

Procjena tolerancije varijeteta divljeg kupusa (*Brassica incana*) na čimbenike abiotičkog stresa

Baotić, Krunoslav

Master's thesis / Diplomski rad

2023

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:501765>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-31**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Krunoslav Baotić

**Procjena tolerancije varijeteta divljeg kupusa
(*Brassica incana*) na čimbenike
abiotičkog stresa**

Diplomski rad

Zagreb, 2023.

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Krunoslav Baotić

**Evaluation of wild cabbage (*Brassica incana*)
varieties tolerance to abiotic stress factors**

Master thesis

Zagreb, 2023.

Ovaj rad je izrađen u Laboratoriju za kemijsku biologiju, Zavodu za molekularnu biologiju Instituta Ruđer Bošković i na Zavodu za molekularnu biologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu, pod mentorstvom dr. sc. Branke Salopek Sondi, te komentorstvom prof. dr. sc. Martine Šeruge Musić u sklopu projekta „Agrobioraznolikost – osnova za prilagodbu i ublažavanje posljedica klimatskih promjena u poljoprivredi“. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra molekularne biologije.

Zahvale

Najprije se zahvaljujem svojoj mentorici dr. sc. Branki Salopek Sondi na svom znanju, pomoći, dostupnosti i savjetima koje je podijelila sa mnom tijekom izrade diplomskog rada. Veliko hvala i mojoj komentorici prof. dr. sc. Martini Šerugi Musić na pomoći, srdačnosti i brojnim savjetima.

Bez tako dobre mentorice i komentorice sve bi bilo dosta teže!

Također, velike zahvale idu i dr.sc. Ivi Orehovec koja je bila uz mene tijekom provedbe biokemijskih mjerenja za ovaj diplomski rad. Hvala Iva za veliku količinu strpljenja, prijateljske razgovore i nesebično prenošenje znanja. Veliko hvala i svim članovima Laboratorija za kemijsku biologiju Instituta Ruđer Bošković na nesebičnoj pomoći kad god je to trebalo.

Zahvaljujem se i izv. prof. dr. sc. Nataši Bauer s kojom sam prolazio analizu genske ekspresije. Od nje sam mnogo toga naučio kako tijekom diplomskog studija tako i tijekom izrade diplomskog rada. Vjerujem da će mi svi ovi savjeti dobro doći u razvoju daljnje karijere.

Na kraju zahvaljujem svojim roditeljima, mami Marini i tati Nenadu, na nesebičnoj ljubavi i podršci bez kojih sve ovo ne bi bilo moguće. Također, zahvaljujem se i svojim sestrama, zetovima, svoj rodbini i prijateljima koji su bili uvijek uz mene i omogućili mi da postanem ono što želim biti.

Kroz fakultetsko obrazovanje sam upoznao mnogo prijatelja s kojima sam stvorio more lijepih uspomena i takve dane ne bih nizašto mijenjao. Hvala i mojem najboljem prijatelju i cimeru Dominiku na svim savjetima, razgovorima, druženjima i ispijenim kavama tijekom svih ovih godina.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

Procjena tolerancije varijeteta divljeg kupusa (*Brassica incana*) na čimbenike abiotičkog stresa

Krunoslav Baotić

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Klimatske promjene i s njima često povezan abiotički stres imaju vrlo značajan utjecaj na rast i razvoj biljaka. Za suočavanje s nepovoljnim uvjetima u okolišu biljke koriste različite strategije i mehanizme kako bi smanjile njihov negativan učinak. U ovom istraživanju ispitano je šest varijeteta divljih kupusa (*Brassica incana*) koji prirodno rastu na liticama hrvatskih otoka u izuzetno nepovoljnim uvjetima. Klijanci uzgajani na 1 %-tnom agaru bili su podvrgnuti solnom (100 mM NaCl), osmotskom (200 mM manitol) i temperaturnom (maksimum na 40 °C) stresu, te kombinaciji navedenih vrsta stresova. Dobiveni rezultati uspoređeni su s tri varijeteta, morfološki vrlo slične, raštike (*Brassica acephala* var. *capitata*) koji su tretirani na isti način kao i divlji kupus. Odgovor biljaka na stres pratio sam testom inhibicije rasta te mjerenjem biokemijskih markera stresa. Na osnovu dobivenih rezultata odabrao sam dva varijeteta divljeg kupusa i dva varijeteta raštike na kojima sam dodatno, pomoću metode qPCR, pratio ekspresiju gena (*NAC041*, *NAC084* i *DREB2A*) uključenih u odgovoru biljaka na stres. Temperaturni tretman je kod mjerenja biomase imao najmanji utjecaj na rast i razvoj, dok je najveće smanjenje uzrokovao osmotski stres. Kod divljeg kupusa je na svim tretmanima, a posebno na solnom i osmotskom, zapaženo povećanje sadržaja prolina. Različiti varijeteti divljih kupusa pokazali su različite antioksidativne odgovore na svakom tretmanu, dok se razina malondialdehida (MDA) u najviše slučajeva povećavala kod solnog stresa. Povećana akumulacija ukupnih fenola u divljih kupusa zabilježena je kod solnog i osmotskog stresa. Tretmani koji su uključivali temperaturu su u najvećem broju slučajeva uzrokovali povećanu ekspresiju gena *NAC*, a ekspresija gena *DREB2A* bila je zabilježena na svim tretmanima što opravdava njegovu ulogu u otpornosti na stres.

Ključne riječi: biokemijski markeri, solni stres, osmotski stres, temperaturni stres, kombinirani abiotički stres, ekspresije gena

(67 stranica, 22 slike, 7 tablica, 44 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Mentor: dr.sc. Branka Salopek Sondi

Komentor: prof. dr. sc. Martina Šeruga Musić

Ocjenitelji: prof. dr. sc. Martina Šeruga Musić

prof. dr. sc. Sandra Radić Brkanac

prof. dr. sc. Maja Matulić

Rad prihvaćen: 07. 09. 2023.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Master thesis

Evaluation of wild cabbage (*Brassica incana*) varieties tolerance to abiotic stress factors

Krunoslav Baotić

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Climate changes and the often associated abiotic stress have a very significant impact on the growth and development of plants. To cope with adverse environmental conditions, plants use different strategies and mechanisms to reduce their impact. In this research, six varieties of wild cabbage (*Brassica incana*) that grow naturally on the cliffs of Croatian islands in extremely unfavorable conditions were examined. Seedlings grown on 1% agar were subjected to salt (100 mM NaCl), osmotic (200 mM mannitol) and temperature (maximum at 40 °C) stress, as well as a combination of these types of stress. The obtained results were compared with three varieties, morphologically very similar, kale (*Brassica acephala* var. *capitata*) which were treated in the same way as wild cabbage. I monitored the plants response to stress with a growth inhibition test and by measuring biochemical markers of stress. Based on the obtained results, I selected two varieties of wild cabbage and two varieties of kale on which I additionally monitored the expression of the stress responsive genes (*NAC041*, *NAC084* and *DREB2A*) by using PCR. Temperature treatment had the least impact on biomass measurement, while osmotic stress caused the strongest reduction. In wild cabbage, an increase in proline content was observed in all treatments, particularly salinity and osmotic stress. Different varieties of wild cabbage showed different antioxidative responses to each treatment, while the level of malondialdehyde (MDA) increased in most cases under salt stress. Increased accumulation of total phenols in wild cabbage was recorded under salt and osmotic stress. Treatments that included temperature caused increased *NAC* gene expression in most cases, and *DREB2A* gene expression was recorded in all treatments, which justifies its role in stress resistance.

Keywords: biochemical markers, salinity stress, osmotic stress, heat stress, combined abiotic stress, gene expression

(67 pages, 22 figures, 7 tables, 44 references, original in: Croatian)

Thesis is deposited in Central Biological Library.

Mentor: Branka Salopek Sondi, PhD

Co-mentor: Prof. Martina Šeruga Musić, PhD

Reviewers: Prof. Martina Šeruga Musić, PhD

Prof. Sandra Radić Brkanac, PhD

Prof. Maja Matulić, PhD

Thesis accepted: September 7th, 2023.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Utjecaj klimatskih promjena na biljni svijet	1
1.1.1. Temperaturni stres	3
1.1.2. Solni stres.....	4
1.1.3. Sušni stres	5
1.1.4. Kombinirani abiotički stres.....	6
1.2. Krstašice (porodica Brassicaceae)	7
1.2.1. Divlji kupus (<i>Brassica incana</i> Ten.).....	9
1.2.2. Raštika (<i>Brassica oleracea</i> L. var. <i>acephala</i>).....	12
2. CILJ ISTRAŽIVANJA	13
3. MATERIJALI I METODE	14
3.1. Materijali.....	14
3.1.1. Biljni materijal	14
3.1.2. Laboratorijske kemikalije	15
3.1.3. Puferi, reagensi i otopine	16
3.1.4. Laboratorijski pribor	17
3.1.5. Laboratorijski uređaji.....	18
3.1.6. Računalni programi.....	19
3.2. Metode	20
3.2.1. Priprema podloga za uzgoj klijanaca i tretmane stresnim čimbenicima.....	20
3.2.1.1. Osnovna podloga.....	20
3.2.1.2. Podloga za solni stres s dodatkom NaCl.....	20
3.2.1.3. Podloga za osmotski stres s dodatkom manitola.....	20
3.2.2. Sterilizacija sjemenki.....	21
3.2.3. Naklijavanje sjemenki.....	21
3.2.4. Test inhibicije rasta	22
3.2.5. Mjerenje biokemijskih parametara	23
3.2.5.1. Tretmani klijanaca i priprema ekstrakta.....	23
3.2.5.2. Određivanje sadržaja prolina.....	24

3.2.5.3. DPPH metoda za određivanje antioksidacijske aktivnosti.....	24
3.2.5.4. MDA metoda za mjerenje stupnja lipidne peroksidacije	25
3.2.5.5. Folin-Ciocalteu metoda za određivanje ukupnih fenola	26
3.2.6. Analiza ekspresije gena <i>NAC041</i> , <i>NAC084</i> i <i>DREB2A</i>	27
3.2.6.1. Uzgoj klijanaca za praćenje genske ekspresije	27
3.2.6.2. Izolacija genomske DNA	28
3.2.6.3. Izolacija RNA.....	29
3.2.6.4. Reverzna transkripcija (RT-PCR).....	30
3.2.6.5. Probir početnica za lančane reakcije polimerazom (PCR).....	31
3.2.6.6. Lančana reakcija polimerazom (PCR)	32
3.2.6.7. Elektroforeza na agaroznom gelu.....	32
3.2.6.8. Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu (qPCR)	32
3.2.6.9. Statistička obrada podataka.....	33
4. REZULTATI.....	34
4.1. Procjena otpornosti kultivara raštike i divljeg kupusa testom inhibicije rasta	34
4.2. Morfološka analiza klijanaca divljeg kupusa.....	35
4.3. Analiza biokemijskih parametara stresa	40
4.3.1. Sadržaj prolina	40
4.3.2. Antioksidacijska aktivnost.....	42
4.3.3. Stupanj lipidne peroksidacije.....	43
4.3.4. Ukupni fenoli	44
4.4. Analiza ekspresije gena	46
4.4.1. Izolacija nukleinskih kiselina.....	46
4.4.2. Testiranje početnica za umnažanje gena <i>OGIO</i>	48
4.4.3. Kvantitativna ekspresija gena <i>NAC041</i> , <i>NAC084</i> i <i>DREB2A</i>	49
5. RASPRAVA	53
6. ZAKLJUČAK.....	61
7. LITERATURA	62
8. ŽIVOTOPIS.....	67

POPIS KRATICA

CTAB - cetiltrimetilamonijev bromid

DEPC - dietilpirokarbonat

dH₂O – destilirana voda

DPPH - 2,2-difenil-1-pikril-hidraz

DTT – ditiotreitol

EDTA - etilendiamintetraoctena kiselina

GA – galna kiselina

MDA - malondialdehid

NaCl – natrijev klorid

ROS - reaktivne kisikove vrste (eng. *reactive oxygen species*)

s.t. – suha tvar

TBA - tiobarbiturna kiselina

TCA - trikloroctena kiselina

TE – trolox ekvivalent

TM – kombinirani temperaturno-osmotski stres

Trolox - 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina

TS – kombinirani temperaturno-solni stres

1. UVOD

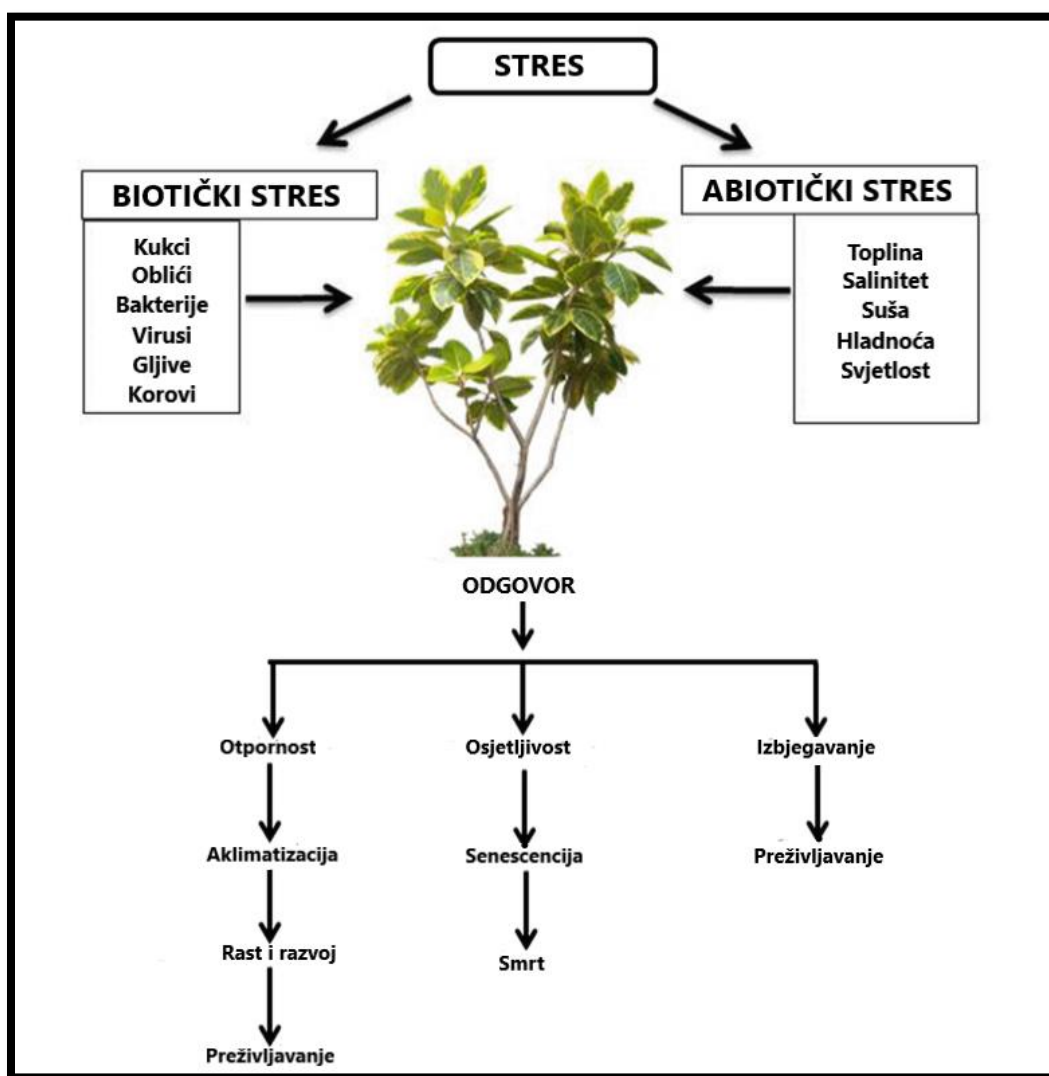
1.1. Utjecaj klimatskih promjena na biljni svijet

Klimatske promjene imaju izrazito značajan utjecaj na okoliš, a posebno na biljke koje rastu u područjima gdje je njihov utjecaj jako izražen. One djeluju na način da povećavaju razinu ugljikovog dioksida, temperature, dugotrajne periode suše kao i nagle nenadane periode olujnih promjena (tuča, poplave i sl.) u okolišu što posljedično dovodi do poremećaja u metaboličkim procesima kod biljaka i do promjena u bioraznolikosti biljnog svijeta kao i smanjene kvalitete i prinosa poljoprivrednih kultura (Bosco de Oliveira, 2019). Stoga su brojni znanstvenici fokusirani na istraživanja mehanizama prilagodbe biljaka na nepovoljne uvjete s ciljem selekcije i proizvodnje biljnih vrsta koje su otporne na nepovoljne uvjete uzrokovane klimatskim promjenama.

Nepovoljni klimatski uvjeti kao što su visoke temperature, dugi period suše i povišeni salinitet tla posebno su izraženi u mediteranskom području i dolaze istovremeno kao kombinirani stres. Izloženost biljaka faktorima abiotičkog stresa uzrokuje niz morfo-anatomskih, fizioloških i biokemijskih promjena koje utječu na rast i razvoj biljaka. Navedeni faktori stresa mogu nepovoljno utjecati na fotosintezu, respiraciju i stabilnost membrane te mijenjati razine primarnih i sekundarnih metabolita i hormona (Wahid i sur., 2007).

Okolišni čimbenici koji utječu na rast i razvoj biljaka dijele se u dvije velike skupine. Biotički čimbenici obuhvaćaju druge biljke, životinje i mikroorganizme koji pozitivno ili negativno mogu djelovati na biljke. Pod abiotičke čimbenike ubrajaju se svi oni čimbenici poput temperature, suše, saliniteta i svjetlosti koji mogu izravno djelovati na rast i razvoj biljaka (Slika 1.). Klima može utjecati na biotičke i abiotičke čimbenike, a klimatske promjene pridonose modulaciji tih čimbenika što posljedično ima, najčešće negativan, utjecaj na biljke (Burritt, 2019). Povijesno gledano, abiotički stres je zbog brzog rasta ljudske populacije u posljednjih 50-ak godina postao predmet istraživanja brojnih botaničara i agronoma. Povećani rast ljudske populacije prati i povećanu potražnju za hranom pa se tako sve više počeo istraživati uzrok smanjenog prinosa usjeva koji je do tada često bio i zanemarivan. Krajem prošloga stoljeća intenzivno su se krenuli objavljivati radovi koji su pokazivali kako različiti okolišni faktori mogu smanjiti prinos usjeva i do 70%.

Cramer i sur. (2011) su u svome izračunu dobivenom prema izvješćima FAO-a¹ pokazali kako je oko 96,5 % globalnog ruralnog zemljišta pogođeno abiotičkim stresom (Imran i sur., 2021). Većina dosadašnjih dokaza govori kako će mnoge usjeve biti otežano uzgajati na područjima gdje su se uzgajali u prošlosti ukoliko se klimatske promjene ne stave pod kontrolu. Sve to može utjecati i na dostupnost i sigurnost hrane u razvijenim zemljama, pa se često propitkuje kako se biljke prilagođavaju klimatskim promjenama i što se može učiniti kako bi globalna dostupnost hrane bila osigurana (Burritt, 2019).



Slika 1. Različiti odgovori biljaka na čimbenike biotičkog i abiotičkog stresa
Preuzeto i prilagođeno prema Baweja i Kumar, 2020.

¹ Organizacija za prehranu i poljoprivredu Ujedinjenih naroda

1.1.1. Temperaturni stres

Rast i razvoj pojedinih biljnih vrsta uvjetovan je okolišnom temperaturom (Bosco de Oliveira, 2019). Temperaturni stres se često definira kao porast temperature iznad uobičajene razine tijekom vremenskog razdoblja dovoljnog da izazove nepovratna oštećenja kod rasta i razvoja biljaka. Općenito, povećanje temperature u rasponu od 10-15 °C u odnosu na ambijentalnu temperaturu već se smatra temperaturnim stresom. S druge strane, tolerancija na toplinu se definira kao sposobnost biljke da pod povišenom temperaturom raste i daje ekonomični prinos (Willits i Peet, 1998).

Porast temperature koji je uzrokovan klimatskim promjenama rezultira smanjenom količinom oborina i manjim brojem snježnih dana što uvelike mijenja trajanje vegetacijske sezone za biljke te za posljedicu ima negativni utjecaj na bioraznolikost kao i smanjenu kvalitetu i prinos poljoprivrednih kultura (Bosco de Oliveira, 2019). Kako emisije plinova i neke druge povezane ljudske aktivnosti uvelike doprinose nakupljanju stakleničkih plinova globalno zatopljenje postaje jedna od najvećih briga današnjice. Predviđa se kako će staklenički plinovi (osobito dušikov oksid, klorofluorouglijci, metan i ugljikov dioksid) uzrokovati postupno povećanje temperature okoliša za oko 0,3 °C po desetljeću (Imran i sur., 2021).

Nadalje, istraživanjima se pokazalo kako različite biljne vrste mogu pokazati različitu osjetljivost na toplinski stres u različitim fazama razvoja. Tako na primjer tijekom klijanja sjemena visoka temperatura može usporiti ili potpuno spriječiti klijanje što ovisi o intenzitetu stresa i vrsti biljke. Povišena temperatura utječe na fluidnost membrane, metabolizam biljke, reorganizaciju citoskeleta te napose uzrokuje i odmatanje proteina. Biološke membrane, koje se najčešće opisuju modelom tekućeg mozaika, sastoje se od molekula koje su u konstantnom kretanju. Povećanjem temperature povećava se i brzina kretanja tih molekula što rezultira smanjenom međumolekularnom interakcijom i promjenom fluidnosti membrane. Biljke mogu preživjeti temperaturne uvjete koji su viši od onih optimalnih za rast (bazalna termotolerancija) ili steći toleranciju na inače letalan toplinski stres u slučaju prethodne izloženosti umjereno visokim temperaturama (stečena termotolerancija). Razvoj termotolerancije je usko povezan s povećanjem antioksidativnog kapaciteta i stvaranjem šaperona. S druge strane, niske temperature dovode do smanjenja enzimske aktivnosti, destabilizacije proteinskih kompleksa, povećanja rigidnosti membrane, nakupljanja ROS-a i stabilizacije sekundarnih struktura RNA.

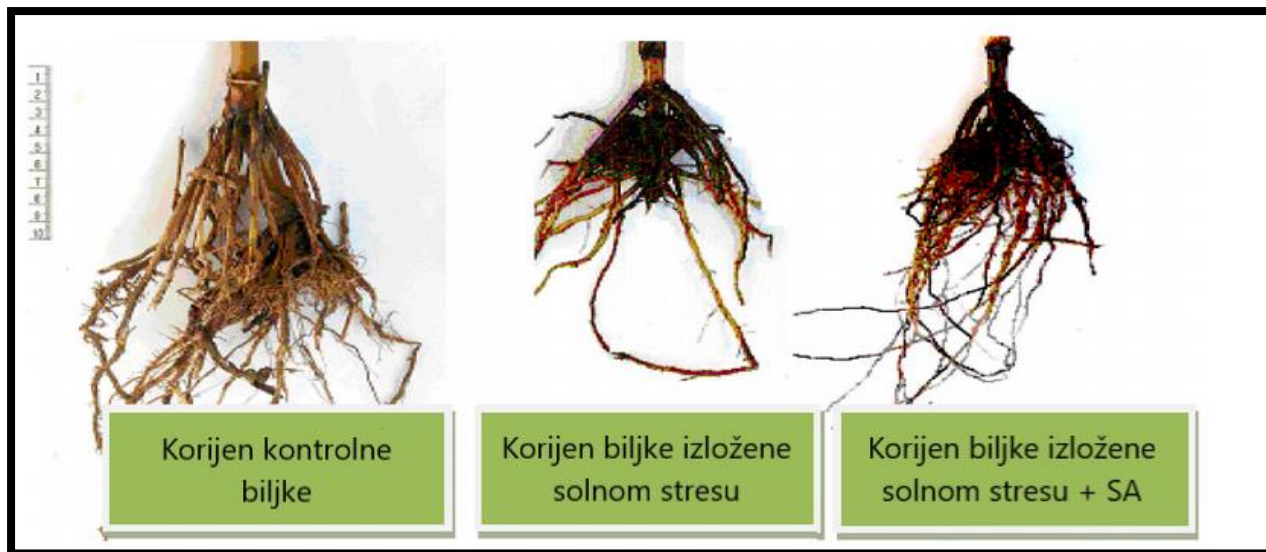
Za neke vrste je izlaganje niskim temperaturama neophodno kako bi se potaknuli pojedini razvojni procesi kao što su klijanje i cvjetanje (Ruelland i Zachowski, 2010).

1.1.2. Solni stres

Solni stres je jedan od najozbiljnijih ograničavajućih čimbenika za rast biljaka jer istovremeno uzrokuje osmotski stres, toksični efekt soli i oksidativni stres kod biljaka. Uobičajen je za sušne i polu-sušne regije diljem svijeta gdje evapotranspiracija premašuje količinu oborina što rezultira nedovoljnom količinom kiše za filtraciju topljivih soli oko područja korijena. Do prije četiri desetljeća zemlje s ovakvim problemom zahvaćale su oko 7 % svjetske kopnene površine, ali kao posljedica globalnih klimatskih promjena taj broj u posljednje vrijeme sve brže raste (Bosco de Oliveira, 2019). Smatra se kako je više od 800 milijuna hektara svjetskog kopna pod utjecajem visoke razine saliniteta te kako će do 2050. oko 17 milijuna hektara poljoprivrednog zemljišta biti suočeno s istim takvim problemom (Imran i sur., 2021).

Sol može spriječiti klijanje sjemena, razvoj biljaka na način da reducira sposobnost biljke da uzima vodu iz tla, smanjiti prinose, te otežati fotosintezu, transpiraciju i izmjenu plinova smanjujući sadržaj karotenoida i klorofila (Greenway i Munns 1980). Povećani salinitet dovodi do prekomjerne akumulacije Na^+ i Cl^- iona inhibirajući tako unos K^+ i Ca^{2+} što posljedično dovodi do ionske neravnoteže. Nadalje, solni stres u biljnim stanicama povećava i sadržaj reaktivnih kisikovih vrsta čiji se toksični učinak manifestira oštećenjem DNA i proteina, peroksidacijom lipida i propadanjem membrane. Ionska homeostaza, kompartmentalizacija, osmotska prilagodba, stimulacija antioksidativnog mehanizma i biosinteza poliamina su neke od strategija koje biljka koristi kada se nalazi u uvjetima povećanog saliniteta. Također, u takvim nepovoljnim uvjetima dolazi i do različitih morfo-anatomskih promjena u korijenu (Slika 2.) i lišću te promjene veličine i broja kloroplasta, mitohondrija i peroksisoma.

Biljni hormoni igraju važnu ulogu u regulaciji odgovora biljaka na solni stres. Stoga se u biljkama, kao odgovor na solni stres, često povećava razina endogenih fitohormona; apscizinske kiseline (ABA), auksina, citokinina, salicilne kiseline (SA), jasmonske kiseline (JA), poliamina, giberelina i brasinosteroida (BR) (Fahad i sur., 2015; Pavlović i sur., 2018, 2019).



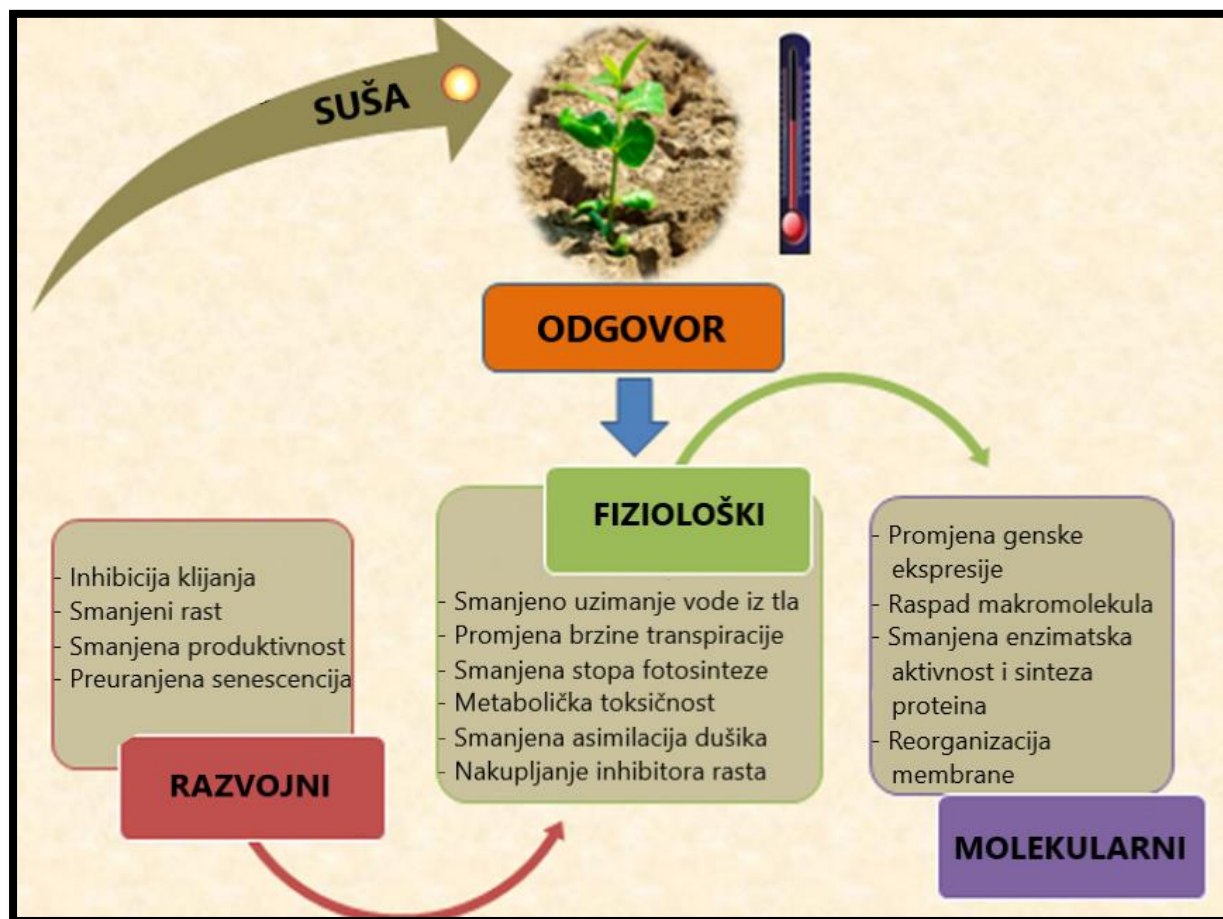
Slika 2. Učinak salicilne kiseline (SA) na duljinu korijena kukuruza (*Zea mays* L.) izloženog solnom stresu. SA je vidno doprinijela rastu korijena kukuruza u uvjetima stresa u usporedbi s kontrolnim uvjetima gdje SA nije bila aplicirana. Preuzeto i prilagođeno prema Fahad i sur., 2015.

Na koncu, salinitet kao abiotički stres šteti i poljoprivredi smanjujući produktivnost diljem svijeta pa je stoga suočavanje s ovim problemom vrlo važno kako bi se zadovoljila sadašnja i buduća potražnja za hranom na globalnoj razini (Arif i sur., 2020).

1.1.3. Sušni stres

U okviru klimatskih promjena, suša je jedan od glavnih abiotičkih stresova koji utječe na život svih organizama, a osobito na život biljaka zbog toga što biljke nemaju pokretne strukture koje bi im omogućile migraciju u uvjetima kada su voda i hrana prisutni u ograničenim količinama. Utjecaj suše na prinos usjeva dobro je istražen, a obično se manifestira kroz smanjenu klijavost sjemena, smanjenu fotosintetsku aktivnost, ograničen rast, manji broj listova, smanjenu veličinu pojedinačnog lista te svježiu i suhu biomasu (Slika 3.) (Mansoor i sur., 2022). U nekim istraživanjima pokazalo se kako je prinos biljaka zbog suše bio smanjen za čak 80 %, dok pojedine biljne vrste ukoliko su izložene dužem periodu suše rezultiraju potpunom sterilnošću. Odgovor biljaka u takvim nepovoljnim uvjetima praćen je zatvaranjem puči, smanjenjem transpiracije, te promjenom u ekspresiji gena (Imran i sur., 2021).

Kako bi se sušni stres lakše istraživao, u laboratorijskim uvjetima se često koriste spojevi, poput manitola, koji uzrokuju osmotski stres (Bauer i sur., 2022). Kako bih u kontroliranim uvjetima inducirao osmotski stres i ja sam u ovom istraživanju koristio heksavalentni šećerni alkohol, manitol.



Slika 3. Prikaz različitih vrsta odgovora biljaka na sušni stres.
Preuzeto i prilagođeno prema Mansoor i sur., 2022.

1.1.4. Kombinirani abiotički stres

Iako je ustaljena praksa mnogih znanstvenih laboratorija istraživati odgovor biljaka na pojedinačne čimbenike stresa, situacija u prirodi je dosta kompliciranija jer su biljke izložene istovremeno različitim okolišnim faktorima. Stoga je potrebno pored pojedinačnih stresnih faktora ispitati i odgovor biljaka na kombinirane čimbenike abiotičkog stresa. Kombinirani stres

na biljni razvoj može djelovati na način da uzrokuje smanjenu stopu rasta biljaka, reducira fotosintetski kapacitet biljaka, dovede do povećane proizvodnje slobodnih radikala što za posljedicu ima propadanje staničnih membrana, oštećenje DNA i proteina. Također, u takvim uvjetima može doći do disbalansa u biljnim hormonima pa tako kombinirani stres može potaknuti povećanu proizvodnju stresnih hormona poput ABA što dovodi do zatvaranja puči kako bi se smanjilo isparavanje vode. Kombinirani stres može uzrokovati i promjene u metaboličkim procesima pri čemu se onda nakupljaju specifični metaboliti. U ovakvim nepovoljnim uvjetima može doći i do slabljenja biljnih obrambenih mehanizama pri čemu biljke postaju podložne raznim bolestima. Treba napomenuti kako različite biljke imaju i različite prilagodbe i mehanizme obrane koji se u uvjetima stresa mogu aktivirati kako zbog njihovih genetskih karakteristika tako i zbog prethodne izloženosti stresu (Rivero i sur., 2021).

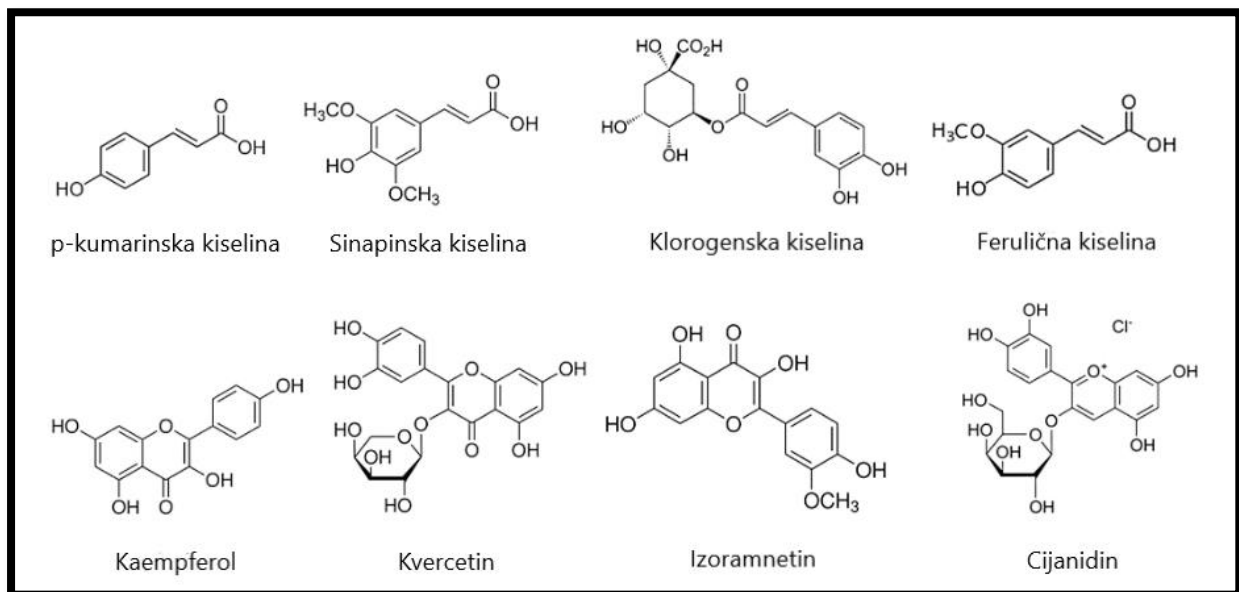
Nadalje, smatra se kako je učinkovita stopa detoksikacije ROS jedna od ključnih uloga u povećanju otpornosti biljaka na stres. Tako su Martinez i sur. (2018) u svojem istraživanju koristili egzogeni melatonin kako bi povećali detoksikaciju ROS kod rajčice (*Solanum lycopersicum* L.) koja je rasla u kombiniranim uvjetima dva najčešća abiotička stresa, slanosti i povišene temperature. Biljke koje su bile tretirane egzogenim melatoninom pokazale su promijenjenu ekspresiju gena koji su povezani s antioksidansima i njima srodnih enzima (askorbat peroksidaza, glutation reduktaza, glutation peroksidaza i dr.). U istraživanju se primijetilo kako su tretirane biljke puno bolje rasle u stresnim uvjetima nego netretirane te se zaključilo kako egzogeni melatonin ima važnu ulogu u toleranciji biljaka na abiotički stres.

1.2. Krstašice (porodica Brassicaceae)

Krstašice ili kupusnjače su većinom zeljaste biljke koje broje oko 3200 vrsta grupiranih u oko 350 rodova. Pojedine vrste krstašica se razvijaju u obliku grmlja ili penjačica, a mogu biti jednogodišnje, dvogodišnje ili trajnice. Kada se gleda s ekološke strane, krstašice su većinom hidrofiti, mezofiti i kserofiti. Listovi su im obično zavojiti, izmjenični ili rijetko distihni, a ponekad grade rozete i polurozete. U većini slučajeva listovi su bez nekog specifičnog mirisa i s peteljkom, no nekada mogu biti polusjedeći ili sjedeći. Plojka listova krstašica, koji su najčešće jednostavne građe, je cjelovita do urezana. Kod dvogodišnjih biljaka kao što su kupus

(*Brassica oleracea* L. ssp. *capitata* (L.) Duchesne), kineski kupus (*Brassica pekinensis* (Lour.) Rupr.) i kelj (*Brassica oleracea* L. var. *sabauda*) stabljika, na čijem se vrhu razvija veliki vršni pup, je značajno skraćena. Kod ove porodice se može uočiti i gradnja spremišnih organa od različitih dijelova korijena, hipokotila i stabljike. Krstašice imaju dvospolne tetramerne cvjetove koji se obično nalaze u cvatovima, ali se ponekad pojavljuju i kao pojedinačni cvjetovi. Uobičajen plod za ovu porodicu je „bilokularan“ tobolac, a zbog trajne prisutnosti lažne septe u porodici se naziva komuščica ili komuška. Karakterističan način oprašivanja je entomofilija, a latice koje imaju dug klinac na vrhu su savinute pod kutom od 90° i grade „kišobran“ nad udubljenjima lapova s nektarom pa se tako sprječava njegovo razrjeđivanje oborinama. Što se tiče rasprostranjenosti, krstašice su kozmopoliti koji obitavaju od hladnog do tropskog područja, a osobito velika raznolikost im je u sjevernom umjerenom području te na Sredozemlju gdje raste veliki broj endemičnih vrsta. Mnoge krstašice se uzgajaju od ranih početaka ljudske civilizacije i predstavljaju važan dio ljudske ishrane. Najznačajnije povrće i krmne biljke ove porodice jesu pojedine svojte roda *Brassica* s velikim brojem varijeteta te će upravo one biti detaljnije analizirane u ovom diplomskom radu (Nikolić, 2013).

Različite vrste krstašica, osim u kulinarstvu, intenzivno se već dugi niz godina koriste i u tradicionalnoj medicini. Tako su pojedina istraživanja pokazala kako povećani unos pojedinih vrsta iz ove porodice rezultira smanjenom stopom obolijevanja od nekoliko vrsta tumora što je posljedično dovelo i do pojačane proizvodnje dodataka prehrani koji u sebi sadrže ekstrakte ili spojeve izolirane iz krstašica. Glukozinolati i produkti njihove hidrolize indoli su spojevi koji se često spominju kada se govori o medicinskim učincima, a osim njih krstašice su bogate i drugim nevitaminskim i nemineralnim spojevima (Slika 4.), kao što su polifenoli i triterpeni. Sve te kemikalije imaju sinergistički učinak koji može biti antioksidacijski, antikancerogeni, kardioprotektivan i protuupalan (Šamec i Salopek Sondi, 2019).



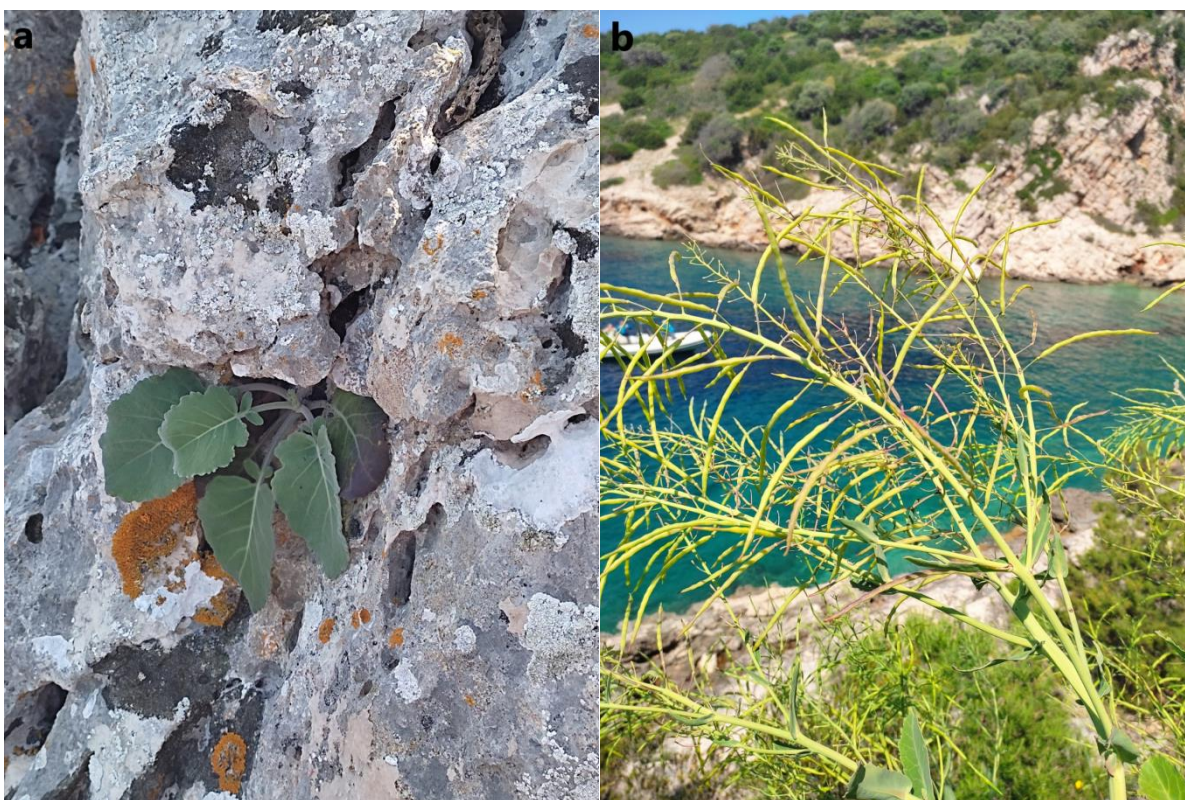
Slika 4. Česti nevitaminski i nemineralni spojevi prisutni kod roda *Brassica*.
Preuzeto i prilagođeno prema Aires, 2015.

1.2.1. Divlji kupus (*Brassica incana* Ten.)

Divlji kupus je zeljasta biljka iz porodice Brassicaceae koja može narasti do 100 cm visine (Slika 5.). Specifičan je po odrvenjeloj stabljici pri dnu i „krilatim“ peteljka bazalnih listova. Plojka lista je lancetastog oblika. Listovi su prekriveni sitnim dlačicama, a žuti sitni cvjetovi skupljeni su u grozdasti cvat (Slika 6.). Plod je cilindrična i savijena komuška, veličine 40-80 mm (Tripod i sur., 2012).

Prirodno raste u jugoistočnoj Europi uključujući Albaniju, Hrvatsku, Grčku i Italiju (Slika 7.). Prirodno stanište su mu vapneni stjenoviti obronci od razine mora do 600-800 m nadmorske visine što ukazuje na skromne zahtjeve uzgoja i veliku otpornost na sušu, povećanu slanost i visoke temperature (Snogerup i sur., 1990; Jasprica i sur., 2015). Divlji kupus je jestiva biljka koja se može koristiti za pripremu omleta, a zajedno s drugim samoniklim biljem neizostavan je dio „Frascatule“, tradicionalnog sicilijanskog jela. Za razliku od nekih drugih vrsta roda *Brassica* koje su bolje istražene, divlji kupus je dosta neistražen te samim time su dostupne vrlo ograničene informacije o njegovom potencijalnom nutritivnom i terapijskom učinku. U jednom

od malobrojnih radova o divljem kupusu analiziran je fenolni sastav te antioksidacijski i citotoksični učinak ekstrakta listova i cvjetova. Dobiveni rezultati su ukazivali na citotoksično djelovanje ekstrakata, osobito cvjetnog, na Caco-2 stanice vjerojatno kroz aktivaciju nekih biokemijskih putova povezanih s nekrozom. Što se tiče antioksidacijskog djelovanja, pokazalo se da hidroalkoholni ekstrakti imaju jača sekundarna antioksidacijska svojstva nego primarna (Miceli i sur., 2020).



**Slika 5. Jednogodišnja biljka divljeg kupusa (a), višegodišnja biljka divljeg kupusa u fazi zriobe (b).
Foto: dr. sc. Branka Salopek Sondi, otok Vis**



Slika 6. Divlji kupus u stadiju cvatnje
Foto: dr. sc. Branka Salopek Sondi, otok Vis



Slika 7. Kartografski prikaz prirodnih staništa divljeg kupusa u Europi.
Preuzeto i prilagođeno prema Marhold, 2011+.

Divlji kupus je zbog svoje izrazite otpornosti na sušu, povećanu slanost tla i povišene temperature izuzetno dobar model za istraživanja mehanizama tolerancije na nepovoljne abiotičke čimbenike. Kao takav je interesantan kao mogući izvor gena koji nose otpornost na abiotičke stresne faktore u selekciji i proizvodnji otpornih varijeteta kupusa od komercijalnog značaja.

1.2.2. Raštika (*Brassica oleracea* L. var. *acephala*)

Raštika je dvogodišnja zeljasta biljka iz porodice Brassicaceae, blisko srodna divljem kupusu, čiji je uzgoj započeo prije više od sedam tisućljeća. Karakteriziraju je blago kovrčavi listovi s dobro razvijenom plojkom, koji na donjem i srednjem dijelu spiralno obavijaju stabljiku dok na vršnom dijelu čine rozetu, te otpornost na visoke i niske temperature (Kalloo i Bergh, 1993). U većem dijelu Europe, Azije i Amerike raštika zauzima vrlo važno mjesto u prehrani stanovništva i kulinarstvu. Tradicionalno se uzgaja za obiteljske potrebe kao poljoprivredna kultura na manjim parcelama (Slika 8.), no kako se u zadnje vrijeme sve više otkrivaju njezine dobrobiti sve češće se nalazi na jelovnicima brojnih restorana, posebice restorana zdrave hrane. Mladi listovi raštike se obično koriste u salatama, varivima i omletima, a sve češće se, zbog bogate nutritivne vrijednosti, od njih pravi i zdrava varijanta čipsa. Osim listova, sjeme raštike se može koristiti kao dodatak kruhu i kolačima. Također, zabilježen je i pokušaj proizvodnje soka od raštike, fermentirane sojevima roda *Lactobacillus* koji je imao iznimno dobar nutritivni sastav. Osim u kulinarstvu, raštika se koristi i u tradicionalnoj medicini obično za liječenje gastritisa i čira na želucu, a pokazala se djelotvornom i kod liječenja dijabetesa, reumatizma, bolesti jetre, oftalmoloških problema, anemije i pretilosti. Raštika ima visok sadržaj kalcija, folata, riboflavina i vitamina K, dok je količina vitamina C kod raštike puno veća nego kod drugih vrsta roda *Brassica* (Šamec i sur., 2019).



**Slika 8. Tradicionalni uzgoj raštike na manjim parcelama (a), raštika pod snijegom (b)
Foto: dr. sc. Branka Salopek Sondi**

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog istraživanja je utvrditi kako različiti oblici stresa (temperaturni, solni i sušni te kombinirani stres), koji se zbog globalnih klimatskih promjena javljaju sve češće, utječu na rast, razvoj i biokemijske parametre kod varijeteta divljeg kupusa s različitih staništa južnog Jadrana i Mediterana te koji su mehanizmi obrane od stresa. Informaciju o odgovoru biljaka na stres ću dobiti na temelju biokemijskih markera stresa: prolina, antioksidacijske aktivnosti, lipidne peroksidacije i ukupnih fenola, te ekspresije gena *NAC041*, *NAC084* i *DREB2A* za koje je poznato da reagiraju na stres (eng. *stress related genes*). Također, dobiveni rezultati na divljem kupusu biti će uspoređeni s rezultatima dobivenim na srodnoj raštici na kojoj su već i prije provedena ispitivanja odgovora na stres (Bauer i sur., 2022).

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

U ovom poglavlju prikazani su svi materijali koji su bili potrebni kako bi se ovo istraživanje provelo u cijelosti.

3.1.1. Biljni materijal

Za ovo istraživanje koristio sam sjeme tri varijeteta raštike (*Brassica oleracea* var. *acephala*) i šest varijeteta divljeg kupusa (*Brassica incana*) koje je prikupljeno na različitim staništima južnog Jadrana i Mediterana (Tablica 1.) i pohranjeno u banci sjemena u Institutu za poljoprivredu i turizam u Poreču (IPTPO).

Tablica 1. Popis korištenih varijeteta raštike i divljeg kupusa s mjestima prikupljanja

VARIJETET	MJESTO PRIKUPLJANJA
IPT 395 - Raštika	Mostar
IPT 414 - Raštika	Srijane
IPT 415 - Raštika	Sikovo-Zad. Zaleđe
IPT 514 - Divlji kupus	Italija
IPT 518 - Divlji kupus	Kosor
IPT 519 - Divlji kupus	Kosor
IPT 520 - Divlji kupus	Obljak
IPT 521 - Divlji kupus	Sušac
IPT 522 - Divlji kupus	Stupe

3.1.2. Laboratorijske kemikalije

- Biljni agar, Duchefa Biochemie
- Borna kiselina, Kemika
- CTAB, Sigma
- DPPH, Sigma
- DTT, VWR
- EDTA, Sigma
- Etanol, Kemika
- Etidij bromid, Sigma
- Folin-Ciocalteu reagens, Kemika
- Galna kiselina, Sigma
- Izoamil, Kemika
- Izosan[®] G, Pliva
- Klorovodična kiselina, Kemika
- Kloroform, Scharlau
- L-prolin, Sigma
- Manitol, VWR Chemicals BDH[®]
- Metanol, Kemika
- Natrijev karbonat, Kemika
- Natrijev klorid, Carl Roth
- Ninhidrin, Sigma
- Octena kiselina, Kemika
- TBA, Sigma
- TCA, Acros Organics
- Tris, Sigma
- Trolox, Sigma
- β -merkaptotanol, Sigma

3.1.3. Pufferi, reagensi i otopine

1) Reakcijska smjesa za mjerenje prolina

Reakcijsku smjesu sam pripremao u volumenima od po 20 ml. 200 mg ninhidrina sam otapao u mješavini octene kiseline (12 ml), 80 %-tnog metanola (4 ml) i miliQ vode (4 ml).

2) Otopina DPPH

0,094 mM otopinu DPPH sam pripremio na način da sam 0,001853 g DPPH otopio u 50 ml 100 %-tnog metanola. Bocu s pripremljenom otopinom zaštitio sam aluminijskom folijom s obzirom da je otopina DPPH osjetljiva na svjetlo.

3) Otopina Troloxa (ekvivalent vitamina E)

5 mM otopinu Troloxa sam priredio na način da sam otopio 0,01252 g Troloxa u 8 ml 100 %-tnog metanola i dodao 2 ml dH₂O.

4) Puferska otopina za mjerenje stupnja lipidne peroksidacije

0,5 % TBA u 20 % TCA

Za pripremu ove puferske otopine prvo sam rastopio 20 g TCA u 80 ml dH₂O. Kada se TCA u potpunosti otopila dodao sam 0,5 g TBA. Sadržaj čaše sam zagrijavao uz polagano miješanje na ≈ 80 °C u digestoru. Nakon ≈ 30 minuta kada se otopila i TBA uklonio sam čašu s električnog kuhala i ostavio otopinu da se ohladi nakon čega je bila spremna za uporabu.

5) Pufferi za izolaciju DNA

a) **Ekstrakcijski puffer** sam napravio tako da sam pomiješao 1 ml 1 M HCl, 2,8 ml 5 M NaCl, 400 μ l 0,5 M EDTA, 200 mg CTAB i 1,4 μ l β -merkaptioetanol, te nadopunio destiliranom vodom do 10 ml.

b) **Precipitacijski pufer** sam napravio tako što sam dodao 1 ml 1 M Tris-HCl, 400 μ l 0,5 M EDTA, 200 mg CTAB u 15 ml dH₂O, te nakon otapanja nadopunio s dH₂O do 20 ml.

6) Otopine za izolaciju RNA

Za izolaciju RNA sam koristio kit *MagMAX Plant RNA Isolation*, ThermoFisher. Sve sadržane otopine su bile pripremljene prema uputama proizvođača. Prilikom pripreme pufera za lizu stanica na 600 μ l pufera za lizu dodao sam i 12 μ l 2M DTT (600 μ l je potrebno za svaki uzorak).

7) TBE pufer

Za otapanje agaroze i pripremu gelova te kao elektroforetski pufer koristio sam 0,5x TBE pufer. Pripremao sam po 100 ml 5x TBE pufera tako što sam dodao 5,4 g TRIS, 2,75 g borne kiseline i 2 ml 0,5 ml 0,5 M EDTA (pH 8). Iz 5x TBE pufera sam zatim razrjeđivanjem napravio 0,5x TBE.

3.1.4. Laboratorijski pribor

- Četvrtaste laboratorijske plastične pločice (12 x 12 cm)
- Tubice za PCR
- Plastične tubice (15 ml)
- Igla
- Kivete za spektrofotometar
- Laboratorijske čaše
- Magnetska mješalica
- Magnetski stalak
- Menzura
- Mikropruvete (1,5 ml i 2 ml)
- Parafilm
- Pincete
- Plastične mikrotitarske pločice

- Pločica s epruveticama za qPCR
- Staklene boce
- Stalak za kivete
- Stalak za mikroeprovete
- Sterilne plastične pipete
- Špatula
- Tarionik s tučkom

3.1.5. Laboratorijski uređaji

- Analitička vaga, R 200 D, Sartorius
- Centrifuga, Eppendorf
- Čitač mikrotitarskih pločica, Infinite M200, Tecan
- Dehidrator, Labconco
- Digestor
- Digitalna kamera za slikavanje gelova, Kodak
- Električno kuhalo
- Fitotron, Tamiko Instruments
- Laminar, CV-30/70, Telstar
- Mic qPCR, Biomolecular systems
- Mjerač pH, Mettler Toledo
- Mlin visoke frekvencije, MM 400, Retsch
- Nanodrop, Thermo Fisher Scientific
- Rotacijski homogenizator, Bio RS-24, Biosan
- Silamat, Silver Mix
- Skener, HP Scanjet G3010, HP
- Spektrofotometar, BioSpec-1601E, Shimadzu
- PCR uređaj (GeneAmp[®] PCR System 2700), Applied Biosystems
- Termoblok, Eppendorf
- Vodena kupelj, WB-4MS, Biosan
- Vorteks, EV-102, Tehnica Železniki

3.1.6. Računalni programi

- ImageJ
(<https://imagej.nih.gov/ij/download.html>)
- MicPCR programski paket
(<https://biomolecularsystems.com/mic-qpcr/software/>)
- Microsoft Excel 2010
(<https://www.microsoft.com/en-us/microsoft-365/previous-versions/microsoft-excel-2010>)
- Program za očitavanje mikrotitarskih pločica (Tecan)
(<https://lifesciences.tecan.com/doclist-hs/detection-infinite-200-pro-downloads>)
- Program za pregled skeniranih fotografija (HP)
(<https://support.hp.com/hr-en/drivers/selfservice/hp-scanjet-g3010-photo-scanner/1849437>)

3.2. Metode

U ovom poglavlju opisani su svi postupci koje sam koristio kako bih uzgojio potrebni biljni materijal. Također, detaljno sam naveo i sve korake pojedinih metoda koje sam koristio za provedbu ovog eksperimenta.

3.2.1. Priprema podloga za uzgoj klijanaca i tretmane stresnim čimbenicima

Za uzgoj i tretmane klijanaca divljeg kupusa i raštike pripremao sam nekoliko različitih podloga kako slijedi:

3.2.1.1. Osnovna podloga

Osnovna podloga za klijanje sjemena, te uzgoj klijanaca u temperaturnom stresu i uzgoj kontrolnih klijanaca uz adekvatne tretmane sadržavala je 1 %-tni agar. Deset grama biljnog agara otopio sam u 1 l dH₂O nakon čega sam podlogu sterilizirao autoklaviranjem (121 °C, 1,5 atm, 20 minuta). Dok je podloga još vruća i u tekućem stanju izlio sam ju u prethodno pripremljene sterilne četvrtaste plastične posude u sterilnim uvjetima u laminaru i pustio da se ohladi i očvrсне. Podloge sam do uporabe čuvao na sobnoj temperaturi.

3.2.1.2. Podloga za solni stres s dodatkom NaCl

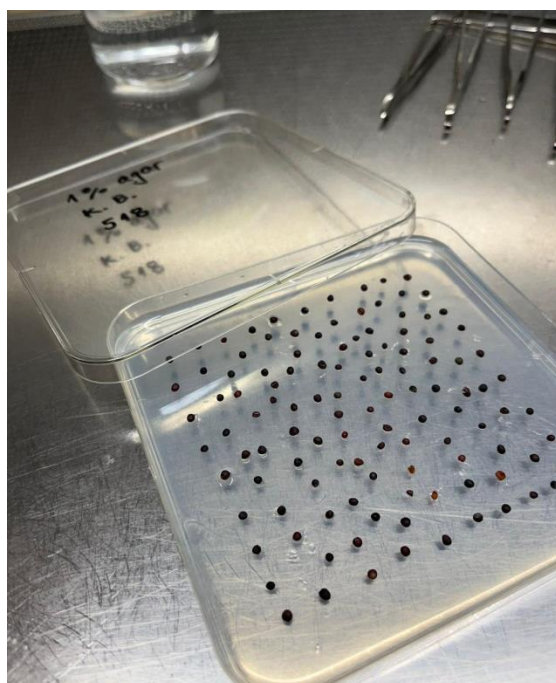
Postupak pripreme ove podloge je isti kao i kod osnovne podloge za klijanje sjemena samo što sam ovdje u otopinu 1 %-tnog agara dodao NaCl koji je služio kao inicijator stresa. Kod testa inhibicije rasta NaCl sam dodavao u koncentracijama od 150 mM i 300 mM, dok sam u podloge koje sam koristio za uzgoj klijanaca na kojima su mjereni biokemijski parametri dodao NaCl u koncentraciji od 100 mM.

3.2.1.3. Podloga za osmotski stres s dodatkom manitola

Za pripremu ove podloge sam u otopinu 1 %-tnog agara dodao manitol i to u koncentracijama od 300 mM i 600 mM za test inhibicije rasta i u koncentraciji od 200 mM za mjerenje biokemijskih parametara. Postupak pripreme ove podloge je isti kao osnovne podloge samo što je tijekom pripreme dodan još i inicijator osmotskog stresa, manitol.

3.2.2. Sterilizacija sjemenki

Kako bih spriječio rast različitih nepoželjnih mikroorganizama sjemenke divljeg kupusa i raštike sterilizirao sam 10 minuta u 5 ml 3 %-tne vodene otopine Izosana. Kako bih isprao Izosan, sjemenke sam ispirao tri puta sa sterilnom dH₂O te ih četvrti puta, uz povremeno miješanje, ostavio 15-ak minuta u sterilnoj dH₂O. Nakon toga sam uklonio preostalu vodu i ravnomjerno rasporedio sjemenke na prethodno pripremljenu podlogu za klijanje (Slika 9.) pazeći da su odmaknute od ruba pločice kako bi klijanci mogli pravilno rasti.



Slika 9. Pločice s osnovnom podlogom (1%-tni agar) i steriliziranim sjemenom divljeg kupusa..
Foto: Krunoslav Baotić

3.2.3. Naklijavanje sjemenki

Pločice sa sjemenkama, koje sam omotao parafilmom, sam stavio na stratifikaciju u hladnjak (4 °C). Period naklijavanja u hladnjaku za raštike je bio šest dana, dok je za divlji kupus on bio osam dana. Nakon toga sam pločice prebacio u fitotron u okomitom položaju gdje su sjemenke u osvjetljenim uvjetima klijale još 24 sata pri fotoperiodu 16/8 (svjetlo/tama) i temperaturi od 22 °C dok nisu izrasli klijanci duljine \approx 1 cm (Slika 10.).

3.2.4. Test inhibicije rasta

Za test inhibicije rasta koristio sam pet različitih pločica kako bih testirao koja je koncentracija NaCl i manitola najprikladnija kako bi se u laboratorijskim uvjetima pokazala djelomična inhibicija rasta. Kontrolni klijanci bili su uzgajani na osnovnoj podlozi (1 %-tni agar), dok je u preostalima bio NaCl u dvije različite koncentracije (150 mM i 300 mM) i manitol, također u dvije različite koncentracije (300 mM i 600 mM). Klijance veličine oko 1 cm sam sterilnim pincetama pažljivo prebacio na prethodno pripremljene pločice s tretmanima i označio početnu duljinu korijena kako bih mogao pratiti rast. Na svakoj pločici je u prosjeku bilo po 6 klijanaca. Biljke na pločicama za kontrolu, te na podlogama s dodatkom NaCl i manitola rasle su na konstantnoj temperaturi od 22 °C. Klijanci koje sam tretirao toplinskim stresom i kombinacijom solnog i temperaturnog te osmotskog i toplinskog stresa rasli su u drugom fitotronu u kojemu su bili slijedeći temperaturni uvjeti: 24 °C 10 h tokom noći (22:00-8:00), 30 °C 4 h (8:00-12:00), 40 °C 4,5 h (12:00-16:30), 30 °C 5,5 h (16:30-22:00).



Slika 10. Pločice s klijancima raštike i divljeg kupusa u fitotronu za testiranje inhibicije rasta u uvjetima stresa (solni, osmotski, temperaturni i kombinirani stres).

Foto: Krunoslav Baotić

Prirast korijena klijanaca određivao sam nakon 96 sati tretmana na način da sam skenirao pločice s klijanacima i analizirao ih u kompjuterskom programu ImageJ. Računao sam razliku između početnog i konačnog stanja kako bih utvrdio optimalnu koncentraciju soli i manitola za istraživanje odgovora klijanaca na stres.

3.2.5. Mjerenje biokemijskih parametara

Biokemijske parametre: prolin, antioksidacijski kapacitet, stupanj lipidne peroksidacije te ukupne fenole mjerio sam pomoću spektrofotometra.

3.2.5.1. Tretmani klijanaca i priprema ekstrakta

Za mjerenje biokemijskih parametara koristio sam pločice s tri različite podloge koje sam stavio u oba fitotrona. Uvjeti u oba fitotrona su bili isti kao i kod testa inhibicije rasta (3.2.4.). Prema podacima dobivenim u testu inhibicije rasta odlučio sam da su uz kontrolnu pločicu bez dodataka za dobivanje najprikladnijih rezultata pogodne koncentracije od 100 mM NaCl i 200 mM manitola.

Priprema podloga i sterilizacija sjemena se za ovo mjerenje odvijala isto kao što je već i prethodno navedeno. Koristio sam samo nešto veći broj klijanaca, ovisno o količini sjemena koja nam je bila dostupna, u usporedbi s brojem koji sam koristio u testu inhibicije rasta.

Tretirane klijance i odgovarajuće kontrole sa svake pločice izvagao sam kako bih odredio svježnu masu te ih stavio u tubice od 15 ml i smrznuo ih u tekućem dušiku. Zatim je uslijedila liofilizacija u trajanju od 24 sata kako bi se uklonila voda iz tkiva te ponovno vaganje kako bi se dobile vrijednosti suhe tvari.

Liofilizirano tkivo sam zatim prebacio u tekućim dušikom ohlađeni tarionik i pomoću tučka ga usitnjavao dok tkivo nije bilo samljeveno u sitan zelenkasti prah. Samljeveno tkivo svakog pojedinog tretmana i kontrole prebacio sam u nove, čiste mikroeprevete.

Kao zadnji korak u pripremi odvagao sam po ≈ 30 mg liofiziranog materijala svakog tretmana i kontrole i prebacio u novu mikroeprevetu u koju sam dodao 1 ml 80 %-tnog metanola radi ekstrakcije. Uzorke sam kratko vorteksirao (2 s) te ih stavio na miješanje na mlin visoke frekvencije (30 udaraca/sekundi, 2 minute). Zatim sam uzorke stavio na mini rotator 30 minuta na najvećoj brzini. Poslije toga sam ih centrifugirao na 13 000 rpm (10 minuta, 25 °C).

Nakon centrifugiranja sam pažljivo dekantirao ekstrakt u nove označene mikroeprovete i pohranio ga na -20 °C. Ekstrakt pripremljen na ovaj način koristio sam za sva biokemijska mjerenja.

3.2.5.2. Određivanje sadržaja prolina

Mjerenje prolina odredio sam po metodi koja kao agens za detekciju prolina koristi ninhidrin i octenu kiselinu koja hidrolizira ciklički prolin (Carillo i Gibon, 2011).

Za izradu baždarnе krivulje napravio sam *stock*-otopinu prolina koncentracije 10 mM u 80 %-tnom metanolu. Iz nje sam napravio razrjeđenja u sljedećim koncentracijama: 0,04 mM, 0,1 mM, 0,2 mM, 0,4 mM i 1 mM.

Potom sam 100 µl prethodno pripremljenog ekstrakta pomiješao s 200 µl reakcijske smjese za određivanje prolina (3.1.3.) te sadržaj mikroeprovete dobro promiješao i grijao 20 minuta na 95 °C u termobloku kako bi se reakcija ubrzala i dobio ljubičasto obojeni produkt prolina i ninhidrina. Uzorke za slijepu probu pripremao sam na isti način samo što sam umjesto ekstrakta dodao 100 µl 80 %-tnog metanola. Nakon inkubacije i nekoliko minuta hlađenja prebacio sam 100 µl uzorka na mikrotitarsku pločicu (u duplikatu) i zatim mjerio apsorbanciju dobivenih otopina uzoraka i standarada na 520 nm. Koncentraciju prolina u uzorcima računao sam na način da sam dobivene vrijednosti apsorbancije uvrstio u jednadžbu baždarnog pravca dobivenog prema vrijednostima standarada. Rezultate sam izrazio prema suhoj tvari tkiva.

3.2.5.3. DPPH metoda za određivanje antioksidacijske aktivnosti

Ova metoda za određivanje antioksidacijske aktivnosti se bazira na redukciji DPPH radikala u prisutnosti antioksidansa u uzorku. DPPH radikal maksimum apsorpcije posjeduje pri 515 nm (Brand-Williams i sur., 1995).

Baždarnu krivulju pripremao sam miješanjem volumena 80 %-tnog metanola i 5 mM Troloxa kako slijedi u Tablici 2.

Tablica 2. Vrijednosti za izradu baždarne krivulje

Trolox (mM)	Metanol (80 %) / μl	Trolox (5 mM) / μl
0,25	950	50
0,5	900	100
0,75	850	150
1	800	200
1,25	750	250
1,5	700	300
2	600	400

Spektrofotometar sam baždario s 1 ml 100 %-tnog metanola. Potom sam u mikroeprovete otpipetirao 980 μ l prethodno pripremljene otopine DPPH (3.1.3.) i 20 μ l 80 %-tnog metanola za slijepu probu/standarda za izradu baždarca/uzorka i dobro promiješao. Mikroeprovete sam zatim držao 60 minuta u mraku kako bi se odvila reakcija te njihov sadržaj prebacio u kivete kako bih na spektrofotometru očitavao apsorbanciju pri 515 nm. Kako se u ovoj metodi prati gašenje radikala važno je da se dobivena vrijednost apsorbancije za standard/uzorak oduzme od izmjerene vrijednosti slijepe probe (ΔA).

3.2.5.4. MDA metoda za mjerenje stupnja lipidne peroksidacije

Princip metode mjerenja lipidne peroksidacije bazira se na hidroperoksidima koji uzrokuju razgradnju membrane, a potječu od peroksidikala i peroksidacije masnih kiselina. Produkt oštećenja membrane je i MDA čija se koncentracija može odrediti uz pomoć TBA (ružičasto obojenje) i izmjeriti na spektrofotometru na 532 i 600 nm (Draper i Hadley, 1990).

Prvo sam pripremio čiste mikroeprovete na kojima sam pomoću igle probušio malu rupicu na čepu. U te mikroeprovete sam stavio 500 μ l prethodno pripremljene puferne otopine za mjerenje lipidne peroksidacije (3.1.3.). Zatim sam dodao 200 μ l prethodno pripremljenog ekstrakta

pohranjenog na -20 °C, odnosno 200 µl 80 %-tnog metanola za slijepu probu. Nakon toga sam perforirane mikroeprevete stavio u vodenu kupelj na 80 °C, 30 minuta. Kada je inkubacija završila prebacio sam uzorke na led, 5 minuta, kako bi se ohladili. Uzorke sam zatim centrifugirao na 13 500 rpm (4 °C) kako bih uklonio talog. Nakon centrifugiranja pažljivo sam otpipetirao 200 µl supernatanta u mikrotitarsku pločicu. Za svaki pojedini tretman sam radio po tri tehničke replike. Nakon toga sam mjerio apsorbanciju na 532 i 600 nm.

Apsorbancija se očitava na 532 nm nakon oduzimanja nespecifične apsorbancije na 600 nm, a MDA ekvivalentni se računaju prema formuli:

$$\text{nmol MDA / g s.t.} = \frac{\Delta A(\text{korigirano}) * f.r. * x * 1000}{\epsilon * b * y}$$

Pri čemu je:

- $\Delta A(\text{korigirano}) = A_{532} - A_{600}$ korigirano s ΔA od slijepe probe
- f.r. = faktor razrjeđenja (3,5)
- x = volumen metanola korišten za ekstrakciju (1 ml)
- 1000 = konverzijski faktor (nmol \rightarrow µmol)
- ϵ = ekstinkcijski koeficijent (155 mM⁻¹ cm⁻¹)
- b = duljina puta svjetlosti (0,56 cm za 200 µl)
- y = količina suhe stvari korištena za ekstrakciju (g)

3.2.5.5. Folin-Ciocalteu metoda za određivanje ukupnih fenola

Metoda Folin-Ciocalteu, pomoću koje sam odredio količinu ukupnih fenola, se temelji na reakciji Folin-Ciocalteu reagensa s reducirajućim reagensom (fenolnim spojem/antioksidansom). U reakciji koja traje dva sata ukupni fenoli iz uzorka izreagiraju sa Folin-Ciocalteu reagensom gdje dolazi do redukcije kiselina iz reagensa u volframov i molibdenov oksid na što ukazuje i plavo obojenje koje se spektrofotometrijski mjeri na valnoj duljini od 765 nm (Singleton i Rosi, 1965).

Za izradu baždarnog pravca pripremio sam stock otopinu galne kiseline u 80 %-tnom metanolu. Potom sam s 80 %-tnim metanolom napravio razrjeđenja izvorne otopine tako da konačne koncentracije iznose 200, 400, 800, 1000 i 1400 mg GA l⁻¹.

Kako bih u uzorcima odredio količinu ukupnih fenola prvo sam u mikroeprovete stavio 20 µl ekstrakta te dodao 1,58 ml vode i 100 µl Folin-Ciocalteu reagensa. Za slijepu probu umjesto ekstrakta dodao sam 80 %-tni metanol. Mikroeprovete sam zatim dobro začepio i promiješao nakon čega sam u njih dodao 300 µl zasićene otopine natrijevog karbonata i dobro promiješao. Uzorke sam zatim inkubirao na sobnoj temperaturi, u tami, dva sata. Nakon toga uslijedilo je nanošenje uzoraka na mikrotitarsku pločicu (u triplikatu) i mjerenje apsorbancije na 765 nm. Mjerenjem je dobiven baždarni pravac koji pokazuje ovisnost apsorbancije na 765 nm o masenoj koncentraciji galne kiseline.

3.2.6. Analiza ekspresije gena *NAC041*, *NAC084* i *DREB2A*

S obzirom na dosadašnja istraživanja na raštici odlučio sam analizirati ekspresiju gena *NAC041*, *NAC084* i *DREB2A*. Kao referentne gene odabrao sam *OGIO* i *PUX* (Bauer i sur. 2022). Geni iz porodice *NAC* djeluju kao ključni regulatori koji aktiviraju specifične odgovore kod biljaka u stresu. Također, stupaju u interakciju i s drugim transkripcijskim faktorima kako bi omogućili biljkama da prežive nepovoljne uvjete. Poput gena iz porodice *NAC*, *DREB* predstavlja važnu skupinu gena koja igra ključnu ulogu u odgovoru biljaka na stres, a osobito u odgovoru na sušu, hladnoću i salinitet.

3.2.6.1. Uzgoj klijanaca za praćenje genske ekspresije

Za praćenje genske ekspresije, na osnovu morfoloških i biokemijskih parametara, odabrao sam dva najinteresantnija varijeteta divljeg kupusa i dva varijeteta raštike. Protokol za uzgoj je bio isti kao što je već prethodno opisano u poglavljima (3.2.2. - 3.2.4.) osim što je trajanje tretmana bilo 24 h tj. kraće od onog korištenog za biokemijska mjerenja, a broj klijanaca po biološkoj replici 8-15. Razlog tome je što ekspresije gena vremenski prethodi sintezi i akumulaciji metabolita, a trajanje tretmana je odabrano na osnovu prethodnih istraživanja na raštici (Bauer i sur. 2022).

3.2.6.2. Izolacija genomske DNA

Genomsku DNA iz klijanaca divljeg kupusa i raštike izolirao sam koristeći CTAB metodu (Doyle i Doyle, 1987). CTAB je kationski deterdžent koji ovisno o ionskoj jakosti otopine djeluje na biljne metabolite te koji radi micela s lipidima membrana pri čemu se oslobađa sadržaj iz jezgre.

Izolaciju sam započeo tako što sam od svakog varijeteta uzeo po pola listića biljnog materijala (≈ 5 mg) i homogenizirao ga u silamatu sa staklenim kuglicama (400-500 μm , Sigma). U mikroepruvete s biljnim materijalom sam dodao 0,5 ml, već pripremljenog, ekstrakcijskog pufera zagrijanog na 65 °C nakon čega sam ih stavio u vodenu kupelj (65 °C) na inkubaciju tijekom 30 minuta. Uzorke sam tijekom inkubacije povremeno promiješao. Kada su se uzorci malo ohladili dodao sam 0,5 ml mješavine kloroform:izoamil (24:1) koja je također već bila prethodno pripremljena. Uzorke sam zatim stavio na miješalicu 10 minuta, a potom sam ih centrifugirao 10 minuta na 14 000 g pri sobnoj temperaturi. Nakon centrifugiranja nukleinske kiseline su ostale u gornjoj vodenoj fazi koju sam pažljivo prenio u novu, čistu mikroepruvetu. Nakon toga sam dodao već prethodno napravljen precipitacijski pufer u omjeru 2:1 naspram izvađene vodene faze. Nadalje sam uzorke inkubirao 60 minuta na sobnoj temperaturi, a zatim ih centrifugirao 10 minuta na 14 000 g i uklonio supernatant. Nukleinske kiseline tvore okom vidljivi bijeli talog na dnu mikroepruvete. U mikroepruvetu u kojoj je ostao bijeli talog sam dodao 500 μl prethodno pripremljene otopine 1,5 M NaCl i 0,5 μl RNaze (koncentracije 10 ng ml⁻¹). Nakon toga je uslijedila inkubacije uzoraka u trajanju od 30 minuta na 55 °C uz miješanje od 300 okretaja u minuti. Na kraju sam dodao 1 ml hladnog 96 %-tnog etanola i ostavio DNA da se precipitira preko noći na -20 °C.

Sutradan sam centrifugirao uzorke 10 minuta na 14 000 g nakon čega sam uklonio supernatant, a talog isprao s 1 ml 70 %-tnog etanola kako bi se uklonio preostali NaCl. Uzorke sam zatim ponovno centrifugirao 5 minuta na 7 000 g, uklonio supernatant, a preostali talog ostavio da se osuši 15 minuta u kupelji. U mikroepruvete u kojima se nalazi istaložena DNA sam dodao još 50 μl miliQ vode i pospremio u zamrzivač na -20 °C.

3.2.6.3. Izolacija RNA

Izolaciju RNA sam također provodio na odabranim varijetetima divljeg kupusa i raštike koristeći kit *MagMAX Plant RNA Isolation*, ThermoFisher. Svaka biološka replika za izolaciju RNA sadržavala je isti broj klijanaca, no broj klijanaca među varijetetima je bio različit (Tablica 3.) zbog ograničene količine uzgojnog materijala i slabije klijavosti pojedinih varijeteta.

Tablica 3. Prikaz broja klijanaca u različitim varijetetima

Varijetet	Broj klijanaca po biološkoj replici
395	4
415	8
521	9
522	3

Izolaciju sam započeo usitnjavanjem klijanaca divljeg kupusa i raštike. Za razliku od izolacije genomske DNA, ovdje sam za usitnjavanje koristio tarionik kojeg sam prvotno ohladio u tekućem dušiku. Biljni materijal sam zatim stavio u ohlađeni tarionik, prelio tekućim dušikom, te ga homogenizirao dok nisam dobio sitan prah. Usitnjeno tkivo sam zatim prebacio u označene mikroeprevete (za svaki varijetet i tretman sam koristio posebnu mikroeprevetu). U svaki uzorak sam potom dodao 600 µl pufera za lizu, kratko centrifugirao te stavio uzorke u vodenu kupelj na 56 °C. Nakon inkubacije uzorke sam centrifugirao 10 minuta na 16 000 g (sobna temperatura). Nakon centrifuge sam uzeo 400 µl supernatanta i prebacio ga u nove označene mikroeprevete. U svaku mikroeprevetu sam potom dodao 25 µl RNA vezujućih kuglica i 400 µl 96 %-tnog etanola. Uzorke sam onda promiješao 10 sekundi na vorteksu i kratko centrifugirao kako bi se tekućina spustila na dno mikroeprevete. Nakon toga sam mikroeprevete stavio 2 minute na magnetski stalak kako bi se kuglice s RNA nakupile na jednu stranu mikroeprevete. Zbog nakupljanja kuglica na stranu mikroeprevete okrenute prema magnetu pipetom sam mogao ukloniti tekućinu s ostatkom lizata. Poslije toga sam s RNA koja je vezana na kuglice isprao nečistoće pomoću

otopine za ispiranje 1 (700 μl) i ponovio ciklus od 10 sekundi miješanja, centrifugiranja i 2 minute na magnetskom stalku. Kako bi ispario sav etanol, uzorke sam u otvorenim mikroeprevetama ostavio 5 minuta da se osuše. Nakon što su se uzorci posušili u svaki uzorak sam dodao po 200 μl otopine s DNazom koju sam prethodno pripremio. Zatim sam uzorke lagano promiješao i stavio na inkubaciju (30 minuta, 37 °C, 350 rpm). Uzorke sam zatim kratko centrifugirao nakon čega sam dodao 150 μl pufera za ponovno vezanje RNA i 400 μl 96 %-tnog etanola. Ponovio sam ciklus od 10 sekundi miješanja na vorteksu, centrifugiranja i 2 minute na magnetskom stalku. Supernatant sam uklonio pipetom dok su mikroeprevete još bile na stalku, a zatim sam ih maknuo sa stalka i dodao 700 μl otopine za ispiranje 1. Ciklus od 10 sekundi miješanja, kratkog centrifugiranja i 2 minute na stalku sam zatim opet ponovio. Nakon što sam uklonio supernatant dodao sam 700 μl otopine za ispiranje 2 te opet ponovio prethodno spomenut ciklus. Poslije završetka ciklusa, uzorke sam ostavio da se osuše na sobnoj temperaturi. Nakon što je ispario sav etanol uslijedilo je eluiranje RNA s kuglica. Za eluiranje sam dodao 70 μl vode bez nukleaza i uklonio uzorke s magnetskog stalka poslije čega sam ponovio ciklus od 10 minuta miješanja, centrifugiranja i 2 minute na magnetskom stalku. Supernatant s uzorcima RNA sam pomoću pipete prebacio u čistu mikroeprevetu bez micanja mikroepreveta sa stalka. Pomoću uređaja Nanodrop sam spektrofotometrijski mjerio koncentraciju i čistoću (260/230 nm i 260/280 nm) izolirane RNA u uzorcima. Uzorke sam zatim pospremio u zamrzivač na -20 °C.

3.2.6.4. Reverzna transkripcija (RT-PCR)

Za reverznu transkripciju koristio sam po 1 μg prethodno izolirane RNA. Prvo sam u svaku mikroeprevetu za PCR dodao 0,5 μl oligo dT početnica (0,5 $\mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$, Thermo Scientific) i 1 μl dNTP (10 mM). Nakon toga sam dodao još i odgovarajuće volumene izolirane RNA (1 μg RNA u svakom dodanom volumenu) te DEPC vodu (voda bez nukleaza) ukoliko je bilo potrebno kako bi konačni volumen bio 12,5 μl . Ovako pripremljenu smjesu sam inkubirao 5 minuta na 65 °C, a za to vrijeme sam pripremio novu smjesu u koju sam dodao 4 μl 5x RT-PCR pufera, 0,5 μl RNAi (RiboLock RNase inhibitor, Thermo Scientific), 1 μl reverzne transkriptaze (RevertAid H Minus Reverse Transcriptase, Thermo Scientific) i 2 μl DEPC vode (količina potrebna za jedan uzorak). Tu smjesu sam zatim dodao u uzorak koji je sadržavao RNA i inkubirao 45 minuta na 42 °C i

10 minuta na 70 °C. Nakon završetka reakcije u svaku mikroeprevetu sam dodao još i 80 µl DEPC vode kako bi konačna koncentracija cDNA bila 10 ng µg⁻¹.

3.2.6.5. Probir početnica za lančane reakcije polimerazom (PCR)

S obzirom da genom divljeg kupusa nije još sekvenciran, na raspolaganju sam imao početnice (Macrogen) koje su bile dizajnirane za gene srodnog kineskog kupusa. Također, ove početnice su bile prethodno već testirane na genima raštike (Bauer i sur. 2022). Probir setova početnica za referentne gene (*OGIO* i *PUX*) i gene koji su povezani s odgovorom na stres (*NAC041*, *NAC084* i *DREB2A*) se temeljio na testiranju pogodnosti dostupnih početnica za umnažanje gena raštike i divljeg kupusa (Tablica 4). Kao kalup u PCR-u koristio sam izoliranu genomsku DNA te komplementarnu cDNA

Tablica 4. Nazivi gena i sekvence odabranih početnica, njihove temperature topljenja (eng. *melting temperature*, T_m) i očekivane veličine umnoženih fragmenata u parovima baza.

Gen		Sekvenca 5' – 3'	T _m (°C)	Veličina fragmenata (bp)
<i>OGIO</i>	FW	CAGTATCGTAGCTGAGGTAGC	61,3	121
	REV	AGAACGGAACACATACTTGACTC	61,1	
<i>PUX</i>	FW	CAGTTCTTAGAGGCAACAAGC	59,4	96
	REV	GTGTGTACCACCAGATGGAAG	61,3	
<i>NAC041</i>	FW	G TTCAGATTT CACCCGACCGA	61,3	142
	REV	CTCACAATCACCTGGCAAGTC	61,3	
<i>NAC084</i>	FW	AGGAAGAAGACAGAGGAAACC	59,4	108
	REV	GCTGAGGTAGGAGGAGATG	59,5	
<i>DREB2A</i>	FW	AGCTGCAAAGCCTTGGCTCA	60,5	78
	REV	GATCGAAGAAGTCACTACCATCT	61,1	

3.2.6.6. Lančana reakcija polimerazom (PCR)

U PCR reakciji za umnažanje odabranih gena koristio sam Emerald 2x premix (TaKaRa). U svaku mikroeprevetu za PCR sam dodao 10 μl Emerald 2x premixa, 7 μl vode, 1 μl FW početnice za odgovarajući gen ($100 \text{ pmol } \mu\text{l}^{-1}$), 1 μl REV početnice za odgovarajući gen ($100 \text{ pmol } \mu\text{l}^{-1}$) te 1 μl kalupa genomske DNA ($100 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$) ili cDNA ($10 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$). Nakon što sam u mikroeprevete dodao sve potrebne komponentne posložio sam ih u PCR uređaj i podesio sljedeće uvjete reakcije: 3 minute na $98 \text{ }^\circ\text{C}$ što predstavlja početnu denaturaciju, zatim 40 ciklusa od po 10 s na $98 \text{ }^\circ\text{C}$ (denaturacija), 30 s na $56 \text{ }^\circ\text{C}$ (vezanje početnica za kalup), 60 s na $72 \text{ }^\circ\text{C}$ (sinteza), te na kraju završna sinteza na $72 \text{ }^\circ\text{C}$ u trajanju od 7 minuta. Nakon reakcije uzorci su čuvani u zamrzivaču na $-20 \text{ }^\circ\text{C}$.

3.2.6.7. Elektroforeza na agaroznom gelu

Kako bih razdvojio dobivene produkte nakon PCR reakcije koristio sam 2,5 %-tni agarozni gel i 0,5x TBE pufer (3.1.3.). U jažice na gelovima sam dodavao 3 μl DNA markera (Quick-Load Purple, 100 pb DNA Ladder, New England BioLabs) odnosno 10 μl uzorka. Početni napon tijekom elektroforeze je bio 50 V, a nakon nekoliko minuta sam ga pojačao na 100 V. Nakon završetke elektroforeze, koja je trajala 30-ak minuta, uslijedilo je bojanje gelova u otopini etidij bromida (5 minuta). Gelove sam zatim fotografirao, pomoću digitalne kamere namijenjene za slikanje gelova, pod UV svjetlom.

3.2.6.8. Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu (qPCR)

Lančanu reakciju polimerazom u stvarnom vremenu odnosno kvantitativni PCR radio sam na način da sam prvo pripremio „cDNA premix“ (za svaku epruveticu) koji se sastojao od 7,5 μl qPCR-mixa (GoTaq, Promega) i 1 μl cDNA ($10 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$). Zatim sam pripremio „primer premix“ koji se sastojao od 6,1 μl vode, 0,2 μl FW početnice ($100 \text{ pmol } \mu\text{l}^{-1}$) i 0,2 μl REV početnice ($100 \text{ pmol } \mu\text{l}^{-1}$) po uzorku. U svaku epruveticu sam dodao 6,5 μl pripremljenog „primer premixa“, lagano promiješao i dobro ih zatvorio. Nakon toga sam postavio uvjete reakcije: 5 minuta na $95 \text{ }^\circ\text{C}$ što predstavlja početnu denaturaciju, zatim 30 ciklusa po 5 s na $95 \text{ }^\circ\text{C}$ (denaturacija) i 10 s na $60 \text{ }^\circ\text{C}$ (vezanje početnica i elongacija). Krivulja mekšanja amplikona rađena je na način da je temperatura podizana sa $70 \text{ }^\circ\text{C}$ na $95 \text{ }^\circ\text{C}$ brzinom $0,1 \text{ }^\circ\text{C/s}$. Kako bih

izračunao relativnu ekspresiju gena koristio sam $\Delta\Delta$ Ct metodu (Livak i Schmittgen, 2001). Nakon reakcije uzorke sam pospremio u zamrzivač na -20 °C.

3.2.6.9. Statistička obrada podataka

Za statističku obradu podataka dobivenih iz mjerenja biokemijskih parametara koristio sam Studentov T-test u računalnom programu Excel. Razina statističke značajnosti od 0,05 ($p < 0,05$) označena je zvjezdicom (*).

4. REZULTATI

4.1. Procjena otpornosti kultivara raštike i divljeg kupusa testom inhibicije rasta

Preliminarni pokus procjene tolerancije raštike (*Brassica oleracea* var. *acephala*, varijeteti 395, 414 i 415) i divljeg kupusa (*Brassica incana*, varijeteti 514, 518, 519, 520, 521 i 522) na čimbenike abiotičkog stresa proveden je praćenjem prirasta korijena na podlogama s dodatkom NaCl u koncentracijama 150 mM i 300 mM i manitola u koncentracijama 300 mM i 600 mM. Kao kontrola služili su klijanci uzgajani na osnovnoj podlozi (1 %-tni agar) pri temperaturi od 22 °C. Svaki pojedini varijetet uzgajan je na spomenutim podlogama u komorama s različitim temperaturnim režimom (22 °C i temperaturni ciklus s maksimumom na 40 °C). Reprezentativne fotografije prikazane su za 520 varijetet divljeg kupusa na slici 11.



Slika 11. Reprezentativna fotografija testa rasta korijena divljeg kupusa (*Brassica incana*) varijeteta 520 na pločicama koje su rasle: a) na temperaturi 22 °C (kontrola, K), b) uz dodatak 150 mM NaCl (solni stres, S), c) uz dodatak 300 mM manitola (osmotski stres, M), d) na temperaturnom ciklusu uz maksimum od 40 °C (temperaturni stres, T), e) kombinirani stres 150 mM NaCl +T (TS) i f) kombinirani stres 300 mM manitol + T (TM).

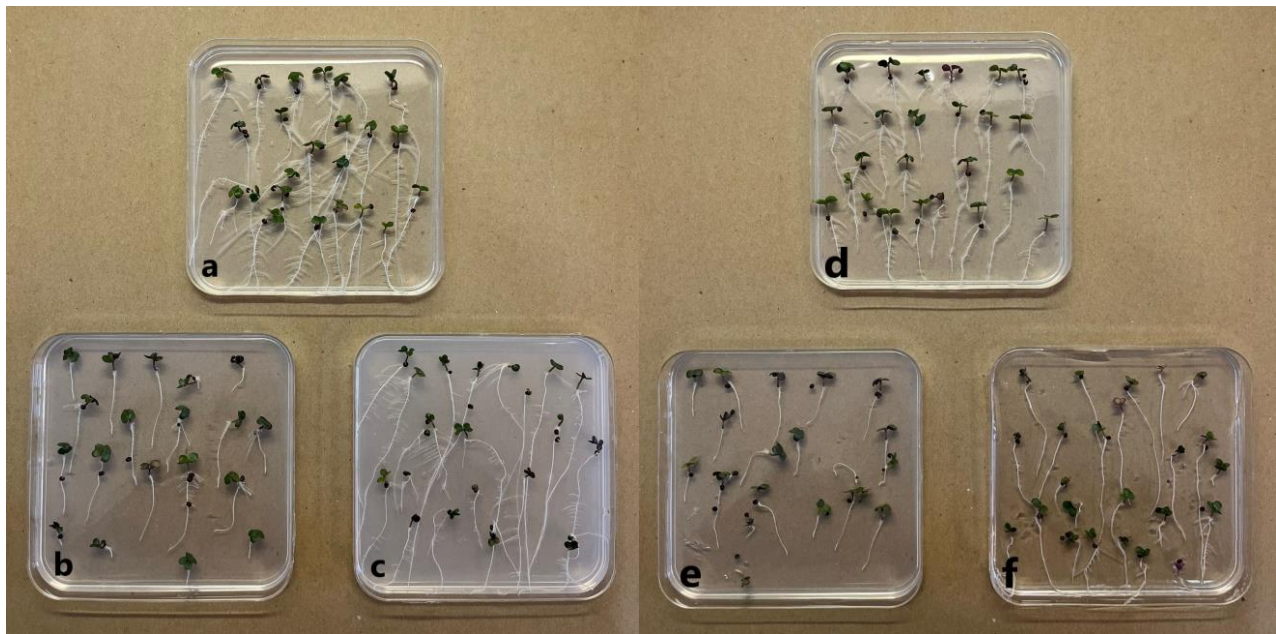
Tablica 5. Usporedni prikaz duljina korijena klijanaca raštike i divljeg kupusa na različitim tretmanima. K -kontrola, S - 150 mM NaCl, M - 300 mM manitol, T – temperatura, TM – 150 mM NaCl + temperatura, TM – 300 mM manitol + temperatura. Podaci su srednja vrijednost n=6.

	Raštika (415)			Divlji kupus (520)		
	Prije tretmana (cm)	Poslije tretmana (cm)	Prirast korijena (cm)	Prije tretmana (cm)	Poslije tretmana (cm)	Prirast korijena (cm)
K	3,568	7,751	4,183	2,396	5,285	2,889
S	3,192	3,394	0,202	2,326	2,449	0,123
M	3,011	5,081	2,07	2,11	2,747	0,637
T	3,139	5,422	2,283	3,077	4,778	1,701
TS	3,577	3,603	0,026	2,661	2,661	0
TM	3,808	5,352	1,544	3,022	3,580	0,558

Testovi rasta korijena dali su vrlo slične rezultate za raštiku i divlji kupus. Primjer prirasta korijena na tretmanima prikazan je za raštiku (varijetet 415) i divlji kupus (varijetet 520), (Tablica 5.). Obje koncentracije NaCl rezultirale su značajnom inhibicijom rasta klijanaca kako na 22 °C tako i na 40 °C. Najveći rast primijećen je na kontrolama (2,18 puta za 395 varijetet raštike i 2,2 puta za 520 varijetet divljeg kupusa), zatim na temperaturnom stresu (1,72 puta za 395 varijetet raštike i 1,55 puta za 520 varijetet divljeg kupusa) te na tretmanu manitolom.

4.2. Morfološka analiza klijanaca divljeg kupusa

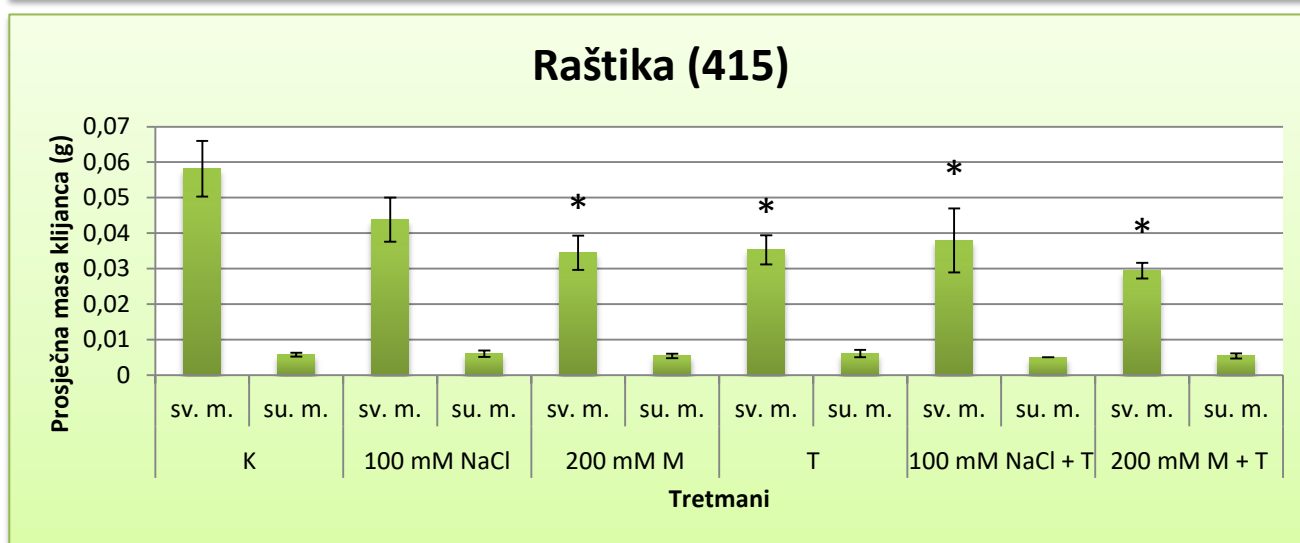
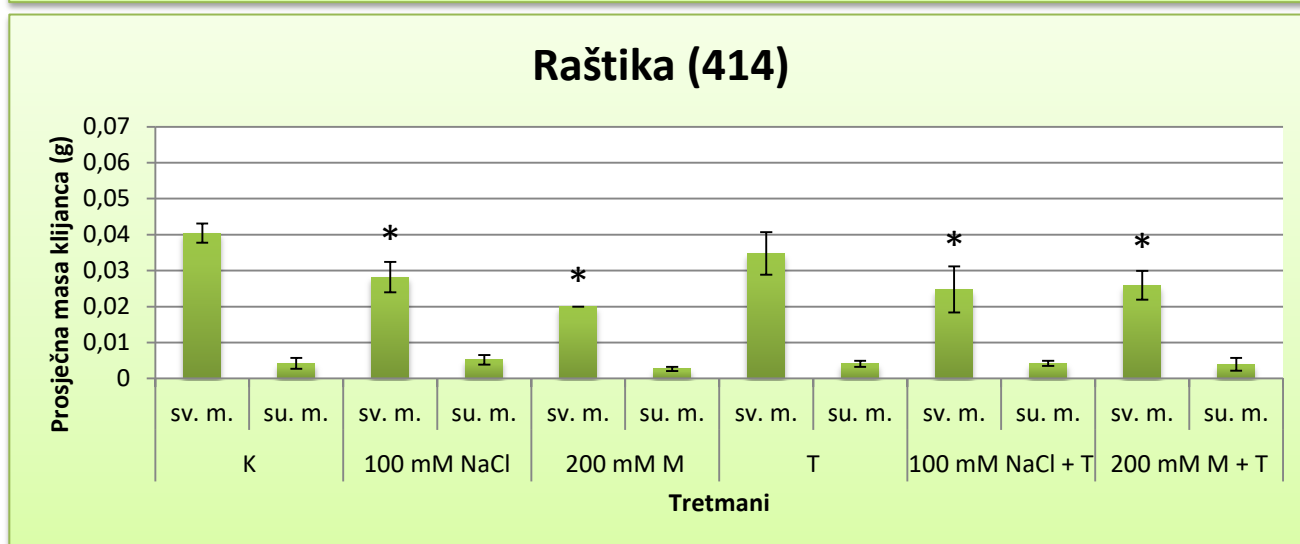
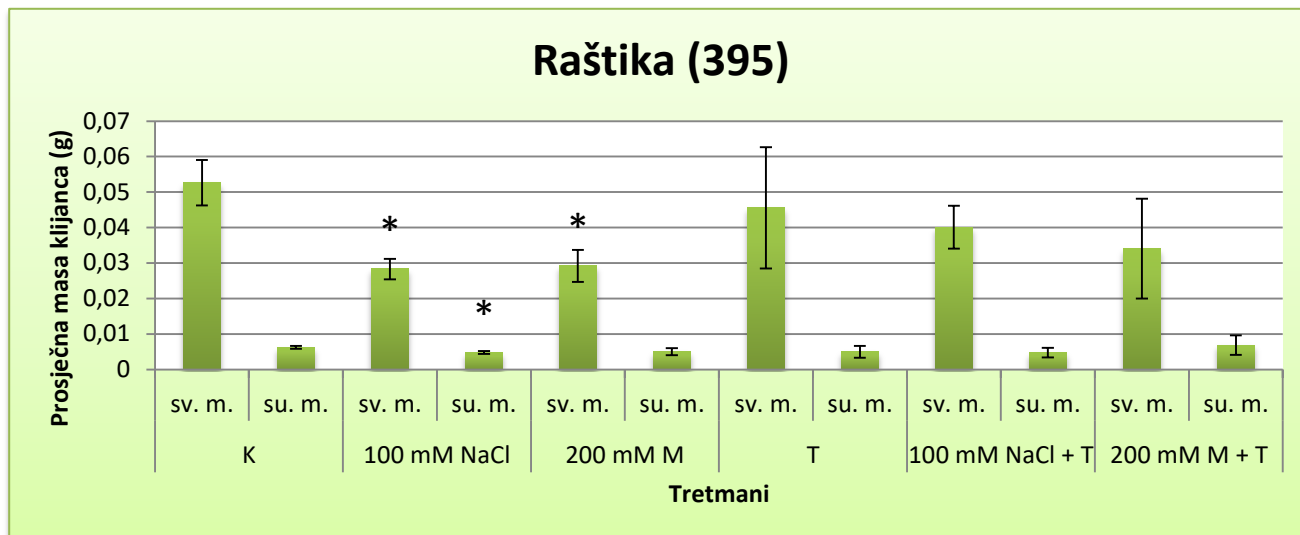
Na osnovi rezultata testa inhibicije rasta odlučio sam kako je za istraživanja mehanizma tolerancije potrebno postići uvjete u kojima dolazi do djelomične inhibicije, gdje rast nije potpuno zaustavljen, te sam tako odlučio koristiti NaCl u 100 mM koncentraciji te manitol u 200 mM koncentraciji. Klijanci na kontrolnoj podlozi očekivano su zabilježili najveći prirast (Slika 12.). Temperaturni stres nije uzrokovao značajne inhibicije u rastu dok je solni stres uzrokovao izraženu inhibiciju rasta korijena, a manitol značajnu inhibiciju u rastu kotiledona.



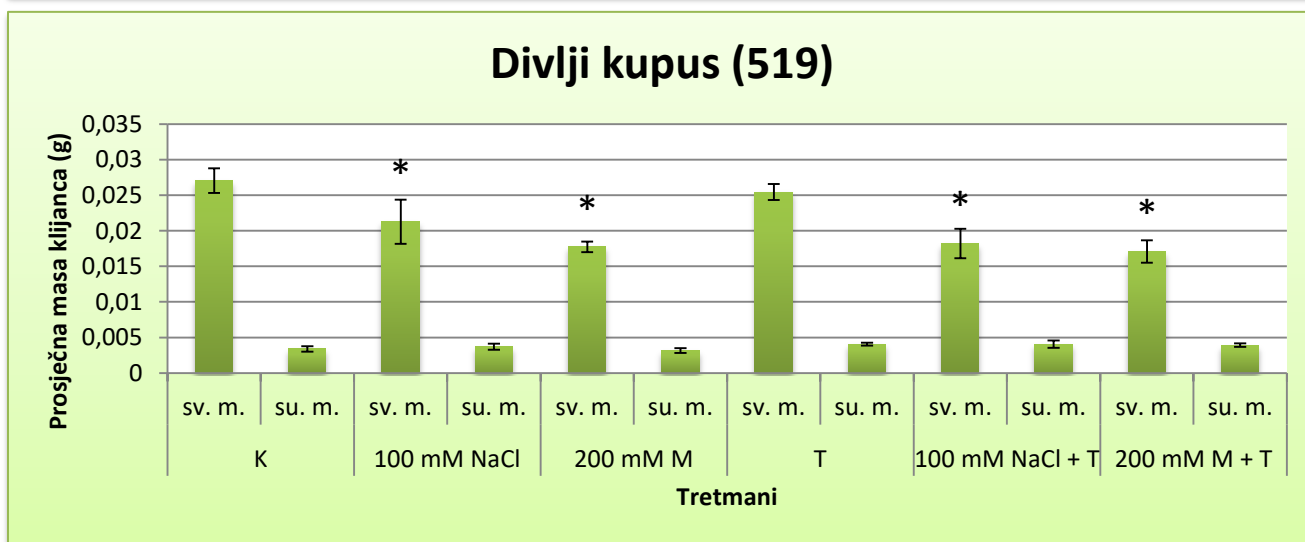
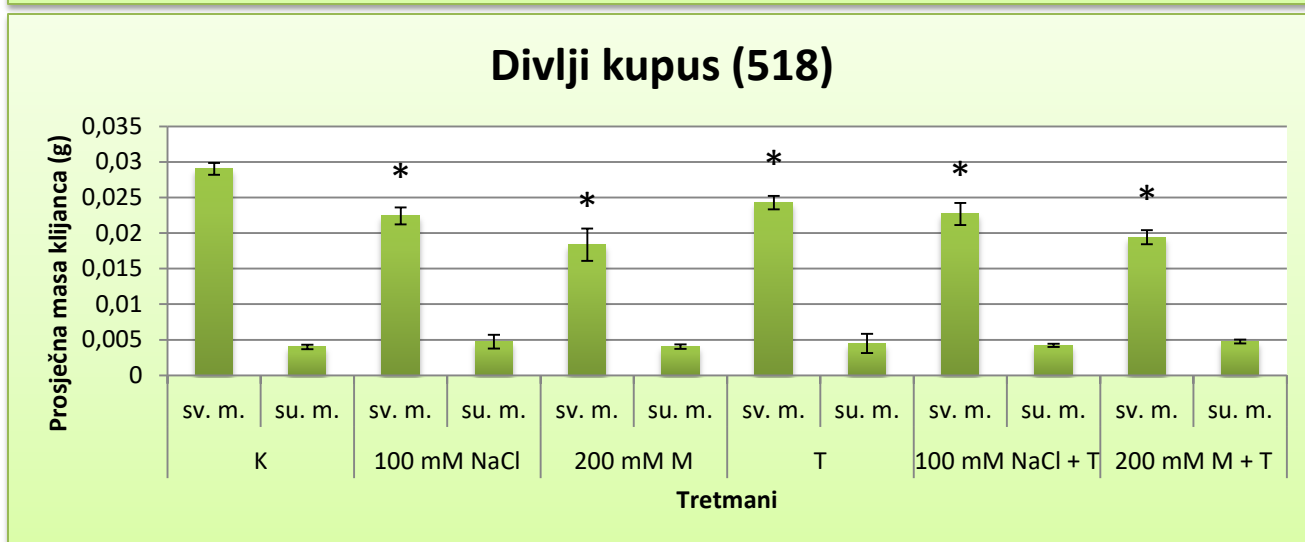
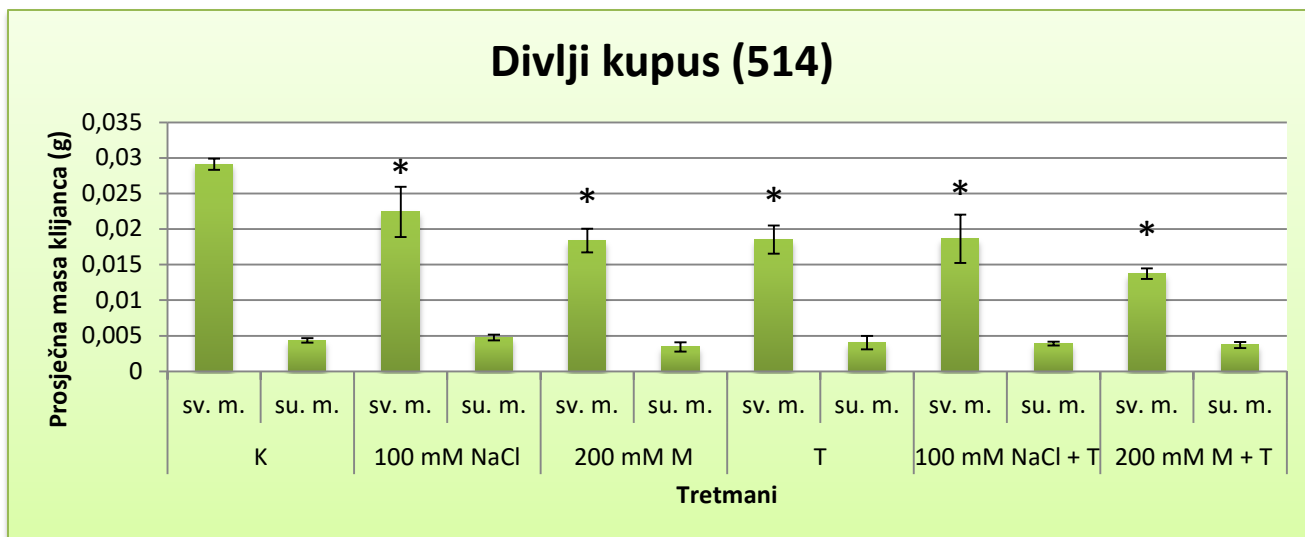
Slika 12. Reprezentativne fotografije klijanaca divljeg kupusa tretiranih 7 dana za biokemijska mjerenja: a) u kontrolnim uvjetima u usporedbi s klijancima izloženim b) solnom stresu (100 mM NaCl), c) osmotskom stresu (200 mM manitol), d) temperaturnom stresu, e) kombiniranom solnom i temperaturnom stresu i f) kombiniranom temperaturnom i osmotskom stresu.

Klijanci su kvantitativno analizirani mjerenjem biomase tj. određena je prosječna svježa masa (sv. m.) i suha masa (su. m.), nakon liofilizacije, po jednom klijancu za varijetete raštike (Slika 13.) i divljeg kupusa za kontrolne i tretirane klijance (Slika 14a. i 14b.).

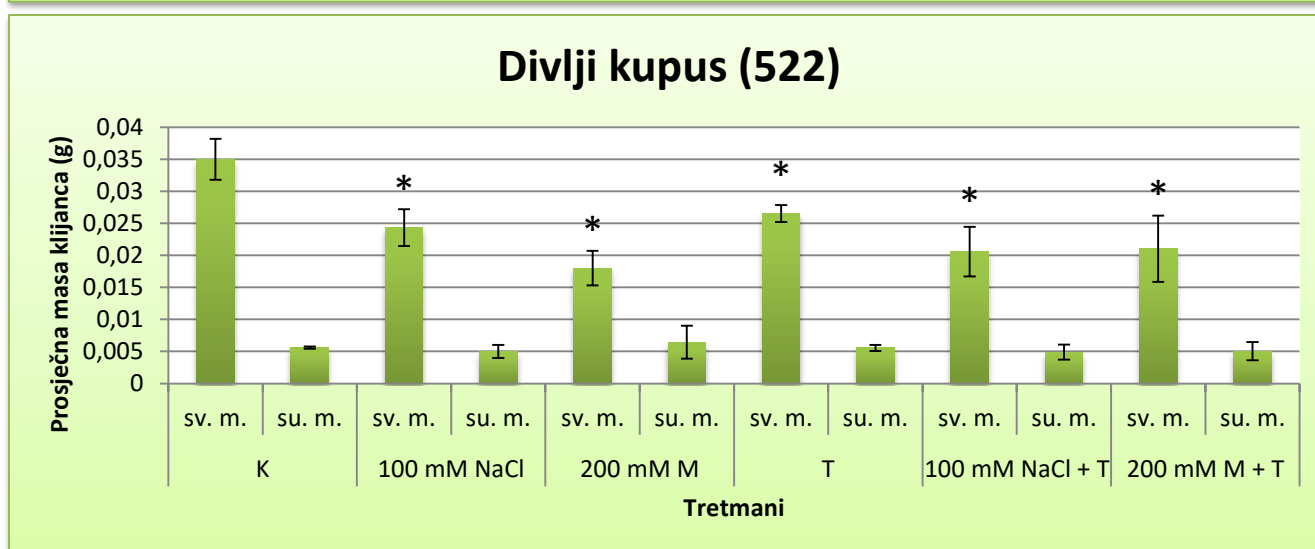
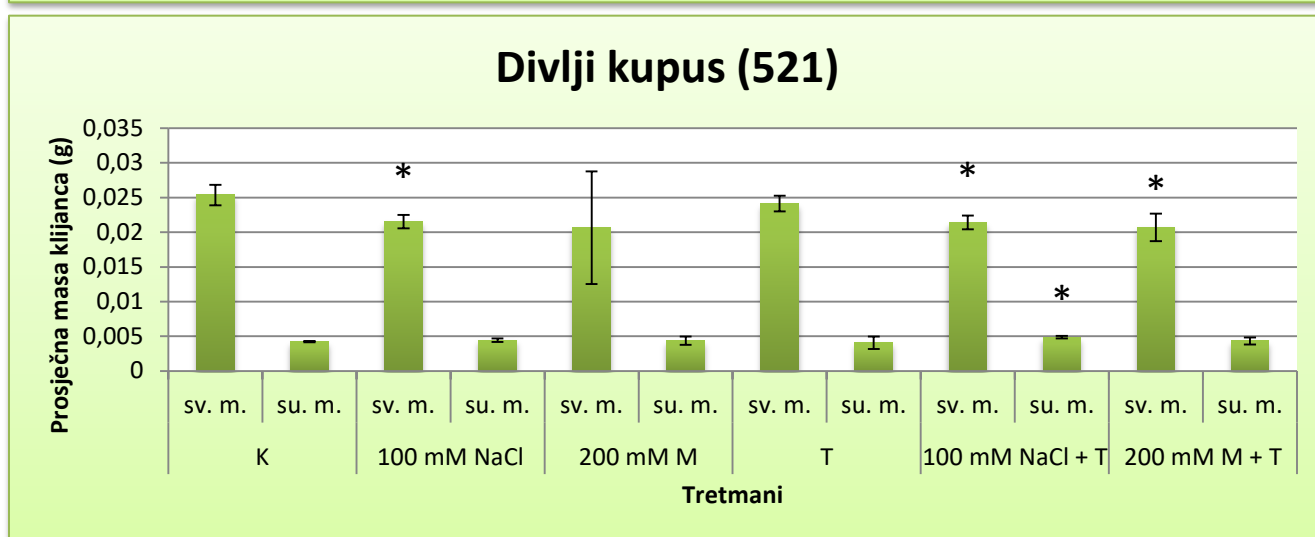
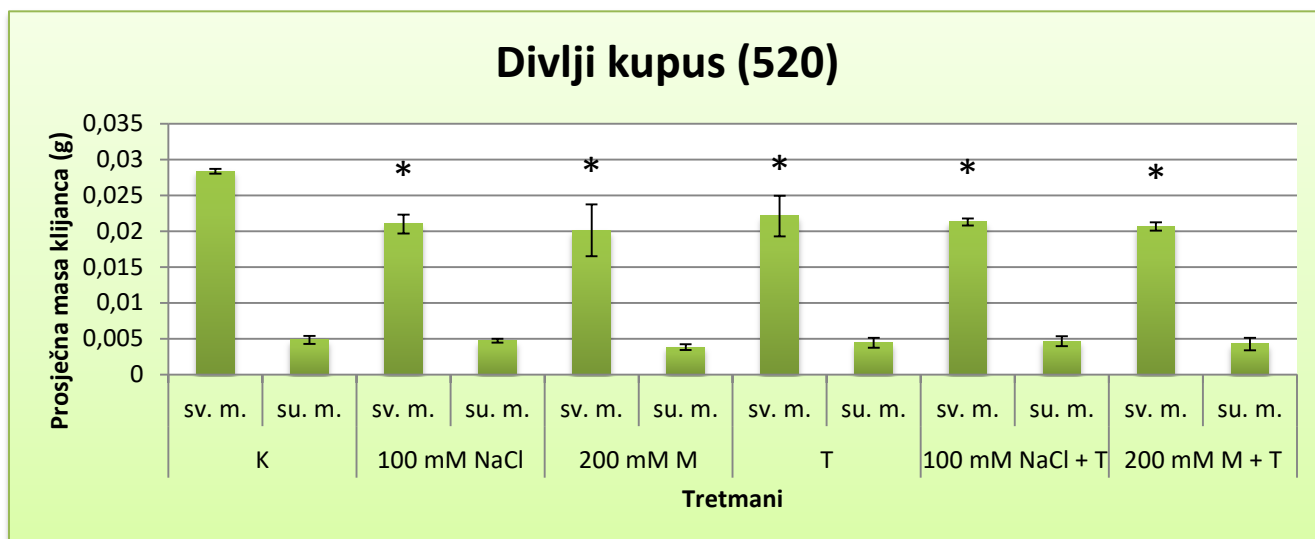
Solni (46,2 %) i osmotski stres (44,4 %) je kod 395 varijeteta raštike prouzročivao statistički značajno smanjenje svježe mase, dok je kod varijeteta 414 statistički značajno smanjenje svježe mase, osim kod solnog i osmotskog, zabilježeno i na kombiniranim stresovima. Kod varijeteta 414 najveće smanjenje bilo je na osmotskog stresu gdje je došlo do smanjenja za 50,5 % u odnosu na pripadajuću kontrolu. Temperaturni tretmani u varijetetu 395 nisu uzrokovali statistički značajne promjene svježe mase. Kod varijeteta 415 statistički značajno smanjenje svježe mase zabilježeno je na svim tretmanima izuzev solnog stresa, a najveće smanjenje od 49,5 % u odnosu na kontrolu zabilježeno je kod kombiniranog temperaturno-osmotskog stresa. Što se tiče suhe mase, statistički značajno smanjenje zabilježeno je samo kod varijeteta 395 na tretmanu s dodatkom soli i iznosilo je 23,5 %.



Slika 13. Prosječna svježa (sv. m.) i suha (su. m.) masa klijanaca raštike (*Brassica oleracea* var. *acephala*) na tretmanima: K – kontrola, M – manitol, T – temperatura. * predstavlja statistički značajnu razliku između kontrole i svakog pojedinog tretmana ($p < 0,05$), $n = 3-25 \pm SD$.



Slika 14a. Prosječna svježa (sv. m.) i suha (su. m.) masa klijanaca divljeg kupusa (*Brassica incana*) na tretmanima: K – kontrola, M – manitol, T – temperatura. * predstavlja statistički značajnu razliku između kontrole i svakog pojedinog tretmana ($p < 0,05$), $n = 3-25 \pm SD$.



Slika 14b. Prosječna svježa (sv. m.) i suha (su. m.) masa klijanaca divljeg kupusa (*Brassica incana*) na tretmanima: K – kontrola, M – manitol, T – temperatura. * predstavlja statistički značajnu razliku između kontrole i svakog pojedinog tretmana ($p < 0,05$), $n = 3-25 \pm SD$.

Primijećeno je da klijanci divljeg kupusa u kontrolnim uvjetima akumuliraju manju biomasu u odnosu na raštiku, ali je manje izraženo smanjenje biomase u uvjetima stresa. Tako je kod varijeteta 514, 518, 520 i 522 zabilježeno statistički značajno smanjenje svježe mase na svim tretmanima u usporedbi s kontrolom. Kod varijeteta 519 i 521 na temperaturnom stresu nije zabilježena statistički značajna razlika u smanjivanju svježe mase, a u oba slučaja je najveće smanjenje zabilježeno na kombiniranom temperaturno-osmotskom tretmanu i iznosilo je 36,8 % za varijetet 519 i 18,4 % za varijetet 521. Osmotski i kombinirani temperaturno-osmotski stres u svim slučajevima uzrokovali najveće smanjenje mase. Kod varijeteta 514 na temperaturno-osmotskom stresu zabilježeno smanjenje svježe mase za 53 %. Što se tiče suhe mase, statistički značajna promjena zabilježena je samo na kombinirano temperaturno-solnom stresu gdje je u odnosu na kontrolu došlo do povećanja za 13,2 %.

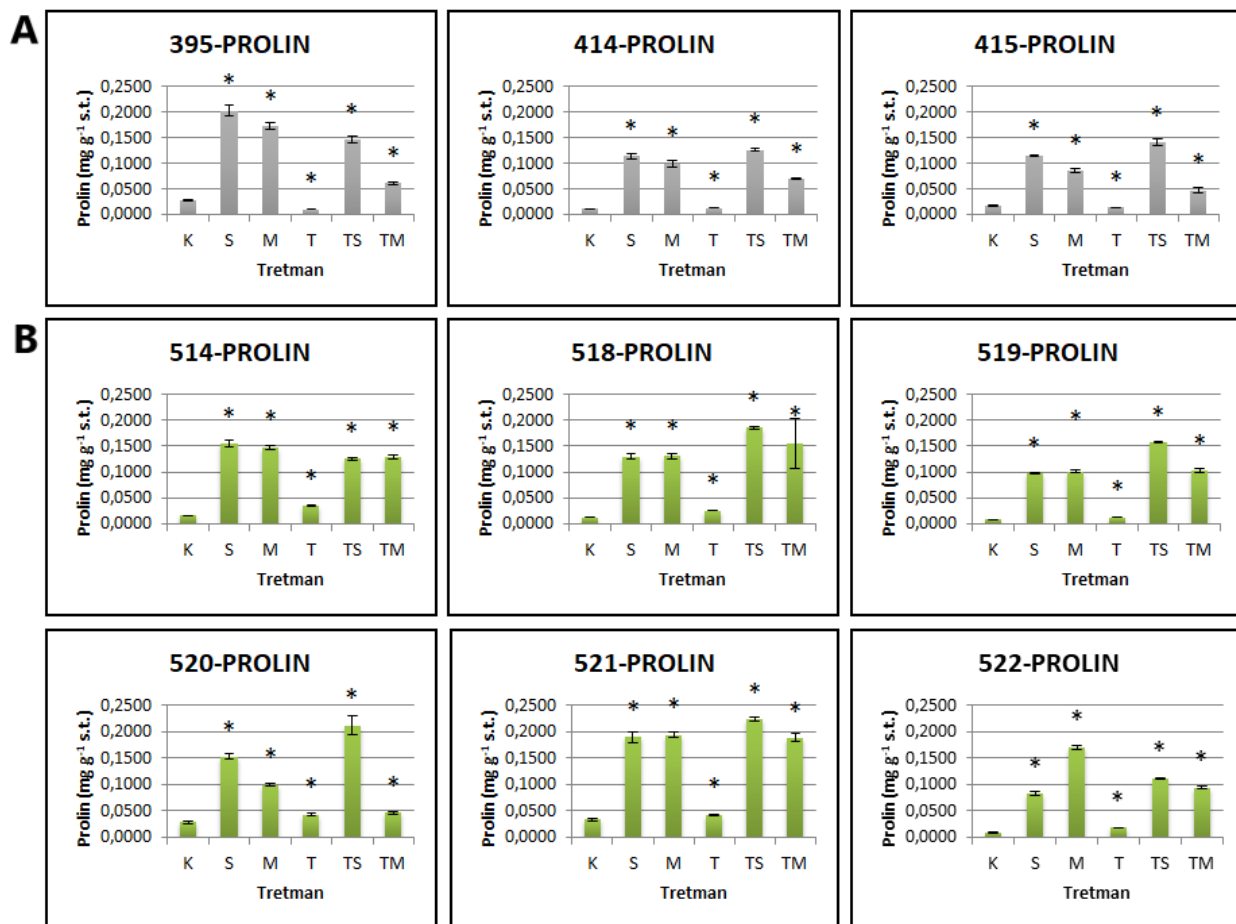
4.3. Analiza biokemijskih parametara stresa

4.3.1. Sadržaj prolina

Različiti faktori stresa u biljkama potiču akumulaciju prolina gdje on najčešće djeluje kao kompatibilni osmolit. Na slici 15. prikazali su rezultati mjerenja prolina u klijancima varijeteta raštike (A) i divljih kupusa (B) tretirani različitim čimbenicima stresa u odnosu na kontrolne klijance.

Na temelju rezultata dobivenih mjerenjem količine prolina može se vidjeti kako je statistički značajan porast prolina zabilježen kod svih tretmana u odnosu na kontrolu u obje vrste kupusnjača. Kod raštike su solni i kombinirani temperaturno-solni stres uzrokovali najveće povećanje prolina. U varijetetu 395 najveće zabilježeno povećanje sadržaja prolina bilo je na solnom stresu i iznosilo je 7,4 puta u odnosu na kontrolu. Kod varijeteta 414 na solnom stresu sadržaj prolina povećan je 10,6 puta, a na kombiniranom temperaturno-solnom stresu 11,75 puta. Na temperaturnom stresu je kod varijeteta 395 (2,8 puta) i 415 (1,3 puta) zabilježeno čak i smanjenje prolina u odnosu na njihovu kontrolu. Kombinirani temperaturno-solni stres je i kod varijeteta 415 uzrokovao najveći porast prolina (8,1 puta).

Kod divljih kupusa kombinirani temperaturno-solni stres uzrokovao je najveće povećanje prolina (11,7 puta), dok je najmanje povećanje zabilježeno na temperaturnom stresu (1,86 puta), isto kao i kod raštike. Najveće povećanje prolina na temperaturno-solnom stresu u usporedbi s kontrolnom bilo je kod varijeteta 519 i iznosilo je 20,1 puta.



Slika 15. Količina prolina izmjerena u varijetetima (A) raštike (*Brassica oleracea* var. *acephala*) i (B) divljeg kupusa (*Brassica incana*). Količina prolina je izražena u mg po g suhe stvari (s.t.). K - kontrola, S – 100 mM NaCl, M – 200 mM manitol, T – temperaturni stres, TS – 100 mM NaCl + temperatura, TM – 200 mM manitol + temperatura. * predstavlja statistički značajnu razliku između kontrole i svakog pojedinog tretmana ($p < 0.05$), $n=10-60 \pm SD$.

Tretmani s manitolom su uz tretmane s dodatkom soli uzrokovali također dosta velik porast sadržaja prolina. U usporedbi s kontrolama, najveći porast na tretmanu s manitolom zabilježen je kod varijeteta 522, a povećanje je bilo 20,5 puta. Najveće povećanje na temperaturnom stresu u odnosu na kontrolu bilo je kod varijeteta 522 te je iznosilo 2,2 puta.

4.3.2. Antioksidacijska aktivnost

Za mjerenje antioksidacijske aktivnosti spojeva prisutnih u ekstraktima raštike i divljeg kupusa (Slika 16.) koristio sam DPPH metodu.



Slika 16. Antioksidacijska aktivnost mjerena DPPH metodom u varijetetima (A) raštike (*Brassica oleracea* var. *acephala*) i (B) divljeg kupusa (*Brassica incana*). Antioksidacijska aktivnost je izražena u mg ekvivalenata Troloxa po g suhe stvari (s.t.). K - kontrola, S – 100 mM NaCl, M – 200 mM manitol, T – temperaturni stres, TS – 100 mM NaCl + temperatura, TM – 200 mM manitol + temperatura. * predstavlja statistički značajnu razliku između kontrole i svakog pojedinog tretmana ($p < 0.05$), $n=10-60 \pm SD$.

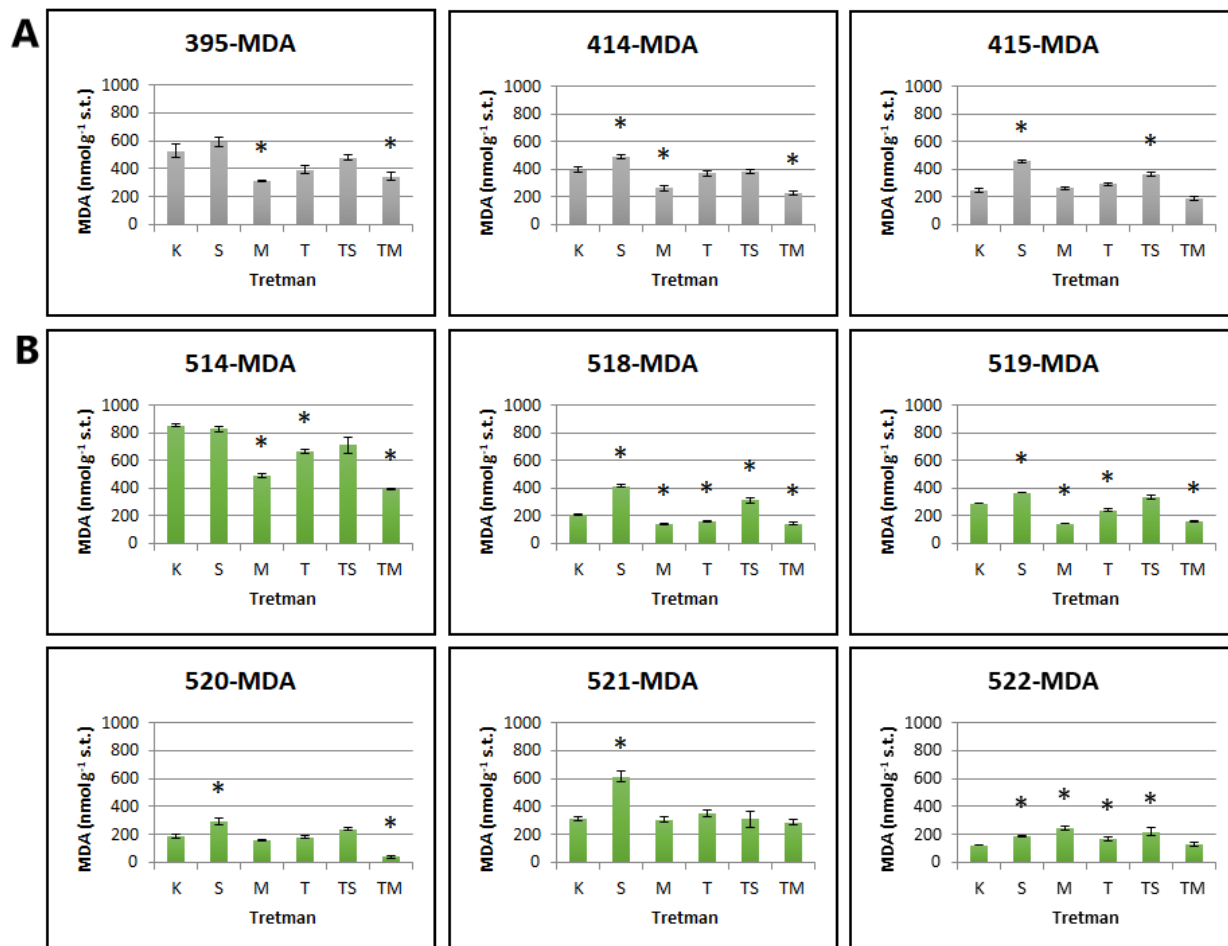
Kod raštike je statistički značajna razlika zapažena kod pojedinih tretmana u varijetetima 414 i 415 u odnosu na njihove kontrole. Solni i kombinirani temperaturno-solni stres su kod ova dva varijeteta uzrokovali najveći porast antioksidacijske aktivnosti (1,3 puta i 1,25 puta) za varijetet 414 i (1,3 puta i 1,5 puta) za varijetet 415. Kombinirani temperaturno-osmotski tretman kod ovih varijeteta nije doveo do statistički značajne razlike. Također, u klijancima varijeteta 395 na tretmanima nije uočena statistički značajna razlika u antioksidacijskoj aktivnosti u odnosu na

kontrolu. Kod 514 varijeteta divljeg kupusa na tretmanima, osim na osmotskom gdje je povećanje bilo 1,25 puta, nije došlo do statistički značajne promjene u antioksidacijskoj aktivnosti kao ni kod varijeteta 520. Varijetet 518 zabilježio je smanjenje antioksidacijske aktivnosti na svim tretmanima, osobito na solnom (1,2 puta) i temperaturnom (1,1 puta) stresu. Kod varijeteta 519 solni stres je kao i kod varijeteta 518 uzrokovao statistički značajno smanjenje antioksidacijske aktivnosti za 1,1 puta. Statistički značajno povećanje kod varijeteta 521 zabilježeno je na solnom (1,2 puta) i osmotskom (1,1 puta) stresu, dok je najveće povećanje zabilježeno kod varijeteta 522 na osmotskom stresu i iznosilo je 1,3 puta.

4.3.3. Stupanj lipidne peroksidacije

Mjerenje koncentracije MDA je obično korišten parametar kao mjera peroksidacije lipida u biljnom tkivu koja se povećava u uvjetima oksidativnog stresa. Na temelju dobivenih rezultata (Slika 17.) može se vidjeti kako solni i kombinirani solno-temperaturni stres kod raštike dovode do povećane produkcije MDA. Najveći porast MDA u odnosu na kontrolu na ova tretmana zabilježen je kod varijeteta 415 i iznosio je 1,9 puta za solni i 1,5 puta za kombinirani stres. Kod svih varijeteta raštike uočen je trend smanjivanja razine MDA na tretmanima koji su sadržavali manitol, a najveća bazalna razina MDA zabilježena je kod 395 varijeteta raštike.

Kod 514 varijeteta divljeg kupusa zabilježene su najveće količine MDA koje su se na tretmanima smanjivale u odnosu na kontrolu, a najveće smanjenje bilo je na osmotskom (1,75 puta) i kombiniranom temperaturno-osmotskom (2,2 puta) stresu. Smanjenje MDA na tretmanima koji su sadržavali manitol zamijećeno je još i kod varijeteta 518, 519 i 520. Najveću produkciju MDA uzrokovao je, kao i kod raštike, solni stres i to 1,6 puta. Na solnom stresu kod varijeteta 521 došlo je do dvostrukog povećanja razine MDA u odnosu na pripadajuću kontrolu. Najniže razine MDA izmjerene su kod 520 i 522 varijeteta divljeg kupusa.

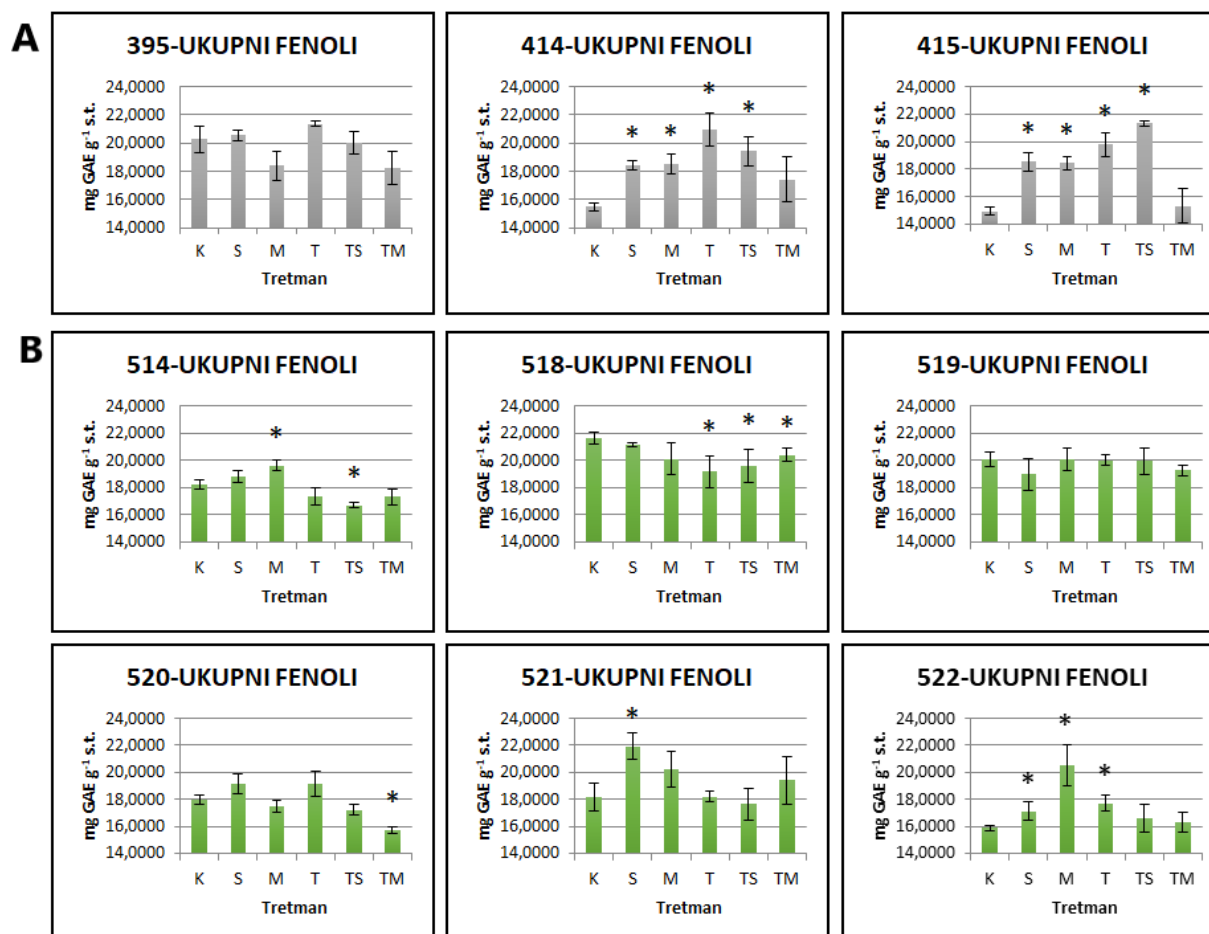


Slika 17. Lipidna peroksidacija izražena kao količina MDA u nmol po g suhe tvari (s.t.) u varijetetima (A) raštike (*Brassica oleracea* var. *acephala*) i (B) divljeg kupusa (*Brassica incana*). K - kontrola, S – 100 mM NaCl, M – 200 mM manitol, T – temperaturni stres, TS – 100 mM NaCl + temperatura, TM – 200 mM manitol + temperatura. * predstavlja statistički značajnu razliku između kontrole i svakog pojedinog tretmana ($p < 0.05$), $n=10-60 \pm SD$.

4.3.4. Ukupni fenoli

Promjene u količini ukupnih fenola u klijancima kupusnjača uslijed tretmana stresnim čimbenicima prikazane su na slici 17. Kod varijeteta 395 raštike među tretmanima nije zabilježena statistički značajna razlika dok je kod varijeteta 414 i 415 statistički značajna razlika bila na svim tretmanima osim na kombinaciji temperature i manitola. Kod 414 najveće povećanje sadržaja ukupnih fenola bilo je na temperaturnom stresu i iznosilo je 1,35 puta, dok je kod

varijeteta 415 najveće povećanje u odnosu na kontrolu bilo na temperaturnom (1,3 puta) i kombiniranom temperaturno-solnom (1,4 puta) stresu. Među varijetetima divljeg kupusa nije uočen zajednički trend, odnosno svaki varijetet pokazuje različiti odgovor na različite tretmane. Kod varijeteta 514 najveći porast zabilježen je na osmotskom stresu (1,1 puta), dok se na tretmanima koji su uključivali temperaturu količina ukupnih fenola smanjivala. U varijetetu 518 je na tretmanima s temperaturom došlo do statistički značajnog smanjivanja u odnosu na kontrolu.



Slika 18. Ukupni fenoli u varijetetima (A) raštike (*Brassica oleracea* var. *acephala*) i (B) divljeg kupusa (*Brassica incana*). Ukupni fenoli izraženi su u mg ekvivalenta galne kiseline (GAE) po g suhe stvari (s.t.). K - kontrola, S - 100 mM NaCl, M - 200 mM manitol, T - temperaturni stres, TS - 100 mM NaCl + temperatura, TM - 200 mM manitol + temperatura. * predstavlja statistički značajnu razliku između kontrole i svakog pojedinog tretmana ($p < 0.05$), $n=10-60 \pm SD$.

Kod varijeteta 519 i 520 na tretmanima nije zabilježena statistički značajna promjena izuzev na kombiniranom stresu kod varijeteta 520 gdje je došlo do smanjenja za 1,15 puta. Najveći porasti u odnosu na kontrolu zabilježeni su kod varijeteta 521 na solnom stresu (1,2 puta) i varijeteta 522 na osmotskom stresu (1,3 puta). Najveće količine ukupnih fenola kod divljih kupusa izmjerene su u varijetetima 518, 519 i 521.

4.4. Analiza ekspresije gena

Analiza ekspresije gena od interesa (*NAC041*, *NAC084* i *DREB2A*) provedena je na odabranim varijetetima raštike (395 i 415) te divljeg kupusa (521 i 522) koji su pokazali različit odgovor na stres na osnovu morfoloških i biokemijskih parametara.

4.4.1. Izolacija nukleinskih kiselina

Iz klijanaca raštike varijeteta 395 i 415 te klijanaca divljeg kupusa varijeteta 521 i 522 izolirao sam DNA i RNA. Izmjerena koncentracija DNA u uzorcima bila je u rasponu od 56,5 do 221,5 ng μg^{-1} (Tablica 6.), dok je koncentracija za RNA bila u raponu od 74 do 432,2 ng μg^{-1} (Tablica 7.). Omjeri apsorbancija 260/230 i 260/280 za DNA i RNA kod pojedinih tretmana bili su vrlo niski što govori da nukleinske kiseline kod pojedinih uzoraka nisu bile najbolje čistoće.

Tablica 6. Koncentracije izolirane genomske DNA iz dva varijeteta raštike (395 i 415) i dva varijeteta divljeg kupusa (521 i 522) s pripadajućim omjerima apsorbancija na 230 nm, 260 nm i 280 nm.

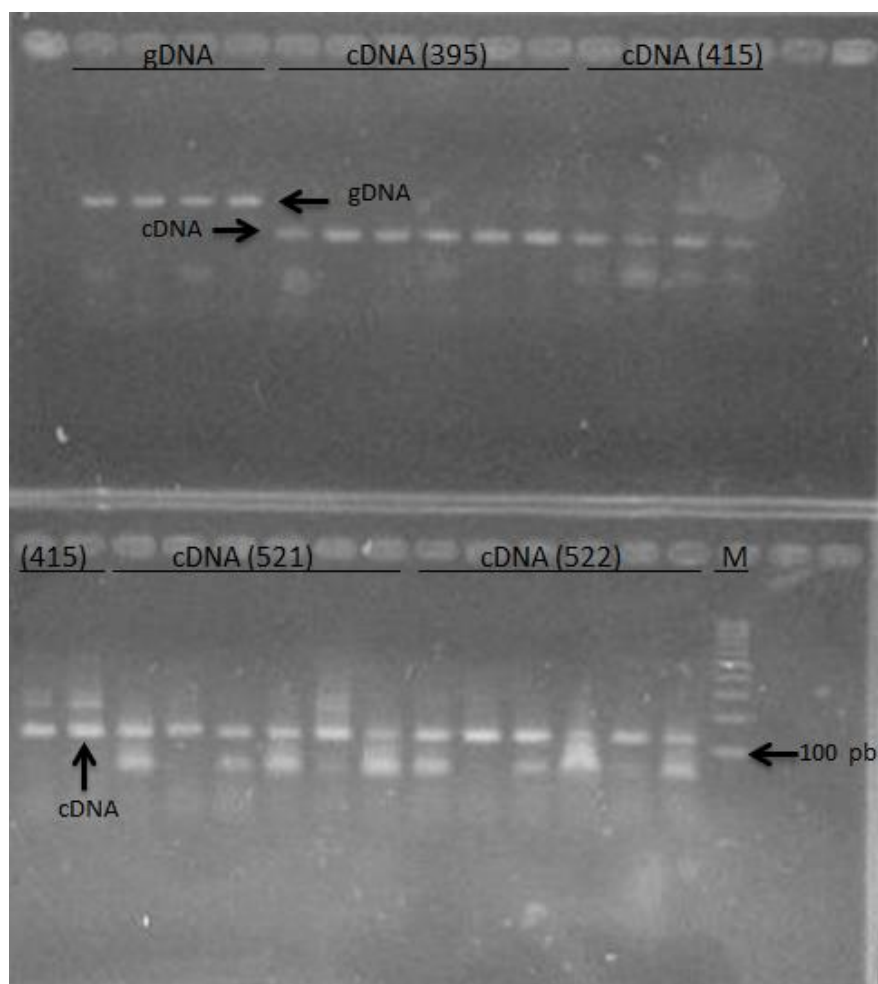
Replika 1	DNA (ng/ μl)	A (260/230)	A (260/280)
395	216,5	2,144	1,711
415	169	2,074	1,625
521	221,5	1,538	1,477
522	56,5	1,712	1,468

Tablica 7. Koncentracije izolirane RNA iz dva varijeteta raštike (395 i 415) i dva varijeteta divljeg kupusa (521 i 522) s pripadajućim omjerima apsorbancija na 230 nm, 260 nm i 280 nm. K - kontrola, S – 100 mM NaCl, M – 200 mM manitol, T – temperaturni stres, TS – 100 mM NaCl + temperatura, TM – 200 mM manitol + temperatura.

Replika 1	Tretman	RNA (ng/μl)	A (260/230)	A (260/280)
395	K	395,2	1,861	2,157
	S	408,4	2,024	2,19
	M	302	1,492	2,139
	T	162,4	1,041	2,16
	TS	231,2	1,424	2,149
	TM	221,6	0,957	2,123
415	K	375,2	1,85	2,094
	S	423,2	2,19	2,155
	M	351,6	2,181	2,123
	T	247,2	1,776	2,109
	TS	357,2	2,2	2,111
	TM	284	1,797	2,094
521	K	386	1,973	2,098
	S	400,8	1,876	2,096
	M	395,2	1,23	2,102
	T	178,4	1,582	2,124
	TS	209,2	1,634	2,117
	TM	255,2	1,988	2,106
522	K	162,8	0,766	1,553
	S	74	1,034	2,5
	M	88,4	1,700	2,125
	T	86,4	0,331	2,160
	TS	258	0,798	2,147
	TM	106	0,602	2,172

4.4.2. Testiranje početnica za umnažanje gena *OGIO*

Nakon odabira početnica za umnažanje specifičnih gena raštike i divljeg kupusa testirao sam njihovu pogodnost koristeći kao kalup, u PCR-u, gDNA (genomsku DNA) i cDNA (komplementarnu DNA). Zbog opsežnosti rezultata prikazat ću samo jedan primjer kojim sam potvrdio kako su odabrane početnice pogodne za umnažanje specifičnih gena. U odabranom primjeru sam testirao početnice za umnažanje gena *OGIO*. U svim uzrocima cDNA (Slika 19.) došlo je do umnažanja fragmenta gena *OGIO* čija je veličina bila 121 pb kako se i očekivalo.

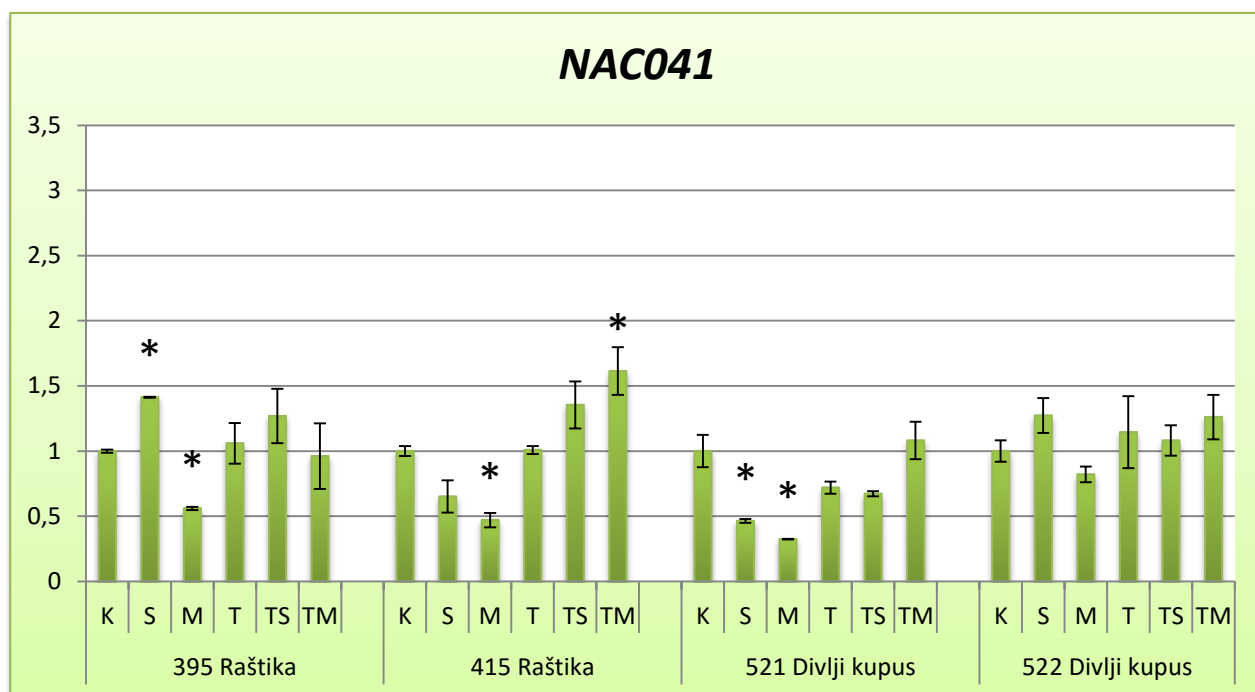


Slika 19. Umnažanje gena *OGIO* kod dva varijeteta (395 i 415) raštike (*Brassica oleracea* var. *acephala*) i dva varijeteta (521 i 522) divljeg kupusa (*Brassica incana*) lančanom reakcijom polimeraze (PCR) na kalupu genomske DNA (gDNA) i komplementarne DNA (cDNA). M – marker (Quick-Load Purple, 100 pb DNA Ladder, New England BioLabs).

4.4.3. Kvantitativna ekspresija gena *NAC041*, *NAC084* i *DREB2A*

Na klijancima raštike i divljeg kupusa, izlaganim različitim faktorima stresa, analizirao sam ekspresiju transkripcijskih faktora *NAC041*, *NAC084* i *DREB2A*.

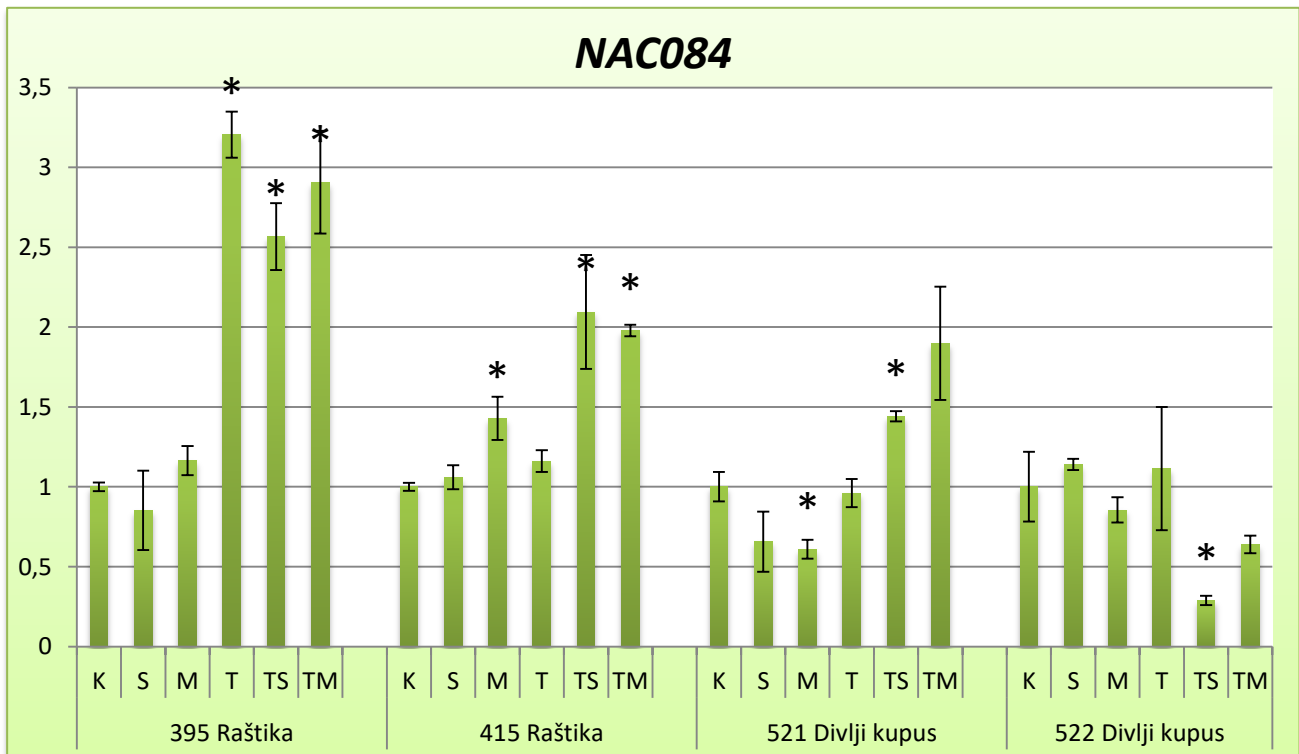
Ekspresija gena *NAC041* (Slika 20.) kod oba varijeteta raštike na tretmanu s manitolom bila je smanjena u odnosu na kontrolu (1,78 puta kod varijeteta 395 i 2,12 puta kod varijeteta 415), dok je temperaturni stres doprinio vrlo malom povećanju genske ekspresije. Kombinacija temperaturnog i solnog stresa kod oba varijeteta raštike dovela je do povećane ekspresije (1,27 puta kod varijeteta 395 i 1,35 puta kod varijeteta 415), a najveća ekspresija gena *NAC041* u raštikama zabilježena je kod TM i bila je 1,62 puta veća nego u kontroli.



Slika 20. Relativna ekspresija gena, koji kodira za transkripcijski faktor *NAC041*, kod varijeteta raštike (*Brassica oleracea* var. *acephala*) i divljeg kupusa (*Brassica incana*) mjerena qPCR-om ($\Delta\Delta C_t$). Nakon početnog naklijavanja klijanci obje vrste bili su 24h izloženi uvjetima kontrole (K), solnog stresa – 100 mM NaCl (S), sušnog stresa – 200 mM manitol (M), temperaturnog stresa (T), kombinacije temperaturnog i solnog stresa (TS) te kombinacije temperaturnog stresa i manitola (TM). Ekspresija gena prikazana je kao relativna promjena (eng. *fold change*) u odnosu na kontrolu. * predstavlja statistički značajnu razliku između kontrole i svakog pojedinog tretmana ($p < 0.05$), $n=8-15 \pm SD$.

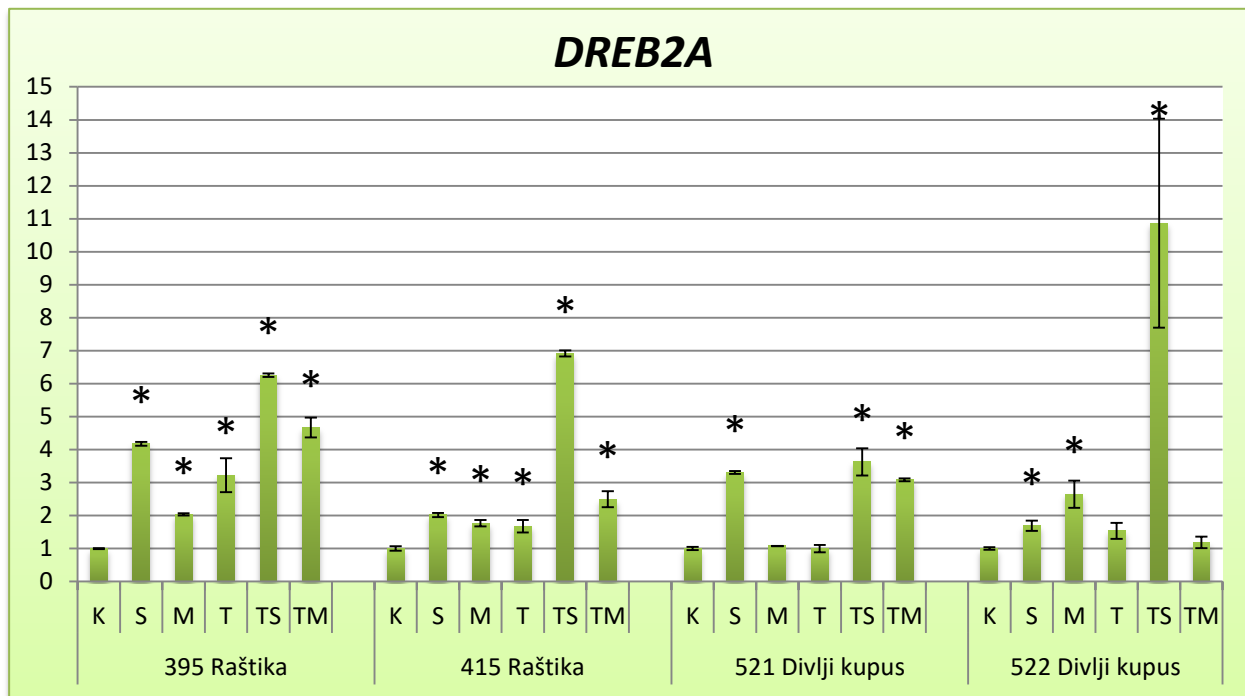
Varijetet 521 divljeg kupusa pokazao je smanjenu ekspresiju gena *NAC041* u svim tretmanima osim kod TM. Statistički značajno smanjenje zabilježeno je kod solnog (2,17 puta) i osmotskog (3 puta) stresa. Kod varijeteta 522 na tretmanima nije došlo do statistički značajne promjene u genskoj ekspresiji.

Ekspresija gena *NAC084* (Slika 21.) kod oba varijeteta raštike bila je znatno povećana na temperaturnim i kombiniranim stresovima. Statistički značajno povećanje kod varijeteta 395 bilo je na svim tretmanima koji su uključivali temperaturu, a najveće povećanje od 3,2 puta u odnosu na kontrolu zabilježeno je na temperaturnom stresu. Osmotski stres je, uz dva kombinirana stresa, uzrokovao statički značajnu promjenu ekspresije gena *NAC084* koja je bila 1,42 puta veća u usporedbi s kontrolom.



Slika 21. Relativna ekspresija gena, koji kodira za transkripcijski faktor *NAC084*, kod varijeteta raštike (*Brassica oleracea* var. *acephala*) i divljeg kupusa (*Brassica incana*) mjerena qPCR-om ($\Delta\Delta C_t$). Nakon početnog naklijavanja klijanci obje vrste bili su 24h izloženi uvjetima kontrole (K), solnog stresa – 100 mM NaCl (S), sušnog stresa – 200 mM manitol (M), temperaturnog stresa (T), kombinacije temperaturnog i solnog stresa (TS) te kombinacije temperaturnog stresa i manitola (TM). Ekspresija gena prikazana je kao relativna promjena (eng. *fold change*) u odnosu na kontrolu. * predstavlja statistički značajnu razliku između kontrole i svakog pojedinog tretmana ($p < 0.05$), $n=8-15 \pm SD$.

Kod varijeteta 521 divljeg kupusa porast ekspresije gena *NAC084* zabilježen je samo kod kombiniranih tretmana (1,45 puta na kombiniranom TS tretmanu), dok su kombinirani tretmani kod varijeteta 522 utjecali na smanjenje genske ekspresije. Povećana genska ekspresija gena *NAC084* u varijetetu 522 zabilježena je samo kod solnog i temperaturnog stresa međutim nije bila statistički značajna. Statistički značajno smanjenje za 3,58 puta zabilježeno je kod kombiniranog TS tretmana.



Slika 22. Relativna ekspresija gena, koji kodira za transkripcijski faktor *DREB2A* kod varijeteta raštike (*Brassica oleracea* var. *acephala*) i divljeg kupusa (*Brassica incana*) mjerena qPCR-om ($\Delta\Delta C_t$). Nakon početnog naklijavanja klijanci obje vrste bili su 24h izloženi uvjetima kontrole (K), solnog stresa – 100 mM NaCl (S), sušnog stresa – 200 mM manitol (M), temperaturnog stresa (T), kombinacije temperaturnog i solnog stresa (TS) te kombinacije temperaturnog stresa i manitola (TM). Ekspresija gena prikazana je kao relativna promjena (eng. *fold change*) u odnosu na kontrolu. * predstavlja statistički značajnu razliku između kontrole i svakog pojedinog tretmana ($p < 0.05$), $n=8-15 \pm SD$.

Što se tiče ekspresije gena *DREB2A* (Slika 22.) u oba varijeteta raštike i na svim tretmanima zabilježeno statistički značajno povećanje u odnosu na kontrolu. Kod oba varijeteta kombinacija temperature i solnog stresa najviše je utjecala na povećanje ekspresije *DREB2A* gena (6,25 puta kod varijeteta 395 i 6,9 puta kod varijeteta 415). Isti takav trend uočen je i kod oba varijeteta divljeg kupusa, a osobito kod varijeteta 522 gdje je došlo do povećanja genske ekspresije za skoro 11 puta. Solni stres je kod oba varijeteta divljeg kupusa uzrokovao statistički značajno povećanje (3,3 puta kod varijeteta 521 i 1,7 puta kod varijeteta 522). Na temperaturnim tretmanima divljeg kupusa nije uočena statistički značajna promjena u ekspresiji gena *DREB2A*. U usporedbi s raštikama, divlji kupusi su pokazali manje promjene u ekspresiji ovog gena.

5. RASPRAVA

Klimatske promjene koje podrazumijevaju različite faktore abiotičkog stresa kao što su visoke temperature, salinitet i suša utječu na rast i razvoj brojnih biljaka pa tako i na biljke iz porodice Brassicaceae. Mnoga dostupna istraživanja često ispituju utjecaj jednog individualnog stresa na rast, razvoj i brojne molekularne parametre biljaka. Međutim, situacija u okolišu često je kompleksnija odnosno biljke su izložene najčešće različitim kombinacijama biotičkog i abiotičkog stresa. Stoga je kod kreiranja eksperimenta vrlo važno uzeti u obzir i tu činjenicu. Tako su u ovom diplomskom radu istražena tri abiotička stresa (povišena temperatura, povećani salinitet i suša) i njihove kombinacije (temperatura i salinitet te temperatura i suša) kako bih testirao kako oni djeluju na rast i razvoj te biokemijske parametre divljeg kupusa (*Brassica incana*) te koji su potencijalni mehanizmi obrane od stresa. Obzirom da je ovakvo slično istraživanje već provedeno na raštici (*Brassica oleracea* var. *acephala*) (Bauer i sur. 2022), dobivene podatke na divljem kupusu usporediti ću i s već prethodno objavljenim rezultatima.

Na osnovu preliminarnih testova rasta klijanaca odabrao sam NaCl u koncentraciji 100 mM i manitol u koncentraciji 200 mM za pojedinačne tretmane kao i u kombinaciji s temperaturnim stresom.

Pojedinačnim i kombiniranim faktorima stresa tretirao sam klijance raštike i divljeg kupusa veličine oko 1 cm za što je bilo potrebno prethodno naklijati sjemenke. Vrijeme naklijavanja i brzina rasta klijanaca se razlikovala za raštiku i divlji kupus. Sjeme raštike, koje je veće, klijalo je brže i klijanci su rasli brže u usporedbi s divljim kupusom. Veličina sjemena često je povezana i s brzinom rasta pa tako prema nekim literaurnim podacima krupnije sjeme klija i razvija se brže nego sitnije (Steiner i sur., 2019). S druge strane biljke sa sitnim sjemenom imaju visoku relativnu stopu rasta u početnoj fazi koja s vremenom opada što je logično obzirom na ograničenu količinu hranjivih tvari u sjemenci (Turnbull i sur., 2012).

Kako bi preživjele u nepovoljnim uvjetima, biljke pod stresom aktivno potiskuju svoj rast. Utjecaj stresa na biljni rast može se mjeriti kao smanjenje akumulacije biomase ili kao smanjenje stope biljnog rasta. Između rasta korijena, akumulacije biomase i otpornosti na stres postoji jaka pozitivna korelacija koja pokazuje kako tolerantniji varijeteti imaju manju supresiju

akumulacije biomase u stresnim uvjetima u usporedbi sa svojim kontrolama na što su ukazali i Bauer i sur. (2022) u svojem istraživanju. Različiti varijeteti raštike odgovarali su različito na primjenjene stresne faktore; 395 i 414 nisu značajno smanjivali biomasu na temperaturnom stresu, dok 415 nije značajno smanjivao masu na solnom stresu. U uvjetima solnog stresa i manitola najveća inhibicija biomase bila je zabilježena u varijetetu 395 a najmanja u 415. Prosječna biomasa klijanca raštike bila je gotovo duplo veća nego biomasa klijanca divljeg kupusa što se može objasniti prethodno spomenutom većom relativnom stopom rasta u početnoj fazi. Što se tiče divljeg kupusa, među ispitivanim varijetetima mogao se uočiti isti trend. Klijanci divljeg kupusa najbolje su, u usporedbi s kontrolnom skupinom, rasli na temperaturnom stresu. Nešto slabiji rast zabilježen je na solnom stresu te kombinaciji temperature i solnog stresa. Najslabiji rast zabilježen je na podlogama s dodatkom manitola tako da je trend rasta na određenim podlogama bio isti kao i kod raštika. Iako među varijetetima divljeg kupusa u ovom mjerenju biomase nije bilo nekih većih odstupanja, zbog boljeg rasta na podlogama s dodacima, otporniji kultivari bi mogli biti 520 i 521, dok se tu kao najosjetljiviji pokazao 514 čiji je lokalitet i geografski udaljeniji u usporedbi s lokalitetima ostalih varijeteta divljeg kupusa. U istraživanju kojeg su proveli Pavlović i sur. (2018) pokazalo se kako je od tri ispitivane vrste iz porodice Brassicaceae raštika pokazala najveću toleranciju na sušu, te zabilježila jedan od najvećih prirasta korijena na podlogama s manitolom, što je povezano s povećanom razinom SA, ABA, citokinina, tifasterola i prekursora BR. Yang i sur. (2021) su u svojem istraživanju kao biljni materijal koristili dvije vrste iz roda *Apocynum* čiji su klijanci rasli na podlogama s dodatkom manitola (400 mM). Pokazalo se kako je i u njihovom slučaju manitol s vremenom sve više inhibirao rast klijanaca.

Prolin je aminokiselina koja u biljkama služi kao biomarker stresa. Često je prisutna u višim koncentracijama, kod biljaka koje su izložene brojnim čimbenicima abiotičkog stresa kao što su visoke i niske temperature te povećani salinitet i suša, kada se akumulira u citosolu te služi u održavanju turgora i zaštiti staničnih komponenti (Buchanan i sur., 2015). Osim što funkcionira kao osmolit, prolin ima tri ključne uloge u stresu: djeluje kao signalna molekula, antioksidativna obrambena molekula i kelator metala. Njegova povećanja proizvodnja u biljkama, uz već prethodno navedeno, sprječava i curenje elektrolita te dovodi razinu ROS u normalne granice. Akumulacija osmolita, osmotska prilagodba, indukcija antioksidativnih enzima i sustav za gašenje slobodnih radikala neke su od važnih strategija koje biljke koriste kako bi se zaštitile od

nepovoljnih uvjeta. Mnogi fiziološki procesi poput starenja, cvjetanja, klijanja i fotosinteze, u uvjetima stresa, potpomognuti su šećerima i aminokiselinama koji služe kao regulatori i kompatibilni osmoliti (Alagoz i sur., 2023). U ovom istraživanju svi varijeteti raštike i divljeg kupusa koji su se nalazili u stresnim uvjetima pokazali su statistički značajnu razliku u usporedbi s njihovom kontrolom. Kod svih varijeteta divljeg kupusa temperaturni tretman uzrokovao je najmanje povećanje razine prolina u usporedbi s kontrolom, dok se kombinirani TS tretman pokazao kao najkobniji za sve varijetete divljeg kupusa izuzev varijeteta 514 i 522 kod kojih je najveća koncentracija prolina izmjerena na solnom stresu, odnosno na tretmanu s manitolom. Pojedinačni, te kombinirani solni stres se u većini slučajeva pokazao kao veći inicijator stresa od manitola u testu gdje se mjerila razina prolina. Varijeteti 520 i 522 su se u ovom mjerenju pokazali kao otporniji dok su varijeteti 514, 518 i 521 bili osjetljiviji. Od tri varijeteta raštike, kod varijeteta 395 zabilježeno je najveće povećanje koncentracije prolina što sugerira da je on osjetljivi varijetet, dok bi se varijetet 415 mogao definirati kao otporniji. Komparativna istraživanja na različitim vrstama kupusnjača u uvjetima suše i solnog stresa (Pavlović i sur. 2018, 2019) te različitim varijetetima raštike (Bauer i sur. 2022) sugeriraju da osjetljivije vrste značajnije akumuliraju prolin u donosu na tolerantnije u istim uvjetima stresa što je u skladu s rezultatima u ovom radu.

Povećanje razine prolina kod tretmana s manitolom može se potkrijepiti činjenicom da prolin ima važnu ulogu u održavanju turgora u stanicama kada se one nalaze u uvjetima koji dovode do dehidracije stanica. S druge strane, biljke u uvjetima solnog stresa imaju smanjenu sposobnost uzimanja vode iz tla i prisutnost ionske neravnoteže. Također, u takvim uvjetima dolazi i do nakupljanja velikog broja ROS pa je moguće da se prolin onda, zbog svoje prethodno spomenute antioksidacijske sposobnosti, nakuplja u većim koncentracijama kako bi se poništili negativni učinci reaktivnih kisikovih vrsta i spriječilo oštećenje staničnih komponenti. U radu kojeg su objavili Huang i sur. (2013) 30 dana stari klijanci jeruzalemske artičoke (*Helianthus tuberosus* L.) tretirani su s NaCl koncentracije 100 mM tijekom tri dana, svakih 12 sati. Rezultati mjerenja sadržaja prolina pokazali su eksponencijalan rast prolina svakih 12 sati što se može potkrijepiti s prethodno navedenim ulogama prolina.

DPPH metoda se često koristi za procjenu antioksidacijske aktivnosti različitih spojeva. Slobodni radikal, DPPH, u prisutnosti antioksidansa u uzorku mijenja svoju boju. Ova metoda

pruža brzu procjenu antioksidacijske aktivnosti, međutim ne daje uvijek cjeloviti prikaz ukupne antioksidacijske sposobnosti neke tvari u uzorku pa se stoga, za dobivanje cjelovite slike, često preporučuje koristiti ovu metodu u kombinaciji s drugim. U uvjetima stresa biljke često proizvode veće količine antioksidativnih tvari kako bi se zaštitile od nepovoljnih uvjeta i povećanog stvaranja slobodnih radikala. S druge strane, u nepovoljnim uvjetima može doći i do narušavanja normalnih metaboličkih procesa što može utjecati na smanjenje antioksidacijske aktivnosti prema DPPH radikalu (Baliyan i sur., 2022).

Varijete divljeg kupusa kod kojih je zapažena najveća antioksidacijska aktivnost bili su varijete 518 i 521. Među varijetetima divljeg kupusa nije uočen neki zajednički trend za određeni tip stresa jer je svaki varijetet na nekom drugom tretmanu pokazao najveću antioksidacijsku aktivnost. Kod varijeteta 520 među tretmanima nije bila uočena statistički značajna razlika što sugerira da je antioksidacijska aktivnost, neovisno o tretmanu, kod svih uzoraka bila slična. Veće vrijednosti TE u DPPH mjerenju ukazuju na jaču antioksidativnu aktivnost uzorka koji se testira, odnosno veću sposobnost hvatanja slobodnih radikala. Samim time varijete kod kojih su zabilježene veće TE vrijednosti imaju veću sposobnost suzbijanja oksidativnog stresa i zaštite stanice od oštećenja koja mogu nastati utjecajem ROS. Kod 415 varijeteta raštike pojedinačni i kombinirani tretman manitolom nije uzrokovao statistički značajan porast antioksidativne aktivnosti dok je kod tretmana s NaCl zabilježeno povećanje antioksidativne aktivnosti. U ovom eksperimentu kod varijeteta 395 nisu zabilježene statistički značajne razlike među tretmanima u usporedbi s kontrolom, kao ni kod varijeteta 414 u istraživanju provedenom od strane Bauer i sur., (2022). Nadalje, u tom istom istraživanju je kod tri preostala varijeteta (392, 395 i 404) u uvjetima osmotskog i kombiniranog TM stresa zabilježena statistički značajna razlika u usporedbi s kontrolom. U mojem eksperimentu takav trend je bio zabilježen na četiri varijeteta divljeg kupusa. U istraživanju koje su proveli Linić i sur. (2021), na kineskom kupusu koji je bio izložen solnom stresu (150 mM NaCl), došlo je do smanjenja antioksidativne aktivnosti u usporedbi s kontrolnom skupinom. Dodaci ferulinske i salicilne kiseline u određenim koncentracijama utjecale su na porast antioksidacijske aktivnosti. Trend smanjene antioksidacijske aktivnosti na solnom stresu kod divljih kupusa zabilježeno je samo na varijetetima 518 i 519. Obzirom da solni stres povećava proizvodnju slobodnih radikala koji mogu oštetiti stanice i tkiva za očekivati je da antioksidativni sustav biljaka djeluje u takvim uvjetima kako bi maksimalno smanjio potencijalna oštećenja.

Prisutnost još jednog markera oksidativnog stresa, MDA, ukazuje na oštećenje stanica koje je uzrokovano slobodnim radikalima. Visoka koncentracija MDA u biljnom tkivu povezana je visokom razinom lipidne peroksidacije i oštećenjem staničnih membrana (Awasthi i sur., 2018; de Dios Alche, 2019). Interesantno je uočiti da varijetet raštike 395 i divlji kupus 514 koji su na temelju inhibicije rasta i akumulacije prolina sugerirani kao osjetljiviji u odnosu na ostale varijetete imaju bazalnu razinu (u kontrolnim uvjetima) MDA relativno visoku u odnosu na ostale varijetete. Sjeme varijeteta 395 prikupljeno je u Mostaru zbog čega može imati manju otpornost na solni stres u usporedbi s varijetetima koji su se prilagodili rastu na otocima u vrlo sličnoj klimi i uvjetima posolice. Povećanje MDA uočeno je uglavnom kod solnog stresa i kombiniranog temperaturno-solnog stresa u obe istražene vrste kupusnjača što sugerira da ti tipovi stresa uzrokuju najveća oštećenja membrana. U istraživanju kojeg su proveli Taïbi i sur. (2016) pokazalo se također kako povećane koncentracije soli djeluju na statistički značajan porast razine MDA. Zanimljiv je podatak da je osmotski i kombinirani TM stres kod većine varijeteta (osim divljeg kupusa 522) prouzrokovao smanjenje razine MDA. Podaci iz istraživanja kojeg su proveli Bauer i sur. (2022) na klijancima raštike pokazuju kako je kombinirani TM stres uzrokovao najveće povećanje MDA u usporedbi s kontrolom i to za tri od četiri ispitivana varijeteta, što je potpuno suprotno od podataka dobivenih u ovom istraživanju. Bauer i sur. (2022) koristili su veću koncentraciju manitola (300 mM) u svojim istraživanjima nego što je korištena u ovom radu (200 mM). Stoga se ova pojava može objasniti svojstvima manitola koji je korišten kao sredstvo za izazivanje osmotskog stresa. Smatra se kako manitol u nekim slučajevima može djelovati kao antioksidans, odnosno kao gasitelj ROS ukoliko je preferirana meta (Patel i Williamson, 2016). Stoga možemo sugerirati da je korištena koncentracija manitola u ovim istraživanjima (200 mM) mogla imati pozitivan a ne negativan učinak na stupanj lipidne peroksidacije u većini varijeteta što je u skladu s opažanjima drugih autora (Tomassino i sur. 2018).

Fenoli su spojevi koji imaju mnogobrojne uloge u različitim biološkim procesima, a između ostalog i u odgovoru biljaka na stres. Sve molekule unutar ove skupine, ovisno o strukturi, mogu imati različite uloge u rastu, razvoju i zaštiti biljaka od nepovoljnih uvjeta. Neke od njih djeluju kao antioksidansi, sudjeluju u zaštiti staničnih membrana i povećavaju otpornost na patogene (Šamec i sur., 2021). Također, uočeno je kako biljke s povećanim sadržajem fenola u uvjetima nekog abiotičkog stresa obično imaju bolju prilagodljivost u ograničavajućem okolišu

(Sharma i sur., 2019). U ovom istraživanju, varijeteti divljih kupusa pokazali su različite odgovore na različite faktore stresa i nije uočen neki zajednički trend. Uočeno je da varijeteti divljeg kupusa 518 i 519 te varijetet raštike 395 imaju visoke koncentracije ukupnih fenola u kontrolni uvjetima i ne mijenjaju ili smanjuju razinu tih spojeva uslijed stresa. Varijeteti raštike 414 i 415 značajno povećavaju razine polifenola uslijed tretmana osim kod kombinacije TM. Varijetet divljih kupusa 522 imao je najmanju izmjerenu količinu ukupnih fenola u kontrolnim uvjetima, a uslijed solnog, osmotskog i temperaturnog stresa ta razina se znatno povećala. U eksperimentu na raštikama provedenom od strane Bauer i sur. (2022) promjena razine fenola kod varijeteta 395 također nije bila statistički značajna što je u skladu s ovdje prezentiranim rezultatima. Nadalje, pokazalo se kako su ukupni flavonoidi imali tendenciju smanjenja u svim uvjetima stresa, a posebice kod osmotskog i kombiniranog TM stresa. Reakcija na solni stres kod vrsta roda *Brassica* je općenito vrlo složena osobina koju reguliraju brojni čimbenici kao što su biljni hormoni, antioksidansi, polifenolni spojevi, te osmoprotektanti. Tako se u mojem eksperimentu, kod varijeteta 518 i 519, količina ukupnih fenola nešto smanjila, a smanjenje sadržaja ukupnih fenola na solnom stresu (150 mM) zabilježili su u svojem istraživanju i Linić i sur. (2021). Aplikacija polifenolnih spojeva na biljke (folijarno ili u podlogama) može ublažiti negativne učinke stresa. Linić i sur. (2021) pokazali su da folijarni tretmani ferulinskom i salicilnom kiseline u određenim koncentracijama smanjuju razinu prolina, povećavaju antioksidacijsku aktivnost i poboljšavaju fotosintetsku učinkovitost u biljkama kineskog kupusa izloženog solnom stresu. Nadalje prisustvo kvercetina u podlozi s manitolom omogućilo je bolji rast klijanaca iz roda *Apocynum* u usporedbi s klijancima koji su rasli na podlozi s manitolom (Yang i sur. 2021). Zapaženo je kako je kvercetin smanjio proizvodnju ROS i oštećenje stanične membrane, a povećao ekspresiju superoksid dismutaze, peroksidaze, katalaze, kalcion sintaze i flavonol sintaze.

U kombinaciji s morfološkim i biokemijskim promjenama uslijed različitih čimbenika stresa pratio sam i ekspresiju tri transkripcijska faktora (*NAC041*, *NAC084* i *DREB2A*) koji su povezani s odgovor biljaka na stres. Kod odabira početnica koje se koriste u genskoj ekspresiji vrlo je bitno da početnice budu komplementarne genu unutar kojeg se trebaju vezati i da umnažaju samo jedan fragment. Kao endogene kontrole u ovom istraživanju na divljim kupusima korišteni su geni koji su kao endogene kontrole već prethodno bili ispitivani na raštici (Bauer i sur., 2022). Početnice za oba gena, umnažanjem cDNA, dale su po jedan fragment kako se i priželjkivalo. Fragmenti na

PCR gelu koji su se nalazili ispod umnožene cDNA dolazili su od početnica koje su stvarale dimere. Potencijalni uzroci ovih dimera mogu biti nepotpuna specifičnost početnica za gene divljeg kupusa, kontaminacija ili nespecifičnost PCR uvjeta. Također, gen *OGIO* se pokazao kao nešto bolja endogena kontrola u odnosu na gen *PUX* zbog stabilnije ekspresije što se pokazalo i u istraživanju kojeg je na raštikama provela Talanga Vasari (2022).

Zbog obujma posla i financijski zahtjevnih analiza ove ekspresije gena su provedene u dvije tehničke replike na izolatima iz jedne biološke replike te ovi rezultati ne daju možda pravu sliku genske ekspresije divljih kupusa pa bi u budućnost svakako trebalo provesti dodatna mjerenja na više bioloških replika.

Obitelj proteina *NAC* slovi kao jedna od najvećih obitelji transkripcijskih faktora (TF) specifičnih za biljke. Proteini iz ove obitelji imaju različite uloge u biljnom rastu i razvoju te odgovoru na stres. Važna im je uloga i u povezivanju signalnih putova između biljnih hormona kao što su SA, JA, ABA ili etilen. Pokazalo se kako imaju ulogu u otpornosti na patogene. *DREB* TF pripadaju ERF obitelji transkripcijskih faktora te se u odgovoru na abiotički stres kao što je suša ili hladnoća mogu vezati na DRE/CRT elemente (Bian i sur., 2020).

Rezultati dobiveni u ovom istraživanju pokazali su kako je kod 521 varijeteta divljeg kupusa zabilježena smanjena ekspresija gena *NAC041* na svim tretmanima osim na kombiniranom TM tretmanu. S druge strane, varijetet 522 pokazao je povećanje genske ekspresije na svim tretmanima osim na osmotskom stresu. Kod varijeteta 521 divljeg kupusa ekspresija gena *NAC084* bila je slična s ekspresijom gena *NAC041*. Tu je opet kombinirani TM stres, uz TS, uzrokovao povećanje genske ekspresije. Zanimljiv je podatak da su kod varijeteta 522 TS i TM uzrokovali najslabiju gensku ekspresiju u usporedbi s kontrolom, dok su kod varijeteta 521 ti isti tretmani uzrokovali najjaču. Ekspresija gena *DREB2A* kod oba varijeteta divljeg kupusa bila je najjača na kombiniranom TS stresu. Kod varijeteta 522 povećanje genske ekspresije bilo je zabilježeno kod svih tretmana. Što se tiče dva ispitivana varijeteta raštike, najveći skok u povećanju genske ekspresije gena iz porodice *NAC* zabilježen je u slučajevima gdje je apliciran temperaturni stres, kako pojedinačno, tako i u kombinaciji sa solnim i osmotskim. Povećana ekspresija gena *DREB2A* bila je zabilježena na svim tretmanima, a najveći skok zamijećen je na kombiniranom TS tretmanu, kao i kod divljih kupusa. Bauer i sur. (2022) su u istraživanju mjerili razinu genske ekspresije na četiri varijeteta raštike. U tom eksperimentu se pokazalo kako je

najtolerantniji varijetet 411 imao najveću razinu bazalne ekspresije oba gena iz porodice *NAC* (*NAC041* i *NAC084*), dok je kod osjetljivog varijeteta 395 bazalna ekspresija kod oba gena bila najmanja u usporedbi s bazalnom ekspresijom drugih varijeteta. Ekspresija gena *NAC041* kod varijeteta 395 bila je inducirana u temperaturnom stresu, a smanjena kod varijeteta 404 u temperaturnom i TM stresu. Kod varijeteta 392 došlo je do smanjenja ekspresije gena *NAC041* i *NAC084* na svim tretmanima, dok je kod preostala tri varijeteta ekspresija *NAC084* gena bila, u odnosu na kontrolu, povećana na svim tretmanima. Ekspresija gena *DREB2A* bila je statistički značajno povećana na svim tretmanima s temperaturom, a takav se trend može zamijetiti i u mojim rezultatima. Genska ekspresija vrste *Brassica rapa* ssp. *pekinensis*, koju su Pavlović i sur. (2018) opisali kao osjetljivu, se u mjerenjima provedenim od strane Talange Vasari (2022) mogla usporediti s osjetljivijim varijetetom raštike 392 jer je pokazivala sličan obrazac ponašanja što se tiče gena *NAC041* i *NAC084*. Na temelju dobivenih rezultata može se uvidjeti kako 415 varijetet raštike i 521 varijetet divljeg kupusa imaju dosta sličan trend ponašanja u promjeni genske ekspresije.

6. ZAKLJUČAK

Ispitivani kultivari divljeg kupusa pokazali su različite odgovore na različite uvjete stresa. Kod mjerenja biomase temperaturni tretman imao je najmanji utjecaj na biljni rast i razvoj, dok je osmotski stres prouzrokovao najveće smanjenje biomase.

Na svim tretmanima, kod svih varijeteta divljeg kupusa, zabilježena je statistički značajno povećanje razine prolina, osobito na kombiniranom temperaturno-solnom stresu. Što se tiče antioksidacijske aktivnosti, varijeteti divljeg kupusa pokazali su različite odgovore na različitim tretmanima, a najveći porast može se zamijetiti na tretmanima koji su uključivali temperaturu. Razina MDA se u najvećem broju slučajeva povećavala na tretmanima sa solnim stresom, a smanjivala na tretmanima s osmotskim stresom. Solni i osmotski stres su u najvećem broju slučajeva na klijancima divljeg kupusa uzrokovali povećanu akumulaciju ukupnih fenola.

Tretmani koji su uključivali temperaturu su kod divljih kupusa u najvećem broju slučajeva uzrokovali povećanu ekspresiju *NAC* gena, kao i kod raštike. Povećana ekspresija gena *DREB2A* bila je zabilježena na svim vrstama stresa što opravdava njegovu ulogu u otpornosti na biljni stres. Svi dobiveni rezultati na divljem kupusu bili su uspoređeni s rezultatima dobivenim na raštici (Bauer i sur., 2022) te se može konstatirati kako se ove dvije vrste u uvjetima stresa ponašaju dosta slično, te da su ponekad veće razlike uočene između dva varijeteta iste vrste nego između dvije vrste.

U ovom istraživanju se na temelju ispitivanih parametara može pretpostaviti kako je kod raštike varijetet 395 osjetljiviji, dok se varijetet 415 pokazao otpornijim na uvjete stresa. Za divlji kupus se može istaknuti kako je varijetet 514 bio najosjetljiviji, dok su se varijeteti 520 i 522 u najvećem broju biokemijskih mjerenja pokazali najotpornijim. Zbog vrlo malog broja istraživanja provedenim na divljim kupusima u budućnosti bi svakako trebalo ispitati dodatne biokemijske i molekularne parametre za grupiranje varijeteta te istražiti složene mehanizme koji sudjeluju u otpornosti na stres kod biljaka iz roda *Brassica*.

7. LITERATURA

Aires, A. (2015). Brassica composition and food processing. In *Processing and Impact on Active components in Food* (pp. 17-25). Academic Press.

Alagoz, S. M., Lajayer, B. A., & Ghorbanpour, M. (2023). Proline and soluble carbohydrates biosynthesis and their roles in plants under abiotic stresses. In *Plant Stress Mitigators* (pp. 169-185). Academic Press.

Arif, Y., Singh, P., Siddiqui, H., Bajguz, A., & Hayat, S. (2020). Salinity induced physiological and biochemical changes in plants: An omic approach towards salt stress tolerance. *Plant Physiology and Biochemistry*, 156, 64-77.

Awasthi, J. P., Saha, B., Chowardhara, B., Devi, S. S., Borgohain, P., & Panda, S. K. (2018). Qualitative analysis of lipid peroxidation in plants under multiple stress through schiff's reagent: a histochemical approach. *Bio-protocol*, 8(8), e2807-e2807.

Baliyan, S., Mukherjee, R., Priyadarshini, A., Vibhuti, A., Gupta, A., Pandey, R. P., & Chang, C. M. (2022). Determination of antioxidants by DPPH radical scavenging activity and quantitative phytochemical analysis of *Ficus religiosa*. *Molecules*, 27(4), 1326.

Bauer, N., Tkalec, M., Major, N., Talanga Vasari, A., Tokić, M., Vitko, S., ... & Salopek-Sondi, B. (2022). Mechanisms of Kale (*Brassica oleracea* var. *acephala*) Tolerance to Individual and Combined Stresses of Drought and Elevated Temperature. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(19), 11494.

Baweja, P., & Kumar, G. (2020). Abiotic stress in plants: an overview. *Plant stress biology: Strategies and trends*, 1-15.

Bian, Z., Gao, H., & Wang, C. (2020). NAC transcription factors as positive or negative regulators during ongoing battle between pathogens and our food crops. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(1), 81.

Bosco de Oliveira, A. (Ed.). (2019). *Abiotic and Biotic Stress in Plants*.

Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. L. W. T. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food science and Technology*, 28(1), 25-30.

Buchanan, B. B., Grisse, W., & Jones, R. L. (Eds.). (2015). *Biochemistry and molecular biology of plants*. John Wiley & Sons.

Burritt, D. J. (2019). Crop plant adaptation to climate change and extreme environments.

Carillo, P., & Gibon, Y. (2011). Protocol: Extraction and determination of proline. *PrometheusWiki*, 2011, 1-5.

Cramer, G. R., Urano, K., Delrot, S., Pezzotti, M., & Shinozaki, K. (2011). Effects of abiotic stress on plants: a systems biology perspective. *BMC plant biology*, 11(1), 1-14.

de Dios Alché, J. (2019). A concise appraisal of lipid oxidation and lipoxidation in higher plants. *Redox biology*, 23, 101136.

Draper, H. H., & Hadley, M. (1990). [43] Malondialdehyde determination as index of lipid Peroxidation. In *Methods in enzymology* (Vol. 186, pp. 421-431). Academic press.

Fahad, S., Hussain, S., Matloob, A., Khan, F. A., Khaliq, A., Saud, S., ... & Huang, J. (2015). Phytohormones and plant responses to salinity stress: a review. *Plant growth regulation*, 75, 391-404.

Hayat, S., Mir, B. A., Wani, A. S., Hasan, S. A., Irfan, M., & Ahmad, A. (2011). Screening of salt-tolerant genotypes of Brassica juncea based on photosynthetic attributes. *Journal of Plant Interactions*, 6(1), 53-60.

Imran, Q. M., Falak, N., Hussain, A., Mun, B. G., & Yun, B. W. (2021). Abiotic stress in plants; stress perception to molecular response and role of biotechnological tools in stress resistance. *Agronomy*, 11(8), 1579.

Jasprica, N. (2015). Brassica L. *Endemi u Hrvatskoj flori (Endems in Croatian flora)*. Alfa, Zagreb, 107-115.

Kaloo, G., & Bergh, B. O. (Eds.). (2012). *Genetic improvement of vegetable crops*. Newnes.

- Linić, I., Mlinarić, S., Brkljačić, L., Pavlović, I., Smolko, A., & Salopek-Sondi, B. (2021). Ferulic acid and salicylic acid foliar treatments reduce short-term salt stress in chinese cabbage by increasing phenolic compounds accumulation and photosynthetic performance. *Plants*, *10*(11), 2346.
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *methods*, *25*(4), 402-408.
- Mansoor, S., Khan, T., Farooq, I., Shah, L. R., Sharma, V., Sonne, C., ... & Ahmad, P. (2022). Drought and global hunger: biotechnological interventions in sustainability and management. *Planta*, *256*(5), 97.
- Marhold, K. (2011+): Brassicaceae (*Brassica incana* Ten., Fl. Napol. 1, Prodr: 39. 1811). – In: Euro+Med Plantbase - the information resource for Euro-Mediterranean plant diversity. https://europlusmed.org/cdm_dataportal/taxon/61f123e8-3358-45f0-9f62-a669f466123e (pristupljeno 07. 09. 2023.).
- Miceli, N., Cavò, E., Ragusa, M., Cacciola, F., Mondello, L., Dugo, L., ... & Taviano, M. F. (2020). *Brassica incana* Ten.(Brassicaceae): Phenolic constituents, antioxidant and cytotoxic properties of the leaf and flowering top extracts. *Molecules*, *25*(6), 1461.
- Nikolić, T. (2013). *Praktikum sistematske botanike: raznolikost i evolucija biljnog svijeta*. Alfa.
- Patel, T. K., & Williamson, J. D. (2016). Mannitol in plants, fungi, and plant–fungal interactions. *Trends in plant science*, *21*(6), 486-497.
- Pavlović, I., Petřík, I., Tarkowská, D., Lepeduš, H., Vujčić Bok, V., Radić Brkanac, S., ... & Salopek-Sondi, B. (2018). Correlations between phytohormones and drought tolerance in selected Brassica crops: Chinese cabbage, white cabbage and kale. *International Journal of Molecular Sciences*, *19*(10), 2866.
- Ruelland, E., & Zachowski, A. (2010). How plants sense temperature. *Environmental and experimental botany*, *69*(3), 225-232.
- Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American journal of Enology and Viticulture*, *16*(3), 144-158.

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

Snogerup, S., Gustafsson, M., & Von Bothmer, R. (1990). Brassica sect. Brassica (Brassicaceae) I. taxonomy and variation. *Willdenowia*, 271-365.

Šamec, D., Karalija, E., Šola, I., Vujčić Bok, V., & Salopek-Sondi, B. (2021). The role of polyphenols in abiotic stress response: The influence of molecular structure. *Plants*, *10*(1), 118.

Šamec, D., & Salopek-Sondi, B. (2019). Cruciferous (brassicaceae) vegetables. In *Nonvitamin and nonmineral nutritional supplements* (pp. 195-202). Academic Press.

Šamec, D., Urlić, B., & Salopek-Sondi, B. (2019). Kale (*Brassica oleracea* var. *acephala*) as a superfood: Review of the scientific evidence behind the statement. *Critical reviews in food science and nutrition*, *59*(15), 2411-2422.

Taïbi, K., Taïbi, F., Abderrahim, L. A., Ennajah, A., Belkhodja, M., & Mulet, J. M. (2016). Effect of salt stress on growth, chlorophyll content, lipid peroxidation and antioxidant defence systems in *Phaseolus vulgaris* L. *South African Journal of Botany*, *105*, 306-312.

Talanga Vasari, A. I. (2022). *Utjecaj povišene temperature i osmotskog stresa na kultivare raštike (Brassica oleracea L. var. acephala)* (Master thesis, University of Zagreb. Faculty of Science. Department of Biology).

Tommasino, E., Colomba, E. L., Carrizo, M., Grunberg, K., Quiroga, M., Carloni, E., ... & Luna, C. (2018). Individual and combined effects of drought and heat on antioxidant parameters and growth performance in Buffel grass (*Cenchrus ciliaris* L.) genotypes. *South African Journal of Botany*, *119*, 104-111.

Tripodi, G., Verzera, A., Dima, G., Condurso, C., & Ragusa, S. (2012). *Brassica fruticulosa* Cyr. and *Brassica incana* Ten.(Brassicaceae) as Mediterranean traditional wild vegetables: A valuable source of bioactive compounds. *Journal of Essential Oil Research*, *24*(6), 539-545.

Turnbull, L. A., Philipson, C. D., Purves, D. W., Atkinson, R. L., Cunniff, J., Goodenough, A., ... & Rees, M. (2012). Plant growth rates and seed size: a re-evaluation. *Ecology*, *93*(6), 1283-1289.

Wahid, A., Gelani, S., Ashraf, M., & Foolad, M. R. (2007). Heat tolerance in plants: an overview. *Environmental and experimental botany*, 61(3), 199-223.

Willits, D. H., & Peet, M. M. (1998). The effect of night temperature on greenhouse grown tomato yields in warm climates. *Agricultural and Forest meteorology*, 92(3), 191-202.

Yang, J., Zhang, L., Jiang, L., Zhan, Y. G., & Fan, G. Z. (2021). Quercetin alleviates seed germination and growth inhibition in *Apocynum venetum* and *Apocynum pictum* under mannitol-induced osmotic stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, 159, 268-276.

8. ŽIVOTOPIS

Rođen sam 11. 7. 1998. u Vinkovcima. Nakon završetka osnovne škole u Orašju, upisao sam opću gimnaziju u Školskom centru „fra Martina Nedića“ u Orašju. Srednjoškolsko obrazovanje sam završio s odličnim uspjehom nakon čega sam upisao preddiplomski studij Biologije na „Odjelu za Biologiju“ u Osijeku. Tijekom preddiplomskog studija bio sam proglašen najboljim studentom prve godine. Bio sam demonstrator na kolegijima Anatomija biljaka i Morfologija biljaka s terenskom nastavom. Aktivno sam sudjelovao u radu Udruge studenata biologije „ZOA“. Također, sudjelovao sam i na različitim manifestacijama poput Tjedna karijera sveučilišta u Osijeku. Bio sam uključen i u projekt „Utjecaj masovnog razvoja cijanobakterija na planktonske zajednice“. Zvanje sveučilišnog prvostupnika biologije stekao sam 2020. godine kada sam, s odličnim uspjehom, završio preddiplomski studij Biologije. Diplomski studij Molekularne biologije na Prirodoslovno-Matematičkom fakultetu upisao sam u rujnu 2020. Tijekom diplomskog studija na X. međunarodnom znanstvenom skupu održanom u Brčkom objavio sam rad pod nazivom „Nadzor zdravstvene ispravnosti i kvaliteta hrane pri uvozu u Bosnu i Hercegovinu“. Također, sudjelovao sam i u objavi rada „Comparative abiotic stress response of selected kale (*Brassica oleracea* var. *acephala*) and wild Brassica (*Brassica incana*) representatives“ u sklopu projekta „Agrobioraznolikost – osnova za prilagodbu i ublažavanje posljedica klimatskih promjena u poljoprivredi“. Laboratorijsku stručnu praksu odradio sam u herbarijskoj zbirci Biološkog odsjeka PMF-a pod vodstvom Ivane Rešetnik. Aktivno govorim engleski jezik, a tijekom srednjoškolskog obrazovanja stekao sam osnove i njemačkog jezika. Diplomski studij Molekularne biologije završavam izradom ovog diplomskog rada.