korištena doza UVB-zračenja utjecala je na pojačano nakupljanje proteina BPM1 (Slika 1A). Postoji mogućnost da je upravo to razlog zašto se kod većine mjerenih parametara pokazala značajna razlika upravo između različitih linija u odnosu na nedostatak razlike između kontrolnih i tretiranih biljaka. Ovaj trend primijećen je po mjerenju parametara stupnja lipidne peroksidacije, odnosno sadržaja MDA, sadržaja H_2O_2, aktivnosti antioksidacijskih enzima (CAT, G-POD i APX) te udjela fotosintetskih pigmenata. Još jedan od razloga

dobivene razlike između linija može biti i uočena pojava nakupljanja primarnih proizvoda stresa u linije *amiR-bpm*. Štoviše, ova linija nije pokazala značajnu razliku između kontrolnih i tretiranih klijanaca niti za jedan mjereni parametar, a razlog može biti što se već u kontrolnih biljaka pokazalo da su u stanju sličnom odgovoru biljaka na stres.

Najčešći zaštitni mehanizam protiv potencijalno štetnog UVB-zračenja je biosinteza spojeva koji apsorbiraju UV-zračenje (Hahlbrock i Scheel 1989). Kako bi se zaštitile od intenzivnog Sunčevog zračenja u čijem je sastavu i UVB dio spektra, biljke su razvile specifičan UVB-zračenjem aktiviran signalni put posredovan fotoreceptorom UVR8 koji regulira rast, razvoj i aklimatizaciju (Müller-Xing i sur. 2014). Prilikom interpretacije rezultata uočila sam kako za većinu parametara koje sam mjerila primijenjena doza UVB-zračenja nije bila dovoljna da izazove statistički značajne promjene. Nadalje, takvom rezultatu je moglo doprinijeti i odabrano vrijeme inkubacije (1 sat), tj. vrijeme proteklo od izlaganju klijanaca UVB-zračenju do prikupljanja uzoraka za pokus. Dobra nadogradnja na ovo istraživanje bilo bi utvrditi utjecaj šireg spektra jačina doza kao i vremena inkubacije biljaka po izlaganju UVB-zračenju. Naime, vrijeme inkubacije po tretmanu može imati značajan utjecaj na rezultate s obzirom da se nakon izlaganja biljaka UVB-zračenju očekuje djelovanje posljedica stresnih uvjeta (npr. nastanak oštećenja ROS-ovima produciranim pri djelovanju UV-zračenja) kao i oporavak biljaka uslijed aktivacije različitih mehanizama odgovora na stresne čimbenike. Stoga su dobiveni rezultati mjerenja pojedinih parametara uvijek odraz složenih mehanizama koji se u biljkama odvijaju nakon djelovanja stresnih uvjeta, a ovise o primijenjenoj jačini stresa, duljini djelovanja, trajanju oporavka te također i razvojnoj fazi biljke u vrijeme djelovanja stresa.

6. Zaključak

Ovim radom istražila sam učinak UVB-zračenja na klijance uročnjaka, *Arabidopsis thaliana* usporedbom kontrolnih i tretiranih biljaka divljeg tipa te linija *oeBPM1* i *amiR-bpm.* Također, utvrdila sam razliku u odgovoru na stres biljaka divljeg tipa i linija s promijenjenom ekspresijom gena *BPM* (*oeBPM1* i *amiR-bpm*).

Primjenom triju različitih doza UVB-zračenja na liniju biljaka s pojačanom ekspresijom gena *BPM1* (*oeBPM1*) i imunodetekcijom proteina BPM1-GFP utvrđeno je kako doza od ~800 J cm^{-2} uzrokuje najveće nakupljanje proteina BPM1-GFP.

Doza UVB-zračenja od ~800 J cm^{-2} primijenjena na klijance *A. thaliana* divljeg tipa (wt), linije s pojačanom ekspresijom gena *BPM1* (*oeBPM1*) te linije sa smanjenom ekspresijom gena *BPM* (*amiR-bpm*) nije imala značajan učinak na većinu izmjerenih pokazatelja odgovora na stres u usporedbi s kontrolnim biljkama.

Veću razliku u odgovoru na stres uočila sam usporedbom istraživanih linija. Linija *oeBPM1* pokazala je bolji odgovor na stres u odnosu na divlji tip i liniju *amiR-bpm* zbog izrazitije aktivacije antioksidacijskih enzima. Linija *amiR-bpm* imala je višu razinu H_2O_2 i lipidne peroksidacije u odnosu na divlji tip i liniju *oeBPM1*. U klijanaca divljeg tipa izloženih UVB-zračenju uočena je niža količina klorofila u odnosu na linije s promijenjenom ekspresijom gena *BPM*.

Dobivene razlike u odgovoru na stres u divljeg tipa te linija *oeBPM1* i *amiR-bpm*, koje se međusobno razlikuju u ekspresiji gena *BPM*, ukazuju da je moguća uključenost proteina BPM1 u odgovor na UVB-zračenje.

7. Literatura

Aebi, H. (1984). Catalase in vitro. Methods in Enzymology, **105**, 121-126.

Alscher, R. G., Erturk, N. i Heath, L. S. (2002). Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. Journal of Experimental Botany, **53**(372), 1331-1341.

Anjum, N. A., Sharma, P., Gill, S. S., Hasanuzzaman, M., Khan, E. A., Kachhap, K., Mohamed, A. A., Thangavel, P., Devi, G. D., Vasudhevan, P. i Sofo, A. (2016). Catalase and ascorbate peroxidase-representative H_2O_2-detoxifying heme enzymes in plants. Environmental Science and Pollution Research, **23**(19), 19002-19029.

Apel, K. i Hirt, H. (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. Annual Review of Plant Biology, **55**, 373-399.

Arora, A., Sairam, R. K. i Srivastava, G. C. (2002). Oxidative stress and antioxidative system in plants. Current Science, **82**(10),1227-1238.

Ballaré, C. L., Caldwell, M. M., Flint, S. D., Robinson, S. A. i Bornman, J. F. (2011). Effects of solar ultraviolet radiation on terrestrial ecosystems. Patterns, mechanisms, and interactions with climate change. Photochemical & Photobiological Sciences, **10**(2), 226-241.

Bates, L. S., Waldren, R. P. i Teare, I. D. (1973). Rapid determination of free proline for water stress studies. Plant and Soil, **39**(1), 205-207.

Beauchamp, C. i Fridovich, I. (1971). Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. Analytical Biochemistry, **44**(1), 276-287.

Benikhlef, L., L'Haridon, F., Abou-Mansour, E., Serrano, M., Binda, M., Costa, A., Lehmann, S. i Métraux, J. (2013). Perception of soft mechanical stress in *Arabidopsis* leaves activates disease resistance. BMC Plant Biology, **13**(1), 133.

Blokhina, O., Virolainen, E. i Fagerstedt, K. V. (2003). Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. Annals of Botany, **91**(2), 179-194.

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.

Britton, G. (1995). Structure and properties of carotenoids in relation to function. The FASEB Journal, **9**(15), 1551-1558.

Brown, B. A. i Jenkins, G. I. (2008). UV-B signaling pathways with different fluence-rate response profiles are distinguished in mature *Arabidopsis* leaf tissue by requirement for UVR8, HY5, and HYH. Plant Physiology, **146**(2), 576-588.

Buchanan, B., Gruissem, W. i Jones, R. (2015). Biochemistry and Molecular Biology of Plants, 2nd Edition. John Wiley and Sons, Chichester.

Casati, P. i Walbot, V. (2004). Rapid transcriptome responses of maize (*Zea mays*) to UV-B in irradiated and shielded tissues. Genome Biology, **5**(3), 1-19.

Casati, P., Morrow, D. J., Fernandes, J. i Walbot, V. (2011). UV-B signaling in maize: transcriptomic and metabolomic studies at different irradiation times. Plant Signaling & Behavior, **6**(12), 1926-1931.

Catalá, A. (2006). An overview of lipid peroxidation with emphasis in outer segments of photoreceptors and the chemiluminescence assay. The International journal of Biochemistry & Cell Biology, **38**(9), 1482-1495.

Caverzan, A., Passaia, G., Rosa, S. B., Ribeiro, C. W., Lazzarotto, F. i Margis-Pinheiro, M. (2012). Plant responses to stresses: role of ascorbate peroxidase in the antioxidant protection. Genetics and Molecular Biology, **35**(4), 1011-1019.

Chance, B. i Maehly, A. C. (1955). Assay of catalases and peroxidases. Methods in Enzymology, **136**, 764-755.

Chen, L. i Hellmann, H. (2013). Plant E3 ligases: flexible enzymes in a sessile world. Molecular Plant, **6**, 1388-1404.

Chen, L., Bernhardt, A., Lee, J. i Hellmann, H. (2015). Identification of *Arabidopsis* MYB56 as a novel substrate for CRL3BPM E3 ligases. Molecular Plant, **8**, 242-250.

Choudhury, F. K., Rivero, R. M., Blumwald, E. i Mittler, R. (2017). Reactive oxygen species, abiotic stress and stress combination. The Plant Journal, **90**(5), 856-867.

Christie, J. M., Arvai, A. S., Baxter, K. J., Heilmann, M., Pratt, A. J., O'Hara, A., Kelly, S. M., Hothorn, M., Smith, B. O., Hitomi, K., Jenkins, G. I. i Getzoff, E. D. (2012). Plant UVR8

photoreceptor senses UV-B by tryptophan-mediated disruption of cross-dimer salt bridges. Science, **335**(6075), 1492-1496.

Chu, R. i Chen, N. L. (2017). Effects of enhanced UV-B radiation on photosynthetic physiology and chloroplast ultrastructure of *Phragmites australis*. Journal of Applied Ecology, **28**(11), 3515-3520.

Cooley, N. M., Holmes, M. G. i Attridge, T. H. (2000). Growth and stomatal responses of temperate meadow species to enhanced levels of UV-A and UV-B+ A radiation in the natural environment. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, **57**(2-3), 179-185.

Davies, K. J. (2000). Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems. IUBMB Life, **50**(4-5), 279-289.

Demidchik, V. (2015). Mechanisms of oxidative stress in plants: from classical chemistry to cell biology. Environmental and Experimental Botany, **109**, 212-228.

Edge, R., McGarvey, D. J. i Truscott, T. G. (1997). The carotenoids as anti-oxidants - a review. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, **41**(3), 189-200.

Erofeeva, E. A. (2015). Dependence of guaiacol peroxidase activity and lipid peroxidation rate in drooping birch (*Betula pendula* Roth) and tillet (*Tilia cordata* Mill) leaf on motor traffic pollution intensity. Dose-Response, **13**(2), 1-6.

Falcone Ferreyra, M. L., Rius, S., Emiliani, J., Pourcel, L., Feller, A., Morohashi, K., Casati, P. i Grotewold, E. (2010). Cloning and characterization of a UV-B-inducible maize flavonol synthase. The Plant Journal, **62**(1), 77-91.

Freeman, B. i Beattie, G. (2008). An overview of plant defenses against pathogens and herbivores. The Plant Health Instructor. DOI: 10.1094/PHI-I-2008-0226-01

Frohnmeyer, H. i Staiger, D. (2003). Ultraviolet-B radiation-mediated responses in plants. Balancing damage and protection. Plant Physiology, **133**(4), 1420-1428.

Fujita, M., Fujita, Y., Noutoshi, Y., Takahashi, F., Narusaka, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K. i Shinozaki, K. (2006). Crosstalk between abiotic and biotic stress responses: a current view from the points of convergence in the stress signaling networks. Current Opinion in Plant Biology, **9**(4), 436-442.

Garg, N. i Manchanda, G. (2009). ROS generation in plants: boon or bane? Plant Biosystems, **143**(1), 81-96.

Genschik, P., Sumara, I., Lechner, E. (2013). The emerging family of CULLIN3-RING ubiquitin ligases (CRL3s): cellular functions and disease implications. The EMBO Journal, **32**(17), 2307-2320.

Gill, S. S. i Tuteja, N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. Plant Physiology and Biochemistry, **48**(12), 909-930.

Gill, S. S., Anjum, N. A., Gill, R., Yadav, S., Hasanuzzaman, M., Fujita, M., Mishara, P., Sabat, S. C. i Tuteja, N. (2015). Superoxide dismutase - mentor of abiotic stress tolerance in crop plants. Environmental Science and Pollution Research, **22**(14), 10375-10394.

Hahlbrock, K. i Scheel, D. (1989). Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism. Annual Review of Plant Biology, **40**(1), 347-369.

Hare, P. D. i Cress, W. A. (1997). Metabolic implications of stress-induced proline accumulation in plants. Plant Growth Regulation, **21**(2), 79-102.

Havaux, M. (2014). Carotenoid oxidation products as stress signals in plants. The Plant Journal, **79**(4), 597-606.

Hayat, S., Hayat, Q., Alyemeni, M. N., Wani, A. S., Pichtel, J. i Ahmad, A. (2012). Role of proline under changing environments: a review. Plant Signaling and Behavior, **7**(11), 1456-1466.

Hideg, É., Jansen, M. A. i Strid, Å. (2013). UV-B exposure, ROS, and stress: inseparable companions or loosely linked associates? Trends in Plant Science, **18**(2), 107-115.

Hodges, D. M., DeLong, J. M., Forney, C. F. i Prange, R. K. (1999). Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. Planta, **207**(4), 604-611.

Hollósy, F. (2002). Effects of ultraviolet radiation on plant cells. Micron, **33**(2), 179-197.

Jebara, S., Jebara, M., Limam, F. i Aouani, M. E. (2005). Changes in ascorbate peroxidase, catalase, guaiacol peroxidase and superoxide dismutase activities in common bean (*Phaseolus vulgaris*) nodules under salt stress. Journal of Plant Physiology, **162**(8), 929-936.

Jenkins, G. I. (2009). Signal transduction in responses to UV-B radiation. Annual Review of Plant Biology, **60**, 407-431.

Kapoor, D., Singh, S., Kumar, V., Romero, R., Prasad, R. i Singh, J. (2019). Antioxidant enzymes regulation in plants in reference to reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS). Plant Gene, **19**, 100182.

Kataria, S., Jajoo, A. i Guruprasad, K. N. (2014). Impact of increasing ultraviolet-B (UV-B) radiation on photosynthetic processes. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, **137**, 55-66.

Koornneef, M. i Meinke, D. (2010). The development of *Arabidopsis* as a model plant. The Plant Journal, **61**(6), 909-921.

Kravets, E. A., Zelena, L. B., Zabara, E. P. i Blume, Y. B. (2012). Adaptation strategy of barley plants to UV-B radiation. Emirates Journal of Food & Agriculture (EJFA), **24**(6), 632-645.

Küpper, H., Benedikty, Z., Morina, F., Andresen, E., Mishra, A. i Trtílek, M. (2019). Analysis of OJIP chlorophyll fluorescence kinetics and QA reoxidation kinetics by direct fast imaging. Plant Physiology, **179**(2), 369-381.

Laemmli, U. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, **227**(5259), 680-685.

Lechner, E., Leonhardt, N., Eisler, H., Parmentier, Y., Alioua, M., Jacquet, H., Leung, J. i Genschik, P. (2011). MATH/BTB CRL3 receptors target the homeodomain-leucine zipper ATHB6 to modulate abscisic acid signaling. Developmental Cell, **21**(6), 1116-1128.

Li, J., Yang, L., Jin, D., Nezames, C. D., Terzaghi, W. i Deng, X. W. (2013). UV-B-induced photomorphogenesis in *Arabidopsis*. Protein & Cell, **4**(7), 485-492.

Lichtenthaler, H. K. i Babani, F. (2000). Detection of photosynthetic activity and water stress by imaging the red chlorophyll fluorescence. Plant Physiology and Biochemistry, **38**(11), 889-895.

Madhusudhan, R., Ishikawa, T., Sawa, Y., Shigeoka, S. i Shibata, H. (2003). Characterization of an ascorbate peroxidase in plastids of tobacco BY-2 cells. Physiologia Plantarum, **117**(4), 550-557.

Mafakheri, A., Siosemardeh, A., Bahramnejad, B., Struik, P. C. i Sohrabi, Y. (2011). Effect of drought stress and subsequent recovery on protein, carbohydrate contents, catalase and peroxidase activities in three chickpea (*Cicer arietinum*) cultivars. Australian Journal of Crop Science, **5**, 1255-1260.

Maggio, A., Miyazaki, S., Veronese, P., Fujita, T., Ibeas, J. I., Damsz, B., Narasimhan, M. L., Hasegawa, P. M., Joly, R. J. i Bressan, R. A. (2002). Does proline accumulation play an active role in stress-induced growth reduction? The Plant Journal, **31**(6), 699-712.

Martínez-Lüscher, J., Morales, F., Delrot, S., Sánchez-Díaz, M., Gomès, E., Aguirreolea, J. i Pascual, I. (2013). Short-and long-term physiological responses of grapevine leaves to UV-B radiation. Plant Science, **213**, 114-122.

Mátai, A. i Hideg, É. (2017). A comparison of colorimetric assays detecting hydrogen peroxide in leaf extracts. Analytical Methods, **9**(15), 2357-2360.

Matamoros, M. A., Dalton, D. A., Ramos, J., Clemente, M. R., Rubio, M. C. i Becana, M. (2003). Biochemistry and molecular biology of antioxidants in the rhizobia-legume symbiosis. Plant Physiology, **133**(2), 499-509.

Mattioli, R., Costantino, P. i Trovato, M. (2009). Proline accumulation in plants: not only stress. Plant Signaling & Behavior, **4**(11), 1016-1018.

McKenzie, R. L., Aucamp, P. J., Bais, A. F., Björn, L. O., Ilyas, M. i Madronich, S. (2011). Ozone depletion and climate change: impacts on UV radiation. Photochemical & Photobiological Sciences, **10**(2), 182-198.

Meinke, D. W., Cherry, J. M., Dean, C., Rounsley, S. D. i Koornneef, M. (1998). *Arabidopsis thaliana*: a model plant for genome analysis. Science, **282**(5389), 662-682.

Merzlyak, M. N. i Solovchenko, A. E. (2002). Photostability of pigments in ripening apple fruit: a possible photoprotective role of carotenoids during plant senescence. Plant Science, **163**(4), 881-888.

Mittler, R. (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. Trends in Plant Science, **7**(9), 405-410.

Miyake, C. i Asada, K. (1992). Thylakoid-bound ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts and photoreduction of its primary oxidation product monodehydroascorbate radicals in thylakoids. Plant and Cell Physiology, **33**(5), 541-553.

Moan, J. (2001). Visible light and UV radiation. U: Brune, D., Hellborg, R., Persson, B. R. i Pääkkönen, R. (ur.) Radiation at home, outdoors and in the workplace. Scandinavian Science Publisher, str. 69-85.

Moran, J. F., James, E. K., Rubio, M. C., Sarath, G., Klucas, R. V. i Becana, M. (2003). Functional characterization and expression of a cytosolic iron-superoxide dismutase from cowpea root nodules. Plant Physiology, **133**(2), 773-782.

Morimoto, K., Ohama, N., Kidokoro, S., Mizoi, J., Takahashi, F., Todaka, D., Mogami, J., Sato, H., Quin, F., Kim, J-S., Fukao, Y., Fujiwara, M., Shinozaki, K. i Yamaguchi-Shinozaki, K. (2017). BPM-CUL3 E3 ligase modulates thermotolerance by facilitating negative regulatory domain-mediated degradation of DREB2A in *Arabidopsis*. Proceedings of the National Academy of Sciences, **114**, E8528-E8536.

Müller-Xing, R., Xing, Q. i Goodrich, J. (2014). Footprints of the sun: memory of UV and light stress in plants. Frontiers in Plant Science, **5**, 474-760.

Murashige, T. i Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum, **15**(3), 473-479.

Nakano, Y. i Asada, K. (1981). Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. Plant and Cell Physiology, **22**(5), 867-880.

Noctor, G., Lelarge-Trouverie, C. i Mhamdi, A. (2015). The metabolomics of oxidative stress. Phytochemistry, **112**, 33-53.

Oravecz, A., Baumann, A., Máté, Z., Brzezinska, A., Molinier, J., Oakeley, E. J., Schäfer, E., Nagy, F. i Ulm, R. (2006). CONSTITUTIVELY PHOTOMORPHOGENIC 1 is required for the UV-B response in *Arabidopsis*. The Plant Cell, **18**(8), 1975-1990.

Pintard, L., Willis, J. H., Willems, A., Johnson, J. L. F., Srayko, M., Kurz, T., Glaser, S., Mains, P. E., Tyers, M., Bowerman, B. i Peter, M. (2003). The BTB protein MEL-26 is a substrate-specific adaptor of the CUL-3 ubiquitin-ligase. Nature, **425**(6955), 311-316.

Pontin, M. A., Piccoli, P. N., Francisco, R., Bottini, R., Martinez-Zapater, J. M. i Lijavetzky, D. (2010). Transcriptome changes in grapevine (*Vitis vinifera* L.) cv. Malbec leaves induced by ultraviolet-B radiation. BMC Plant Biology, **10**(1), 1-13.

Quan, L. J., Zhang, B., Shi, W. W. i Li, H. Y. (2008). Hydrogen peroxide in plants: a versatile molecule of the reactive oxygen species network. Journal of Integrative Plant Biology, **50**(1), 2-18.

Ranjbarfordoei, A., Samson, R. i Van Damme, P. (2011). Photosynthesis performance in sweet almond [*Prunus dulcis* (Mill) D. Webb] exposed to supplemental UV-B radiation. Photosynthetica, **49**(1), 107.

Rizzini, L., Favory, J. J., Cloix, C., Faggionato, D., O'Hara, A., Kaiserli, E., Baumeister, R., Schäfer, E., Nagy, F., Jenkins, G. I. i Ulm, R. (2011). Perception of UV-B by the *Arabidopsis* UVR8 protein. Science, **332**(6025), 103-106.

Shinkle, J. R., Edwards, M. C., Koenig, A., Shaltz, A. i Barnes, P. W. (2010). Photomorphogenic regulation of increases in UV-absorbing pigments in cucumber (*Cucumis sativus*) and *Arabidopsis thaliana* seedlings induced by different UV-B and UV-C wavebands. Physiologia Plantarum, **138**(1), 113-121.

Siripornadulsil, S., Traina, S., Verma, D. P. S. i Sayre, R. T. (2002). Molecular mechanisms of proline-mediated tolerance to toxic heavy metals in transgenic microalgae. The Plant Cell, **14**(11), 2837-2847.

Smirnoff, N. i Arnaud, D. (2019). Hydrogen peroxide metabolism and functions in plants. New Phytologist, **221**(3), 1197-1214.

Solovchenko, A. i Neverov, K. (2017). Carotenogenic response in photosynthetic organisms: a colorful story. Photosynthesis Research, **133**(1-3), 31-47.

Stirbet, A. (2011). On the relation between the Kautsky effect (chlorophyll *a* fluorescence induction) and photosystem II: basics and applications of the OJIP fluorescence transient. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, **104**(1-2), 236-257.

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. i Govindjee (ur.) Chlorophyll *a* Fluorescence. Advances in Photosynthesis and Respiration **19**. Springer, Dordrecht, str. 321-362.

Su, Y., Guo, J., Ling, H., Chen, S., Wang, S., Xu, L., Allan, A. C. i Que, Y. (2014). Isolation of a novel peroxisomal catalase gene from sugarcane, which is responsive to biotic and abiotic stresses. PLoS One, **9**(1), e84426.

Sullivan, J. H., Gitz, D. C., Peek, M. S. i McElrone, A. J. (2003). Response of three eastern tree species to supplemental UV-B radiation: leaf chemistry and gas exchange. Agricultural and Forest Meteorology, **120**(1-4), 219-228.

Sunkar, R., Bartels, D. i Kirch, H. H. (2003). Overexpression of a stress-inducible aldehyde dehydrogenase gene from *Arabidopsis thaliana* in transgenic plants improves stress tolerance. The Plant Journal, **35**(4), 452-464.

Surabhi, G. K., Reddy, K. R. i Singh, S. K. (2009). Photosynthesis, fluorescence, shoot biomass and seed weight responses of three cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) cultivars with contrasting sensitivity to UV-B radiation. Environmental and Experimental Botany, **66**(2), 160-171.

Surplus, S. L., Jordan, B. R., Murphy, A. M., Carr, J. P., Thomas, B. i Mackerness, S. H. (1998). Ultraviolet-B-induced responses in *Arabidopsis thaliana*: role of salicylic acid and reactive oxygen species in the regulation of transcripts encoding photosynthetic and acidic pathogenesis-related proteins. Plant, Cell & Environment, **21**(7), 685-694.

Suzuki, N., Rivero, R. M., Shulaev, V., Blumwald, E. i Mittler, R. (2014). Abiotic and biotic stress combinations. New Phytologist, **203**(1), 32-43.

Sztatelman, O., Grzyb, J., Gabryś, H. i Banaś, A. K. (2015). The effect of UV-B on *Arabidopsis* leaves depends on light conditions after treatment. BMC Plant Biology, **15**(1), 1-16.

Škiljaica, A., Lechner, E., Jagić, M., Majsec, K., Malenica, N., Genschik, P. i Bauer, N. (2020). The protein turnover of *Arabidopsis* BPM1 is involved in regulation of flowering time and abiotic stress response. Plant Molecular Biology, **102**(4-5), 359-372.

Taiz, L. i Zeiger, E. (2010). Plant Physiology, 5th Edition. Sinauer Associates Inc. Publishers, Massachusetts.

Teixeira, F. K., Menezes-Benavente, L., Margis, R. i Margis-Pinheiro, M. (2004). Analysis of the molecular evolutionary history of the ascorbate peroxidase gene family: inferences from the rice genome. Journal of Molecular Evolution, **59**(6), 761-770.

Uarrota, V. G., Moresco, R., Schmidt, E. C., Bouzon, Z. L., da Costa Nunes, E., de Oliveira Neubert, E., Peruch, L. A. M., Rocha, M. i Maraschin, M. (2016). The role of ascorbate peroxidase, guaiacol peroxidase, and polysaccharides in cassava (*Manihot esculenta* Crantz) roots under postharvest physiological deterioration. Food Chemistry, **197**, 737-746.

Verbruggen, N. i Hermans, C. (2008). Proline accumulation in plants: a review. Amino Acids, **35**(4), 753-759.

Weber, H. (2010). Charakterisierung der BTB-MATH Proteinfamilie in *Arabidopsis thaliana*. Berlin: Free University of Berlin. str. 160.

Weber, H. i Hellman, H. (2009). *Arabidopsis thaliana* BTB/POZ-MATH proteins interact with members of the ERF/AP2 transcription factor family. FEBS Journal, **276**(22), 6624-6635.

Weigel, D. i Mott, R. (2009). The 1001 genomes project for *Arabidopsis thaliana*. Genome Biology, **10**(5), 107.

Wellburn, A. (1994). The spectral determination of chlorophylls *a* and *b*, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. Journal of Plant Physiology, **144**(3), 307-313.

Willekens, H., Inzé, D., Van Montagu, M. i van Camp, W. (1995). Catalases in plants. Molecular Breeding, **1**(3), 207-228.

Xu, X., Xu, H., Wang, Y., Wang, X., Qiu, Y. i Xu, B. (2008). The effect of salt stress on the chlorophyll level of the main sand-binding plants in the shelterbelt along the Tarim Desert Highway. Chinese Science Bulletin, **53**(2), 109-111.

Yi, C. i Deng, X. W. (2005). COP1 - from plant photomorphogenesis to mammalian tumorigenesis. Trends in Cell Biology, **15**(11), 618-625.

Yin, R. i Ulm, R. (2017). How plants cope with UV-B: from perception to response. Current Opinion in Plant Biology, **37**, 42-48.

Yu, G. H., Li, W., Yuan, Z. Y., Cui, H. Y., Lv, C. G., Gao, Z. P., Han. B. i Chen, G. X. (2013). The effects of enhanced UV-B radiation on photosynthetic and biochemical activities in super-high-yield hybrid rice *Liangyoupeijiu* at the reproductive stage. Photosynthetica, **51**(1), 33-44.

Zhang, H., Wang, J., Allen, R. D. i Goodman, H. M. (1997). Cloning and expression of an *Arabidopsis* gene encoding a putative peroxisomal ascorbate peroxidase. Plant Molecular Biology, **34**(6), 967-971.

Zhu, J. K. (2016). Abiotic stress signaling and responses in plants. Cell, **167**(2), 313-324.

8. Životopis

Rođena sam u Zagrebu gdje sam završila OŠ Antuna Branka Šimića te nakon toga pohađala V. gimnaziju, smjer opća gimnazija. Tijekom svog boravka u gimnaziji sudjelovala sam na školskom pa nakon toga i državnom natjecanju iz biologije. Godine 2014. na natjecanju u Šibeniku osvojila sam prvo mjesto u kategoriji istraživačkog projekta.

Godine 2015. upisala sam Preddiplomski sveučilišni studij Molekularne biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Akademski naziv sveučilišne prvostupnice molekularne biologije stekla sam 2019. godine nakon čega sam upisala Diplomski sveučilišni studij Molekularne biologije na istom fakultetu. Tijekom studija odradila sam dvije laboratorijske stručne prakse, jednu na Botaničkom zavodu pod vodstvom prof. dr. sc. Željke Vidaković-Cifrek, a drugu na Zavodu za molekularnu biologiju pod vodstvom prof. dr. sc. Dunje Leljak-Levanić. Također, za vrijeme studije sudjelovala sam u manifestacijama Dan i noć na PMF-u.