

Utjecaj niskih temperatura na sadržaj specijaliziranih metabolita u klijancima raštike (*Brassica oleracea* var. *acephala*)

Fistanić, Stjepana

Master's thesis / Diplomski rad

2019

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:217:879819>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-12**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Stjepana Fistanić

**Utjecaj niskih temperatura na sadržaj
specijaliziranih metabolita u klijancima raštike
(*Brassica oleracea* var. *acephala*)**

Diplomski rad

Zagreb, 2019.

Zahvale

Prvenstveno se zahvaljujem svojoj mentorici dr. sc. Dunji Šamec što me strpljivo vodila kroz izradu ovog rada. Hvala Vam za sav uloženi trud i za svaki savjet koji ste mi dali, svaka Vaša ohrabrujuća riječ i pozitivan stav bili su od velike pomoći i olakšali su izradu ovog rada.

Zahvaljujem se izv. prof. dr. sc. Sandri Radić Brkanac na ispravljanju i savjetima kojima je pridonijela poboljšanju kvalitete ovog rada.

Hvala svim mojim prijateljima i kolegama koji su bili uz mene, a posebno hvala Josipu koji je strpljivo slušao moje bezbrojne priče o faksu, hvala na podršci, razumijevanju i lijepim uspomjenama.

Veliko hvala mojoj obitelji na podršci, a najveća hvala mojim roditeljima koji su bili uz mene sve godine mog školovanja, što su mi omogućili sve što mi je trebalo i bili podrška u svim trenucima mog života.

Ovaj diplomski rad izrađen je u Laboratoriju za kemijsku biologiju, Zavoda za molekularnu biologiju, Instituta Ruđer Bošković, pod vodstvom dr. sc. Dunje Šamec, zn. sur. i dr. sc. Sandre Radić Brkanac, izv. prof. s Botaničkog zavoda Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra edukacije biologije i kemije.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

Utjecaj niskih temperatura na sadržaj specijaliziranih metabolita u klijancima raštike
(*Brassica oleracea* var. *acephala*)

Stjepana Fistanić

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Klimatske promjene izazivaju češće periode ekstremnih temperatura koje značajno utječu na poljoprivrednu proizvodnju. Neke su biljne vrste otpornije na temperaturne ekstreme, a jedna od njih je i raštika (*Brassica oleracea* var. *acephala*). Stoga, cilj ovog rada je praćenje odgovora klijanaca raštike na stres izazvan niskim temperaturama kroz tri uzgoja (I., II., III.). Klijanci raštike stari tri dana izloženi su temperaturi pothlađivanja (8 °C) (24 h: I., II. i III. uzgoj) te smrzavanja (−8 °C) (24 h: u II. te 4 h u III. uzgoju) u usporedbi s kontrolom (21 °C). Sniženje temperature usporilo je fiziološke procese te su klijanci izloženi nižim temperaturama imali kraće korijenje te posljedično manji prinos. Stres se odrazio i na biokemijske promjene te je kod klijanaca izloženih nižim temperaturama izmjerena viša razina prolina kao markera stresa te niža razina klorofila. Izloženost temperaturama pothlađivanja nije značajno utjecala na razinu ukupnih polifenola, flavonoida, fenolnih kiselina te antioksidacijsku aktivnost, dok je izloženost temperaturi smrzavanja utjecala na smanjenje ukupnih polifenola i fenolnih kiselina kod drugog uzgoja gdje je duljina izlaganja toj temperaturi bila 24 h. Izlaganje temperaturi smrzavanja izazvalo je i smanjenje količine ukupnih karotenoida, dok razina glukozinolata nije pokazala jasan trend s obzirom na temperaturu i različito vrijeme uzgoja.

(50 stranica, 27 slika, 5 tablica, 52 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: Brassicaceae, raštika, prolin, specijalizirani metaboliti, klorofil, karotenoidi, antioksidacijska aktivnost

Voditelj: dr. sc. Dunja Šamec, zn. sur.

Suvoditelj: izv. prof. dr. sc. Sandra Radić Brkanac

Ocjenitelji: izv. prof. dr. sc. Sandra Radić Brkanac

izv. prof. dr. sc. Ines Radanović

izv. prof. dr. sc. Iva Juranović Cindrić

Rad prihvaćen: 13. veljače 2019.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Graduation Thesis

Effects of low-temperature stress on the level of specialized metabolites in kale (*Brassica oleracea* var. *acephala*) sprouts

Stjepana Fistanić

Rooseveltovo trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Climate change induces more frequent periods of extreme temperatures which significantly influence agricultural production. Some plant species, including kale (*Brassica oleracea* var. *acephala*), are more resistant to temperature extremes than others. Therefore, the purpose of this study is to monitor the responses of kale sprouts to low temperature stress through three experiments (I, II, III). Three days old plants were exposed to chilling (8° C) (24 h at I, II, III) and freezing (-8 °C) (24 h at II, 4h at III.) stress in comparison with control (21 °C). Lowering the temperature slowed the physiological processes and the sprouts exposed to lower temperatures had shorter roots and consequently lower yield. The stress also reflected in biochemical changes - the higher level of proline, the stress marker, and the lower level of chlorophyll were measured in the sprouts exposed to lower temperatures. The exposure to the chilling temperature did not significantly influence the level of the total polyphenols, flavonoids, phenolic acids or antioxidant activity, while the exposure to the freezing temperature resulted in lowering the level of the total polyphenols and phenolic acids in the second cultivation in which the length of exposure to that temperature was 24 h. The exposure to the freezing temperature caused the total amount of carotenoids to decrease, while the level of the glucosinolates did not show a clear trend with regard to temperature and the time of cultivation.

(50 pages, 27 figures, 5 tables, 52 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in Central Biological Library

Key words: Brassicaceae, kale, proline, specialized metabolites, chlorophyll, carotenoids, antioxidant activity

Supervisor: dr. sc. Dunja Šamec, Res. Assoc.

Cosupervisor: dr. sc. Sandra Radić Brkanac, Assoc. Prof.

Reviewers: dr. sc. Sandra Radić Brkanac, Assoc. Prof.

dr. sc. Ines Radanović, Assoc. Prof.

dr. sc. Iva Juranović Cindrić, Assoc. Prof.

Thesis accepted: 13. February 2019.

Sadržaj

1. Uvod	1
1.1. Kupusnjače (Brassicaceae).....	1
1.1.2. Raštika (<i>Brassica oleracea</i> var. <i>acephala</i>).....	3
1.2. Specijalizirani biljni metaboliti	5
1.2.1. Polifenoli	6
1.2.2. Glukozinolati.....	7
1.2.3. Karotenoidi.....	9
1.3. Abiotski stres.....	9
1.3.1. Abiotski stres izazvan niskim temperaturama.....	10
1.4. Markeri stresa: prolin i fotosintetski pigmenti	11
1.5. Cilj istraživanja	11
2. Materijali i metode	13
2.1. Biljni materijal.....	13
2.2. Oprema i kemikalije	13
2.2.1. Oprema	13
2.2.2. Kemikalije	14
2.3. Metode.....	15
2.3.1. Priprema podloge i sterilizacija sjemena.....	15
2.3.2. <i>In vitro</i> uzgoj klijanaca raštike	15
2.3.3. Optimizacija eksperimenta za praćenje odgovora raštike na stres izazvan niskim temperaturama.....	16
2.3.4. Sakupljanje materijala i liofilizacija.....	18
2.3.5. Određivanje prolina.....	18
2.3.6. Određivanje specijaliziranih metabolita.....	19
2.3.8. Antioksidacijska aktivnost	24
2.3.9. Statistička obrada	24
3. Rezultati	25
3.1. Klijavost	25
3.2. Duljina korijena i masa klijanaca raštike	26
3.3. Prolin	28
3.4. Polifenolni spojevi.....	29

3.4.1. Ukupni polifenoli	29
3.4.2. Ukupni flavonoidi	30
3.4.3. Fenolne kiseline.....	31
3.5. Glukozinolati.....	32
3.6. Fotosintetski pigmenti: klorofil <i>a</i> i <i>b</i> , ukupni klorofil i ukupni karotenoidi	33
3.7. Antioksidacijska aktivnost	38
4. Rasprava	40
4.1. Klijavost, duljina korijena i masa klijanaca	40
4.2. Prolin	40
4.3. Specijalizirani metaboliti.....	41
4.3.1. Polifenolni spojevi.....	41
4.3.2. Glukozinolati.....	42
4.3.3. Fotosintetski pigmenti: klorofil <i>a</i> i <i>b</i> , ukupni klorofili i ukupni karotenoidi	42
4.4. Antioksidacijska aktivnost	43
5. Zaključak.....	44
6. Literatura	45
7. Životopis.....	50

1. Uvod

1.1. Kupusnjače (Brassicaceae)

Porodica kupusnjača (Brassicaceae) obuhvaća mnoge vrste komercijalnog značaja čija je primjena prisutna stoljećima u prehrani i tradicionalnoj medicini. Česta je njihova upotreba u obliku svježeg, konzerviranog i procesiranog povrća, a pojedine vrste koriste se i za proizvodnju biljnih ulja (Šamec i Salopek-Sondi, 2018). Kupusnjače imaju vrlo složenu taksonomiju i sistematiku, monofilogenska su skupina koja po najnovijim nalazima broji 338 poznatih rodova te oko 3709 biljnih vrsta rasprostranjenih po cijelom svijetu osim Antartike (Al-Shehbaz i sur., 2006; Franzke i sur., 2011). Smatra se da porodica kupusnjača potječe iz Iransko-Turanske regije, odakle se proširila u ostale dijelove svijeta, zbog iznimno dobre prilagodbe na različite klimatske uvjete (Franzke i sur., 2011). Mnogi povijesni zapisi govore o upotrebi kupusnjača u prehrani i tradicionalnoj medicini, a oni dopiru čak i 3000. g. pr. Kr. kad je zabilježena upotreba kupusnjača u Indiji (Al-Shehbaz, 2011). U današnje vrijeme, najčešće uzgojeno povrće iz porodice kupusnjača su vrste *Brassica oleracea* i *Brassica rapa* čiji su gotovo svi dijelovi jestivi (lišće, cvat, stabljika, korijen i sjeme), dok se kod nekih drugih vrsta, kao što su *Brassica nigra*, *Brassica carinata* i *Brassica juncea* za jelo koriste samo sjemenke. Glavna vrsta koja se koristi kao povrće iz porodice Brassicaceae je *Brassica oleracea* koja uključuje različite kultivare koji se dijele u grupe s obzirom na morfološke karakteristike, a najčešće korišteni u prehrani su kupus, kelj, raštika, brokula, prokulice, cvjetača i koleraba (Slika 1.). U tablici 1. prikazane su najčešće vrste i grupe roda *Brassica* iz porodice Brassicaceae te njihovi dijelovi koji se koriste za prehranu (Šamec i Salopek-Sondi, 2018).

Tablica 1. Neke od najpoznatijih biljaka iz porodice Brassicaceae korištene u prehrani ljudi
(Šamec i Salopek-Sondi, 2018)

ROD, VRSTA	GRUPA	HRVATSKO IME	JESTIVI DIO
<i>Brassica oleracea</i>	var. <i>capitata</i>	kupus	lišće
	var. <i>acephala</i>	kelj, raštika	lišće
	var. <i>alboglabra</i>	kineska brokuli, Kai-lan	lišće
	var. <i>gemmifera</i>	prokulice	pupoljci
	var. <i>botrytis</i>	karfiol	cvat
	var. <i>italica</i>	brokula	cvat
<i>Brassica rapa</i>	ssp. <i>rapa</i>	repa	korijenje
<i>Brassica napus</i>	var. <i>oleifera</i>	uljana repica	sjemenke
<i>Brassica nigra</i>		crna gorušica	sjemenke
<i>Eruca vesicaria</i>		riga, rukola	lišće, stabljika
<i>Raphanus sativus</i>		rotkvica	korijenje
<i>Wasabia japonica</i>		Wasabi	korijenje



Slika 1. Različiti kultivari povrća vrste *Brassica oleracea* (preuzeto s: <http://blog.linio.com.co/hipotiroidismo-en-adultos/>)

Osim što se kupusnjače koriste u gastronomiji, od drevnih vremena u različitim kulturama širom svijeta korištene su i u tradicionalnoj medicini. Njihov pozitivan učinak na ljudsko zdravlje pokazale su i mnoge epidemiološke studije koje ukazuju na činjenicu da je prehrana koja je bogata kupusnjačama povezana s nižim rizikom od pojave nekoliko vrsta karcinoma, no točni mehanizmi djelovanja još su uvijek predmet istraživanja (Šamec i Salopek-Sondi, 2018).

1.1.2. Raštika (*Brassica oleracea* var. *acephala*)

Naziv: *Brassica oleracea* var. *acephala*

Red: *Brassicales*

Porodica: Brassicaceae

Rod: *Brassica*

Narodno ime: raštika, raščika



Slika 2. *Brassica oleracea* var. *acephala* (preuzeto iz rada Šamec i sur., 2018b)

Raštika (*Brassica oleracea* var. *acephala*) se smatra jednom od najstarijih vrsta iz porodice kupusnjača, pripada vrsti *Brassica oleracea*, grupi *acephala*. Ime grupe potječe od grčke riječi koja znači "bez glave". Pripadnici *acephala* skupine morfološki su najbliži divljim precima *Brassica oleracea* vrsta koje nisu posjedovali svojstvo formiranja listova u glavu. Neki od postojećih dokaza upućuju da je divlji kupus podrijetlom s prostora istočnog Mediterana i obale Baltičkog mora, a od njega su se razvili današnji moderni varijeteti glavatog kupusa (Balkaya i sur., 2005). Upravo je povrće iz skupine *acephala* u koju pripada raštika najbliže izvornoj vrsti divljeg kupusa koje su zadržale svojstvo tolerancije na suhu klimu, a dobro podnose i hladnoću (Pavlović, 2017).

U posljednje vrijeme sve više potrošača vjeruje da hrana, osim da zadovolji glad, može izravno pridonijeti zdravlju i sprečavanju bolesti povezane s prehranom. Povrće koje se često nalazi na popisu "najzdravije" hrane upravo je povrće koje pripada rodu *Brassica*, vrsti *Brassica oleracea*, skupini *acephala*. Općenito, povrće iz porodice Brassicaceae sadrži veći udio Ca, riboflavina i vitamina K, dok je količina vitamina C viša kod raštike nego u drugom povrću ove skupine (Šamec i sur., 2018b). Također, raštika je prepoznata kao dobar izvor vitamina (A, B1, B2, B6, C i E) i minerala (K, Ca, Mg, Fe i Cu). Osim toga, sadrži i čitav niz

specijaliziranih metabolita čija se prisutnost u hrani povezuje s manjim rizikom za obolijevanje od nekih vrsta kroničnih bolesti (Šamec i sur., 2018b).

Raštika se u Hrvatskoj uzgaja na otocima i širem obalnom području istočne strane Jadranskog mora, Bosni i Hercegovini i Crnoj Gori gdje se najčešće uzgaja u domaćinstvima. U komercijalnom smislu, u Hrvatskoj nije ekonomski značajno povrće. Tolerancija na nisku temperaturu te mogućnost preživljavanja tijekom razdoblja zime uvrštava je u povrće koje se koristi kao svježe povrće od kasne jeseni pa sve do ranog proljeća iduće sezone (Batelja i sur., 2009; Ayaz i sur., 2006).

1.2. Specijalizirani biljni metaboliti

Biljke su se kao sesilni organizmi na različite načine prilagodile rastu u različitim okolišnim uvjetima. Jedan od načina je i proizvodnja različitih metabolita koji joj pružaju zaštitu od biotičkog i abiotičkog stresa kojima je neprestano izložena tijekom svog rasta i razvoja. Tradicionalno se metaboliti dijele na primarne i sekundarne. Primarni su oni metaboliti bez kojih biljka ne bi mogla opstati, a omogućavaju joj rast i razvoj. U primarne se ubrajaju ugljikohidrati, masne kiseline, aminokiseline, nukleinske kiseline i sl. Druga grupa su tzv. sekundarni metaboliti koji imaju esencijalnu ulogu u razvoju biljaka, a posebno u prilagodbi i preživljavanju u nepovoljnim okolišnim uvjetima (Namdeo, 2007). Zbog toga se umjesto naziva sekundarni sve češće upotrebljava naziv specijalizirani biljni metaboliti kako bi se istaknula njihova specifična i esencijalna uloga (Kliebenstein i Osbourn, 2012). Razlika primarnih i specijaliziranih metabolita je još i u tome što se primarni nalaze u svim biljkama, dok se specijalizirani nalaze samo kod određenih biljnih vrsta ili kultivara te su ponekad prisutni u manjim količinama. Do danas je otkriveno preko 200 000 različitih specijaliziranih metabolita, no taj se broj svakim danom povećava zbog sve suvremenijih metoda za detekciju (Ribera i Zuniga, 2012). Procjenjuje se da se u jednoj biljci može naći čak nekoliko tisuća specijaliziranih metabolita. Osim njihove iznimne važnosti za rast i razvoj, zaslužni su i za pozitivan učinak biljaka na zdravlje ljudi pa ih se često naziva i bioaktivnim tvarima, fitokemikalijama i nutraceuticima (Ribera i Zuniga, 2012). Prisutnost polifenola, glukozinolata i karotenoida povezuje se s pozitivnim učinkom kupusnjača na ljudsko zdravlje (Šamec i Salopek-Sondi, 2018). Za razliku od polifenola i glukozinolata, karotenodi su prisutni u svim biljkama te se zbog njihove važne uloge u fotosintezi ponekad uvrštavaju i u primarne metabolite. Specijalizirani metaboliti se prema kemijskoj strukturi pojednostavljeno dijele u nekoliko skupina, njihova podjela prikazana je na slici 3. Prvenstveno, biljke

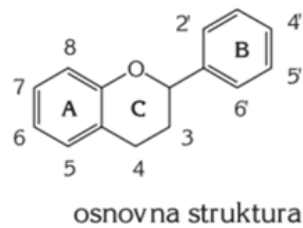
sintetiziraju specijalizirane metabolite kako bi se prilagodile negativnim okolišnim čimbenicima koji bi mogli narušiti njihove osnovne fiziološke potrebe (Šamec i Salopek-Sondi, 2018).



Slika 3. Podjela specijaliziranih metabolita na glavne skupine (izrada: S. Fistanić)

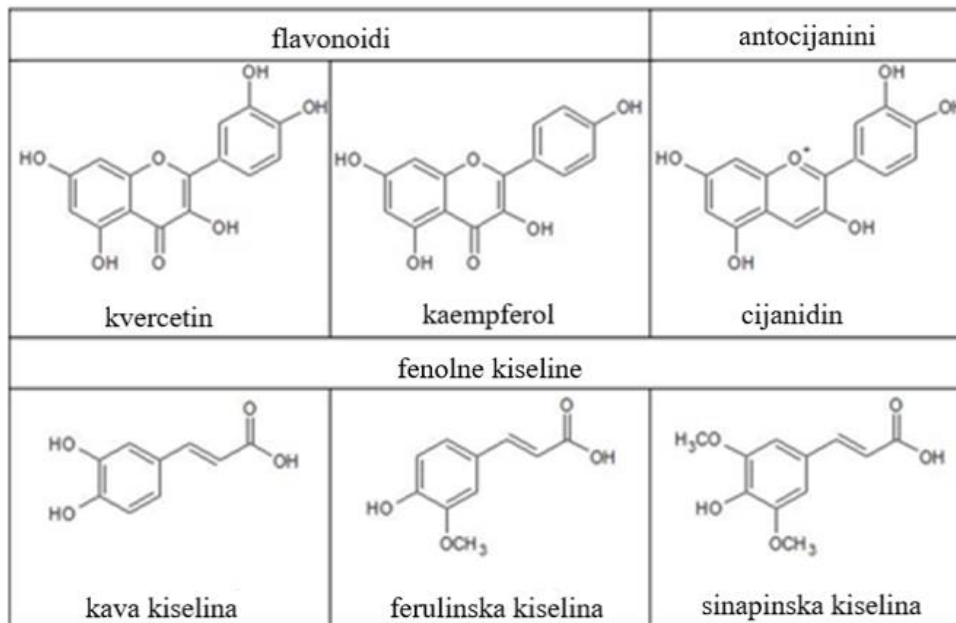
1.2.1. Polifenoli

Polifenoli su spojevi koji su prirodno najrasprostranjenija skupina specijaliziranih metabolita. U različitim biljnim vrstama identificirano je više od 8 000 polifenolnih spojeva. Polifenoli posjeduju jedan ili više aromatskih prstenova s jednom ili više hidroksilnih skupina (Dai i Mumper, 2010). S obzirom na njihovu osnovnu kemijsku strukturu mogu se podijeliti na flavonoide i neflavonoide. Glavne podskupine flavonoida su flavoni, flavonoli, flavanoli, izoflavoni, flavanoni i antocijanini. Flavonoidi su najbolje proučena skupina polifenola, a do danas je identificirano više od 4 000 različitih flavonoida, od kojih su mnogi zaslužni za atraktivne boje cvjetova, voća i lišća (Cartea i sur., 2011; Pandey i Rizvi, 2009). Osnovna kemijska struktura flavonoida je kostur od petnaest ugljikovih atoma raspoređenih u dva aromatska prstena, koji su povezani heterocikličkim piranskim prstenom (Cartea i sur., 2011) (Slika 4.). Neflavonoidi su spojevi jednostavnije građe od flavonoida i dijele se na fenolne kiseline, stilbene i lignane (Katalinić i sur., 2010). Fenolne kiseline široko su rasprostranjene u različitim biljkama te su često prisutne i u hrani biljnog podrijetla (Gruz i sur., 2008). Javljaju se u obliku estera, glikozida ili amida, rjeđe su u slobodnom obliku. Slobodne fenolne kiseline nalaze se najčešće u voću i povrću, a fenolne kiseline u vezanom obliku nalaze se u žitaricama i sjemenkama (Tsao, 2010). Podijeljene su u dvije glavne skupine: derivati benzojeve i derivati cimetine kiseline (Pandey i Rizvi, 2009).



Slika 4. Osnovna struktura flavonoida (preuzeto i prilagođeno iz rada Kazazić, 2004)

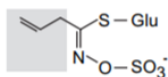
U raštici su najprisutniji kvercetin i kaempferol od flavonoida, od fenolnih kiselina kava, ferulinska i sinapinska, dok je od antocijanina najdominantniji cijanidin i njegovi derivati (Šamec i sur., 2018b) (Slika 5.).



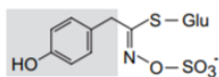
Slika 5. Najčešće zastupljeni polifenoli u raštici (preuzeto i prilagođeno iz rada Šamec i sur., 2018b)

1.2.2. Glukozinolati

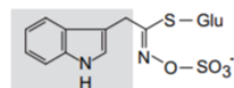
Glukozinolati su specijalizirani biljni metaboliti koji su zastupljeni kod 16 porodica reda *Capparales*, od kojih je porodica Brassicaceae najznačajnija za prehranu ljudi (Verkerk i Dekker, 2001). Glukozinolati sadrže sumpor, po kemijskoj strukturi su β -tioglukozid-*N*-hidroksisulfati, kod kojih su sulfatna skupina i glukoza vezane na aglukon koji se sintetizira iz aminokiselina (Fahey i sur., 2001; Travers-Martin i sur., 2008). Glukozinolati se međusobno razlikuju po strukturi bočnog lanca koja je određena aminokiselinom. S obzirom na strukturu bočnog lanca, glukozinolati se dijele na alifatske, aromatske i indolne glukozinolate. Opća struktura i klasifikacija glukozinolata prikazana je na slici 6.



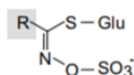
alifatski glukozinolati



aromatski glukozinolati



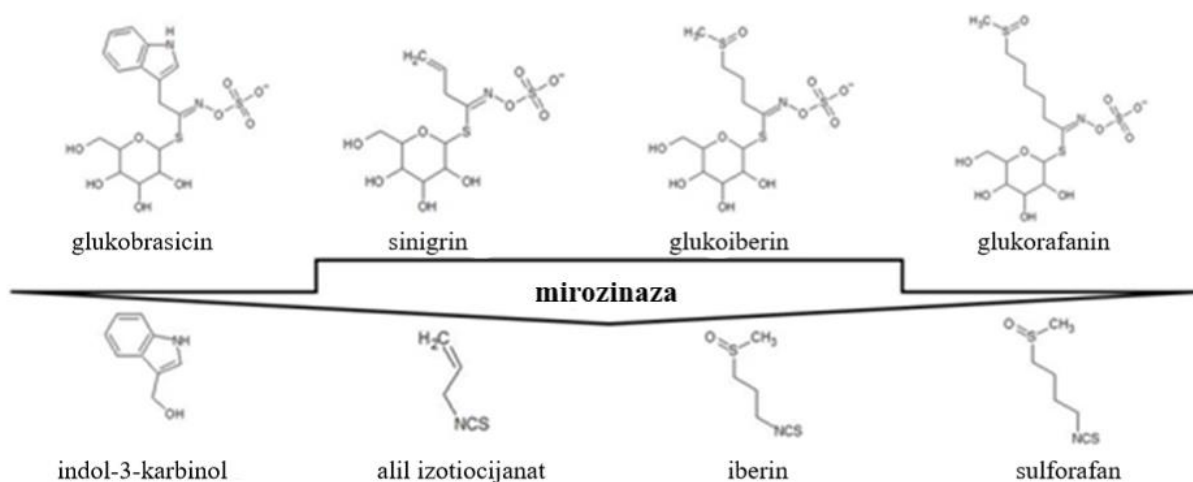
indolni glukozinolati



opća formula glukozinolata

Slika 6. Opća struktura glukozinolata te podjela glukozinolata s obzirom na bočni lanac (preuzeto i prilagođeno iz rada Travers-Martin i sur., 2008)

Glukozinolati nisu biološki aktivni sve dok ne dođu u kontakt s enzimom mirozinazom (Martinez-Ballesta i Carvajal, 2015). Mirozinaza se nalazi prostorno odvojena u stanicama biljaka od glukozinolata. U trenutku oštećenja biljnih stanica, mirozinaza dolazi u kontakt sa glukozinolatima te dolazi do hidrolize (Martinez-Ballesta i Carvajal, 2015). Produkti hidrolize glukozinolata doprinose tipičnoj aromi povrća iz porodice Brassicaceae te se povezuju s pozitivnim utjecajem na zdravlje ljudi. Razni bioaktivni razgradni produkti hidrolize uključuju izotiocijanate, nitrile, tiocijanate, epitionitrile i oksazolidinone (Šamec i Salopek-Sondi, 2018). Na slici 7. prikazani su najčešće detektirani glukozinolati u raštici te njihovi produkti hidrolize.



Slika 7. Glukozinolati u raštici te njihovi produkti hidrolize (preuzeto i prilagođeno iz rada Šamec i sur., 2018b)

1.2.3. Karotenoidi

Karotenoidi predstavljaju jednu od najraširenijih i najbrojnijih skupina prirodnih pigmenata. U biljkama su u cvjetovima, plodovima i gomoljima u obliku žutih, narančastih i crvenih pigmenata, a u zelenim biljnim tkivima su vidljivi tijekom godišnje razgradnje klorofila u jesen, jer su često „prekriveni“ zelenom bojom klorofila (Avalos i Carmen Limon, 2015). Ime „karoten“ prvi je predložio Wackenroder 1831. godine kada je izolirao pigment iz korijenja mrkve. Nekoliko godina kasnije Berzelius je iz otpalog lišća ekstrahirao žuti pigment kojeg je nazvao ksantofil. Uočavajući sličnosti između spojeva poznatih kao karoteni i ksantofili, Tswett uvodi 1911. godine za obje skupine pigmenata naziv karotenoidi (Armstrong i Hearst, 1996). S obzirom na strukturu, uglavnom su to linearne organske molekule s višestruko konjugiranim dvostrukim vezama, pripadaju spojevima tetraterpenoida koji uglavnom sadrže po 40 C atoma (Nisar i sur., 2015; Šamec i sur., 2018b). Strukturno se razlikuju dvije grupe karotenoida: karoteni i ksantofili (Avalos i Carmen Limon, 2015). Karoteni su najčešće građeni samo od ugljika i vodika, a ksantofili sadrže funkcionalne skupine koje sadrže kisik (Šamec i sur., 2018b). Dvije glavne funkcije karotenoida su apsorpcija energije za korištenje u fotosintezi i zaštita klorofila od oštećenja uzrokovanih svjetlošću (Avalos i Carmen Limon, 2015). Povrće iz porodice Brassicaceae dobar je izvor β -karotena i luteina koji se zajedno sa zeaksantinom zbog jakih antioksidativnih svojstava smatraju bitnim za očuvanjem vida u ljudi (Manikandan i sur., 2016). α i β karoteni su prekursori vitamina A te su bitni za zdravu kožu, kosti, kao i za probavni i dišni sustav. Glavni karotenoidi koji se nalaze u raštici su lutein, β -karoten, violaksantin i neoksantin (Azevedo i Rodriguez-Amaya, 2005).

1.3. Abiotski stres

Biljke su sesilni organizmi te se kod njihovog rasta i razvoja često izmjenjuju vanjski uvjeti koji mogu na biljku djelovati nepovoljno te onda govorimo o stresu. Generalno razlikujemo biotski i abiotski stres. Biotski stres uzrokovan je djelovanjem nekog drugog organizma kao što su virusi, bakterije, insekti i sl. na biljni organizam. Abiotski je stres uzrokovan djelovanjem okoliša bez prisutnosti drugog organizma. Klimatski čimbenici, kao što su ekstremne temperature, suša, onečišćenje tla visokom koncentracijom soli itd., često su glavni abiotički stresori (Krasensky i Jonak, 2012). Svi ti uvjeti ograničavaju rast i razvoj biljaka, smanjuju prinos, a u ekstremnim slučajevima uzrokuju smrt biljke. Biljka na stres odgovara složenim mehanizmima obrane. Odgovori se javljaju na svim razinama organizacije, uključujući modifikacije staničnih struktura, promjene u staničnim ciklusima i podjeli stanica, mijenjanje metabolizma na različite načine, što uključuje proizvodnju različitih metabolita,

posebice specijaliziranih metabolita (Bartels i Sunkar, 2005). No, točni mehanizmi sinteze specijaliziranih metabolita uslijed stresnih uvjeta još su uvijek nepoznati.

1.3.1. Abiotski stres izazvan niskim temperaturama

Za normalan rast i razvoj biljaka potrebna je optimalna temperatura rasta koja se može razlikovati u pojedinima fazama razvitka i naravno za pojedine biljne vrste. Do temperaturnog stresa na biljni organizam dolazi u periodima kada okolna temperatura rasta značajno odstupa od optimalne temperature rasta te razlikujemo stres izazvan visokim temperaturama i stres izazvan niskim temperaturama. Niska temperatura je jedan od najopasnijih abiotskih čimbenika koji utječe na biljke. Niske temperature usporavaju metaboličke procese, disanje, fotosintezu, sintezu proteina, jer su sve enzimske reakcije ovisne o temperaturi (Ramakrishna i sur., 2011). Kod stresa uzrokovanog niskim temperaturama, razlikujemo temperature pothlađivanja ($< 10\text{ }^{\circ}\text{C} < 0\text{ }^{\circ}\text{C}$) i temperature smrzavanja ($> 0\text{ }^{\circ}\text{C}$). Izloženost biljaka niskim temperaturama iznad temperature smrzavanja kod mnogih vrsta pokreće aktivaciju tzv. aklimatizacijskog mehanizma koji omogućava opstanak biljaka u tim uvjetima no taj mehanizam ponajprije ovisi o vrsti biljke, jer poznato je da sve biljne vrste ne podnose stres niskim temperaturama na jednak način. Generalno, mehanizmi prilagodbe biljaka na niske temperature uključuju ekspresije gena koji kodiraju proteine koji pak potiču biosintezu metabolita koji mogu igrati važnu ulogu u interakcijama biljaka i okoline. Dosadašnja istraživanja pokazuju da uslijed stresa niskim temperaturama u biljkama dolazi do porasta razine fenolnih kiselina, posebno onih iz skupine hidroksicimetnih kiselina (Jin i sur., 2003; Martinez i sur., 2016)

Neke biljke razvile su dobre aklimatizacijske mehanizme kao odgovor na nisku temperaturu, a jedna od takvih vrsta je i raštika (*Brassica oleracea* var. *acephala*) koja dobro podnosi temperature pothlađivanja, čak i temperature smrzavanja (Jin i sur., 2003). Kako je gore spomenuto, raštika je bogata specijaliziranim metabolitima koji mogu imati važne uloge u prilagodbi na okolišne čimbenike, no za sada je to slabo istraženo (Šamec i sur., 2018b).

U ovom radu biljke su za potrebe izlaganja niskim temperaturama uzgajane *in vitro* na agaroznim podlogama. *In vitro* uzgoj na agaroznoj podlozi koristan je sustav za dobivanje brzog odgovora biljaka na neki okolišni stres. Prednosti takvog uzgoja su njegova brzina izvođenja, također i mogućnosti rada u sterilnim, kontroliranim uvjetima. Na rast i razvoj samog klijanca utječe nekoliko faktora koji uključuju vernalizaciju, duljinu klijanja te samu veličinu klijanca prije izlaganja stresnim uvjetima. Stoga, prije samog eksperimenta niskim

temperaturama, napravljeni su preliminarni eksperimenti tijekom kojih je ispitan vremenski period vernalizacije i starost biljaka koje će se izlagati stresu niskim temperaturama.

1.4. Markeri stresa: prolin i fotosintetski pigmenti

Izlaganje biljaka stresnim uvjetima dovodi do akumuliranja niza metabolita, osobito aminokiselina koje imaju važnu ulogu u metabolizmu i razvoju biljaka. Mnoga istraživanja pokazuju pozitivnu korelaciju između nakupljanja prolina i stresnog stanja u kojem se biljka nalazi. Prolin tijekom stresa djeluje kao signalizirajuća molekula, njegovo prekomjerno nakupljanje tijekom stresa daje zauzvrat biljci otpornost na stres održavanjem turgora ili osmotske ravnoteže (Hayat i sur., 2012). Stresni uvjeti stimuliraju sintezu prolina koji štiti biljku od stresa na način da stabilizira i substancične strukture kao što su membrane i proteini i uklanja slobodne radikale (Ashraf i Foolad, 2007). Zbog toga, kod biljaka koje su izložene abiotskom stresu dolazi do povišenja razine prolina te se on smatra markerom stresa (Pavlović i sur., 2018).

Također, stres utječe i na fotosintetski aparat čija se aktivnost smanjuje uslijed stresnih uvjeta (Rodríguez i sur., 2015). Omjer klorofila *a* i *b* kao i omjer ukupnog klorofila i karotenoida pokazatelj je učinkovitosti fotosinteze te često ovisi o količini svjetla kojemu je biljka izložena tijekom rasta (Lichtenthaler i Buschmann, 2001). Omjer klorofila *a* i *b* te omjer ukupnog klorofila i karotenoida parametar je koji se koristi za otkrivanje stresa u biljkama. Uz pomoć tog parametra moguće je otkriti stres i razinu stresa pod kojim se biljka nalazi (Ibaraki i Murakami, 2007). Kod biljaka koje su izložene stresu omjer ukupnog klorofila i karotenoida često je niži nego kod kontrole, jer dolazi do bržeg propadanja klorofila nego karotenoida (Lichtenthaler i Buschmann, 2001).

1.5. Cilj istraživanja

Klimatske promjene sve više utječu na poljoprivrednu proizvodnju, prinos i kvalitetu usjeva zbog sve češće pojave ekstremnih temperatura tijekom sezone rasta. Temperaturni stres poput hladnog stresa predstavlja ozbiljnu prijetnju održivosti i može dovesti do velikih gubitaka usjeva, čime se ograničava dostupnost povrća na tržištu. Poznato je da neke biljne vrste bolje podnose niske temperature, a jedna od njih je i raštika (*Brassica oleracea* var *acephala*) koja posljednjih godina u svijetu stječe veliku popularnost kao „superhrana“, a u Hrvatskoj se tradicionalno uzgaja. Bogata je specijaliziranim metabolitima iz skupine polifenola, glukozinolata i karotenoida koji pozitivno djeluju na ljudsko zdravlje. Kako je poznato da

specijalizirani metaboliti mogu imati važne uloge i u prilagodbi biljaka na stres, u ovom radu ispitaio se utjecaj stresa niskim temperaturama na razinu specijaliziranih metabolita. Cilj je istraživanja bio odrediti promjene u klijancima raštike (*Brassica oleracea* var. *acephala*) izloženim temperaturi pothlađivanja (8 °C) te smrzavanja (-8 °C) uz odgovarajuću kontrolu (21 °C). Nakon izlaganja stresnim uvjetima određena je masa biljke, duljina korijena te sadržaj glavnih grupa specijaliziranih metabolita (polifenola, glukozinolata i karotenoida) i antioksidacijska aktivnost. Nadalje, izmjerena je razina prolina kao markera stresa te sadržaj klorofila *a* i *b*.

2. Materijali i metode

2.1. Biljni materijal

Za istraživanja u ovom radu korišteno je sjeme raštike *Brassica oleracea* var. *acephala*. Sjeme je bilo podrijetlom s obiteljsko-poljoprivrednog gospodarstva iz Vrgorca. Sjemenke su prije naklijavanja čuvane u hladnjaku u plastičnim posudama.

2.2. Oprema i kemikalije

2.2.1. Oprema

Pribor koji se koristio za sterilizaciju sjemena, naklijavanje i uzgoj klijanaca raštike steriliziran je u autoklavu.

Biljke su izlagane niskim temperaturama u jedinici za uzgoj koja ima integrirano LED svjetlo (intenzitet svjetla: $100 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$). Jedinica je bila postavljena u prostorijama za uzgoj biljaka na IRB-u te su bili kontrolirani uvjeti rasta (fotoperiod, temperatura). Petrijeve zdjelice s klijancima raštike bile su okomito postavljene (Slika 8.).



Slika 8. Petrijeve zdjelice s klijancima raštike u prijenosnoj jedinici za uzgoj koja je korištena za stres niskim temperaturama (fotografija: S. Fistanić)

Za vršenje ekstrakcije te analize uzoraka klijanaca raštike korišteni su:

- pinceta
- menzura
- Eppendorf epruvete

- Falcon epruvete
- kivete
- pipete
- autoklav, NC 40M / 90M
- analitička vaga, R200D
- miješalica (Vortex), EV-102
- magnetna miješalica s vrućom pločom, MSH-300
- rotirajuća miješalica, Bio RS-24
- mikser visoke frekvencije, MM 400
- liofilizator, LYOVAC GT 2
- termoblok, Bio TDB-100
- ultrazvučna kupelj, Sonorex Digitec
- centrifuga, Centrifuge 5424 R
- spektrofotometar, BioSpec-1601 E.

2.2.2. Kemikalije

Kemikalije korištene za analizu (standardi, kemikalije i reagensi):

- 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- 3%-tni izosan, Izosane - G (Pliva, Hrvatska)
- 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina (Trolox) (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- 80%-tni aceton, CH_3COCH_3 (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- 80%-tni metanol, CH_3OH (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- agaroz (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- aluminijev klorid, AlCl_3 (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- destilirana voda
- etanol, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- fenol, $\text{C}_6\text{H}_5\text{OH}$ (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Folin-Ciocalteu reagens (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- galna kiselina, $\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_5$ (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- katehin (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)

- kava kiselina, $C_9H_8O_4$ (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- klororovodična kiselina, HCl (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- natrijev hidroksid, NaOH (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- natrijev karbonat, Na_2CO_3 (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- natrijev molibdat dihidrat, $Na_2MoO_4 \times 2H_2O$ (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- natrijev nitrit, $NaNO_2$ (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- natrijev tetraklor paladat, Na_2PdCl_4 (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- ninhidrin, $C_9H_6O_4$ (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- octena kiselina, CH_3COOH (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- tekući dušik.

2.3. Metode

2.3.1. Priprema podloge i sterilizacija sjemena

Klijanci raštike uzgajani su na 1%-tnoj agaroznoj podlozi u Petrijevim zdjelicama. Za pripremu podloge, 10 g agara otopljeno je u 1000 mL destilirane vode te je otopina podijeljena u dvije boce od po 1 L koje su potom sterilizirane u autoklavu 20 min na 120 °C. Nakon sterilizacije još topla otopina izlita je u okrugle Petrijeve zdjelice, u svaku otprilike 20 mL. Zdjelice s agarom ohlađene su u laminaru te su čuvane do korištenja na +4 °C najviše tjedan dana.

Prije naklijavanja na agaroznu podlogu, sjeme raštike sterilizirano je u 3%-tnom Izosanu G (granulat za opću sanitaciju i dezinfekciju). U tu svrhu, 0,3 g Izosana G otopljeno je uz pomoć magnetne miješalice u 10 mL destilirane vode. U plastičnu tubicu s čepom od 2 mL dodano je po 50 sjemenki te u svaku tubicu otpipetirano po 1 mL otopine Izosana G. Nakon toga, tubice su stavljene u miješalicu 10 min na 300 rpm. Potom je u laminaru sjeme raštike isprano tri puta steriliziranom destiliranom vodom kako bi se uklonili ostaci dezinficirajućeg sredstva koje bi moglo inhibirati klijanje. Steriliziranom pincetom je isprano sjeme nasadeno na 1%-tni agar.

2.3.2. *In vitro* uzgoj klijanaca raštike

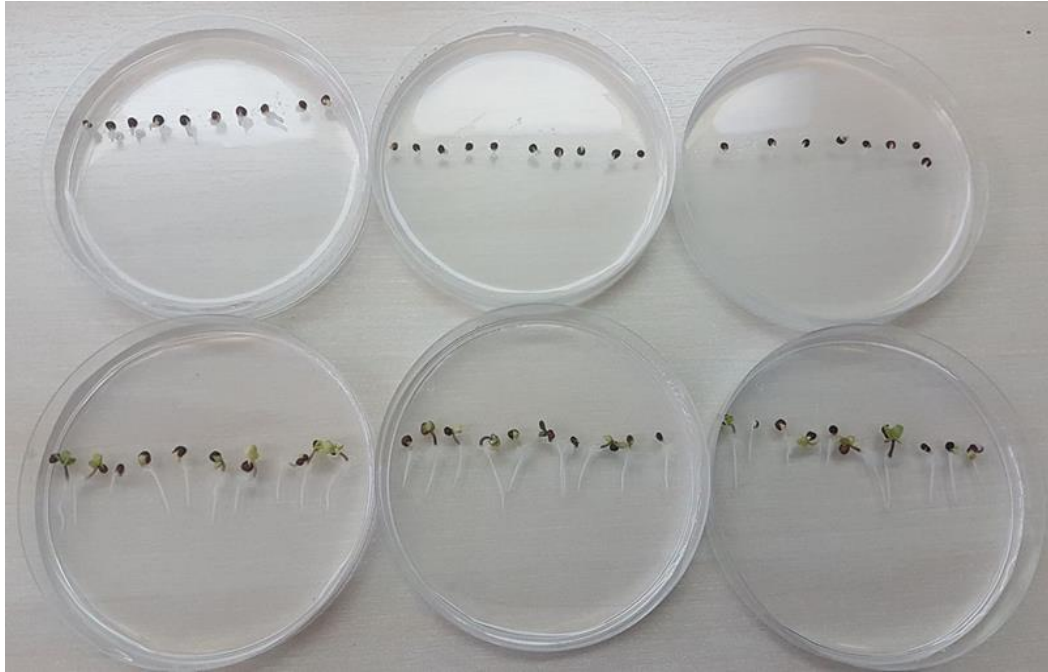
U ovom radu, uzgoj klijanaca za potrebe eksperimenta stresa izazvanog niskom temperaturom sastojao se od nekoliko faza:

- vernalizacija sjemena na agaroznoj podlozi u mraku na +4 °C

- klijanje sjemena na svjetlu na +21 °C
- prijenos proklijalih sjemenki u nove Petrijeve zdjelice
- rast klijanaca na +21 °C u fotoperiodu 16 h dan, 8 h noć u prijenosnoj jedinici za uzgoj, intenzitet svjetla: 100 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$.
- stres niskim temperaturama (prijenosna jedinica za uzgoj premještena u prostorije s različitom temperaturom).

2.3.3. Optimizacija eksperimenta za praćenje odgovora raštike na stres izazvan niskim temperaturama

U prvom eksperimentu nakon sterilizacije, sjemenke su stavljene na agaroznu podlogu te 24 h na +4 °C u mrak u hladnjaku, potom 24 h na 21 °C u fotoperiodu 16 h dan, 8 h noć, intenziteta svjetla 100 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$. Nakon toga, proklijale sjemenke stavljene su na nove agarozne podloge te je polovina premještena u prijenosnoj jedinici za uzgoj u prostoriju na 21 °C u fotoperiodu 16 h dan, 8 h noć, dok je druga polovina premještena u prijenosnoj jedinici za uzgoj u prostoriju pod istim uvjetima osvjetljenja samo što je temperatura bila +8 °C. Nakon 24 h klijanci tretirani stresom na +8 °C nisu pokazivali napredak u rastu, odnosno njihov rast bio je inhibiran, dok su klijanci koji su bili pri temperaturi 21 °C pokazali rast i napredak (Slika 9) te je zaključeno da je niskoj temperaturi potrebno izložiti klijance stare nekoliko dana kako bismo mogli pratiti efekt.



Slika 9. Klijanci raštike (+8 °C) prikazani u gornjem redu ne pokazuju napredak u rastu u odnosu na klijance raštike (+21 °C) prikazane u donjem redu nakon uzgoja i tretiranja stresom (fotografija S. Fistanić)

U drugom eksperimentu nakon sterilizacije, sjemenke su stavljene na agaroznu podlogu te je produljeno vrijeme vernalizacije na 48 h na +4 °C u mraku, potom 72 h na 21 °C u fotoperiodu 16 h dan, 8 h noć. Nakon toga, prokljale sjemenke stavljene su na nove agarozne podloge te su klijanci stari 72 h tretirani niskom temperaturom kao u prvom eksperimentu. Nakon 24 h, klijanci na +8 °C pokazali su manje razvijeno korijenje te kočenje rasta, dok je kod klijanaca koji su bili izloženi temperaturi od 21 °C uočen veći rast i napredak. Zaključeno je da takvi uvjeti bolje odgovaraju eksperimentu te se s takvim uvjetima krenulo u iduće uzgoje koji su korišteni u analizama.

1. UZGOJ: Sjemenke su nakon sterilizacije stavljene 48 h na +4 °C u hladnjaku, potom 72 h na 21 °C u fotoperiodu 16 h dan, 8 h noć. Nakon toga, prokljale sjemenke stavljene su na nove agarozne podloge te su klijanci podvrgnuti stresu. Polovina Petrijevih zdjelica uzgajana je 24 h na 21 °C u fotoperiodu 16 h dan, 8 h noć, dok je druga polovina uzgajana pod identičnim uvjetima osvjetljenja (100 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$), osim što je okolna temperatura bila 8 °C. Nakon točno 24 h izmjerene su duljine i masa klijanaca te su klijanci brzo smrznuti u tekućem dušiku i čuvani na -80 °C do liofilizacije.

2. UZGOJ: Uvjeti uzgoja prije tretiranja stresom identični su prvom uzgoju. Potom je trećina Petrijevih zdjelica uzgajana 24 h na 21 °C u fotoperiodu 16 h dan, 8 h noć, trećina pod

identičnim uvjetima osvjetljenja ($100 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) uz okolnu temperaturu od $+8 \text{ }^\circ\text{C}$ te trećina pod identičnim uvjetima uz okolnu temperaturu od $-8 \text{ }^\circ\text{C}$. Nakon točno 24 h za sve, izmjerene su duljine i masa klijanaca te su klijanci brzo smrznuti u tekućem dušiku i čuvani na $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ do liofilizacije.

3. UZGOJ: Uvjeti uzgoja prije izlaganja stresu jednaki su prvom i drugom uzgoju samo s većim brojem klijanaca i kraćim vremenom izlaganja niskim temperaturama u periodu od 4 h, a ne 24 h. Odnosno, trećina Petrijevih zdjelica uzgajana je na $21 \text{ }^\circ\text{C}$, $2/3$ pod identičnim uvjetima uz okolnu temperaturu od $+8 \text{ }^\circ\text{C}$ 20 h nakon čega je $1/3$ još dodatno izložena temperaturi smrzavanja od $-8 \text{ }^\circ\text{C}$. Ukupno su klijanci bili izloženi kontrolnoj i temperaturi pothlađivanja 24 h dok je treća skupina bila 20 h na $+8 \text{ }^\circ\text{C}$ te dodatno 4 h na $-8 \text{ }^\circ\text{C}$. Nakon ukupno 24 h, neovisno o skupini, izmjerene su duljine i masa klijanaca te su klijanci brzo smrznuti u tekućem dušiku i čuvani na $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ do liofilizacije.

2.3.4. Sakupljanje materijala i liofilizacija

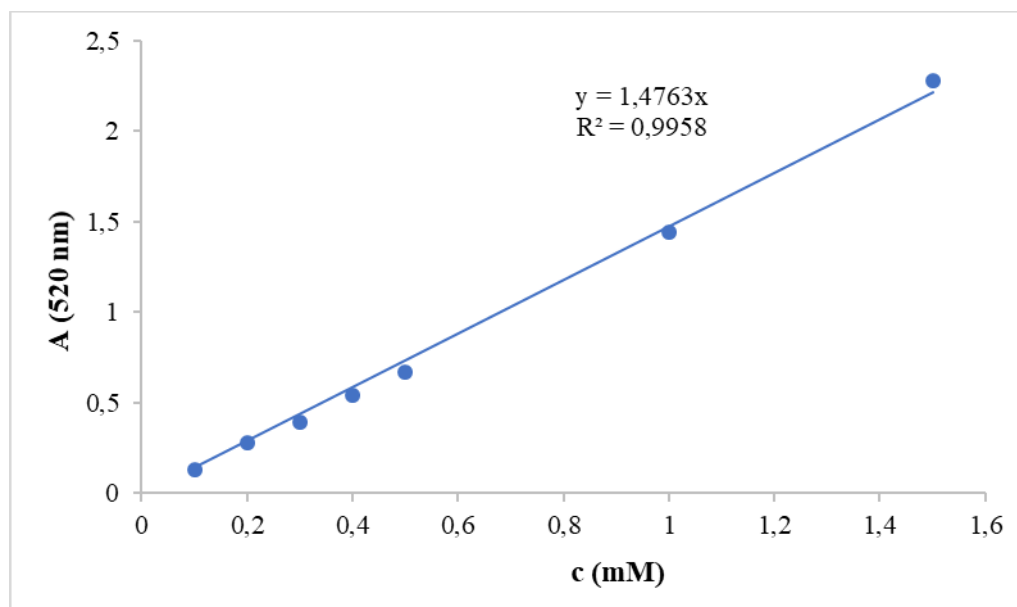
Nakon *in vitro* uzgoja klijanaca i izlaganja niskim temperaturama, klijanci su nakon mjerenja duljine korijena i mase biljaka, sterilnom pincetom sakupljeni s agaroznih podloga te smrznuti u tekućem dušiku. Tako smrznuti biljni materijal stavljen je u liofilizator te je nakon tjedan dana biljni materijal u potpunosti bio osušen. Nakon liofilizacije, biljke su usitnjene u tekućem dušiku u prah te su uzorci čuvani pri sobnoj temperaturi sve do početka analiza.

2.3.5. Određivanje prolina

Ekstrakcija: U Eppendorf epruvetama od 2 mL u triplicatu je odvagano po 30 mg uzoraka. U svaku epruvetu dodan je po 1 mL 70%-tnog etanola. Sadržaj epruveta kratko je homogeniziran na miješalici, zatim su epruvete stavljene u mikser visoke frekvencije 5 min na frekvenciji 30 Hz. Potom su epruvete stavljene u ultrazvučnu kupelj 20 min. Nakon toga su uzorci ekstrahirani na rotacijskom homogenizatoru tijekom 1 h te centrifugirani 10 min na 13 000 rpm, nakon čega je supernatant preliven u nove Eppendorf epruvete od 2 mL te su tako pripremljeni etanolni ekstrakti čuvani u mraku na $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ do korištenja.

Sadržaj prolina određen je iz etanolnih ekstrakata (Cross i sur., 2006). Napravljen je reakcijski mix kojeg čine 1%-tni ninhidrin u 60%-tnoj octenoj kiselini i 20%-tnom etanolu u tamnoj boci koji mora biti uvijek svježije pripremljen. U Eppendorf epruvetu od 1,5 mL otpipetiran je 1 mL reakcijskog mixa i dodano $100 \mu\text{L}$ ekstrakta, kao slijepa proba umjesto ekstrakta korišten je 70%-tni etanol. Zatvorene epruvete homogenizirane su na miješalici. Zatim su epruvete grijane 20 min na $95 \text{ }^\circ\text{C}$ u termo bloku. Nakon grijanja, epruvete su stavljene na

hlađenje u posudu s ledom. Potom je sadržaj prebačen u kivete i izmjerena je apsorbancija na 520 nm. Za izradu baždarnog pravca korišten je prolin u koncentraciji 0-1,5 mmol/L, a baždarni pravac prikazan je na slici 10.



Slika 10. Baždarni pravac prolina korišten za određivanje prolina kao markera stresa

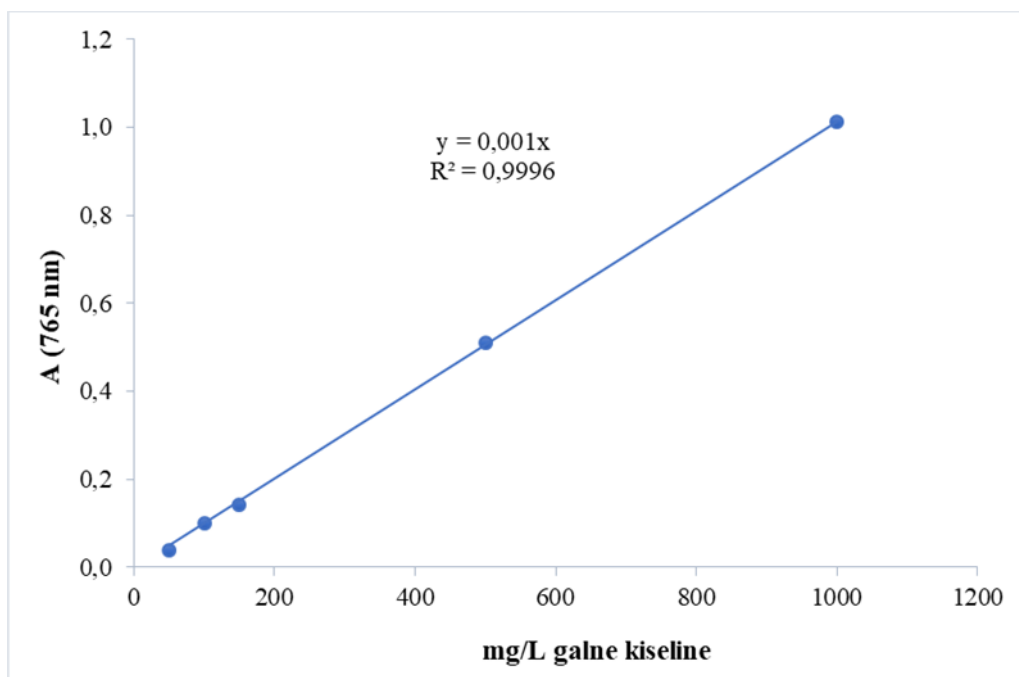
2.3.6. Određivanje specijaliziranih metabolita

2.3.6.1. Polifenoli

Ekstrakcija: Za određivanje ukupnih polifenolnih spojeva pripremljeni su metanolni ekstrakti. U Eppendorf epruvetama od 2 mL u triplikatu je odvagano po 60 mg uzoraka. U svaku epruvetu dodano je po 2 mL 80%-tnog metanola. Sadržaj epruveta kratko je homogeniziran na miješalici. Epruvete su potom stavljene u mikser visoke frekvencije na dodatnu homogenizaciju 5 min na frekvenciji 30 Hz. Nakon toga, uzorci su stavljani u ultrazvučnu kupelj 15 min, ekstrahirani na rotacijskom homogenizatoru tijekom 1 h, zatim su centrifugirani 5 min na 13 000 rpm, nakon čega je supernatant prelišen u nove Eppendorf epruvete od 2 mL te su tako pripremljeni metanolni ekstrakti čuvani u mraku na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ do početka analize i korišteni su za određivanje ukupnih polifenola, fenolnih kiselina, flavonoida i antioksidacijske aktivnosti.

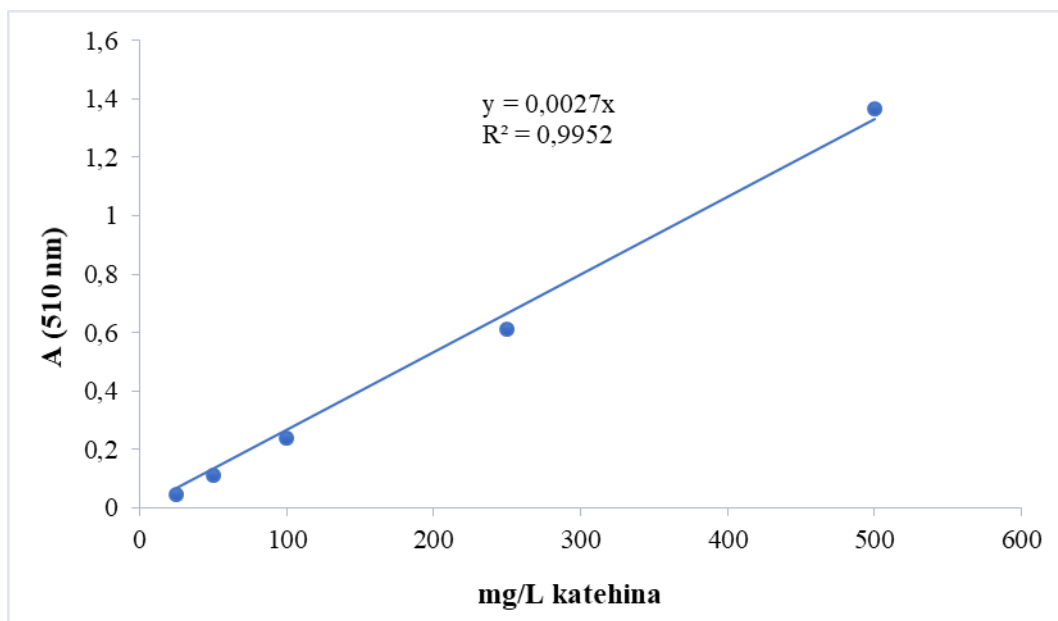
Ukupni polifenoli: Ukupni polifenoli određeni su Folin-Ciocalteu metodom (Singleton i Rossi, 1965) koja je prilagođena za male volumene. U svaku kivetu otpipetirano je 20 μL ekstrakta uzorka (svaki uzorak otpipetiran je u triplikatu), (za slijepu probu 20 μL 80%-tnog metanola), potom je dodano 1,58 mL vode te 100 μL Folin-Ciocalteu reagensa i dobro promiješano. Nakon toga, otpipetirano je 300 μL zasićene otopine natrij karbonata i dobro

promiješano. Otopine su ostavljene na sobnoj temperaturi dva sata i određena je apsorbancija svake otopine na 765 nm u odnosu na slijepu probu. Otopina galne kiseline (0-1000 mg/L) korištena je za izradu baždarnog pravca, a baždarni pravac prikazan je na slici 11.



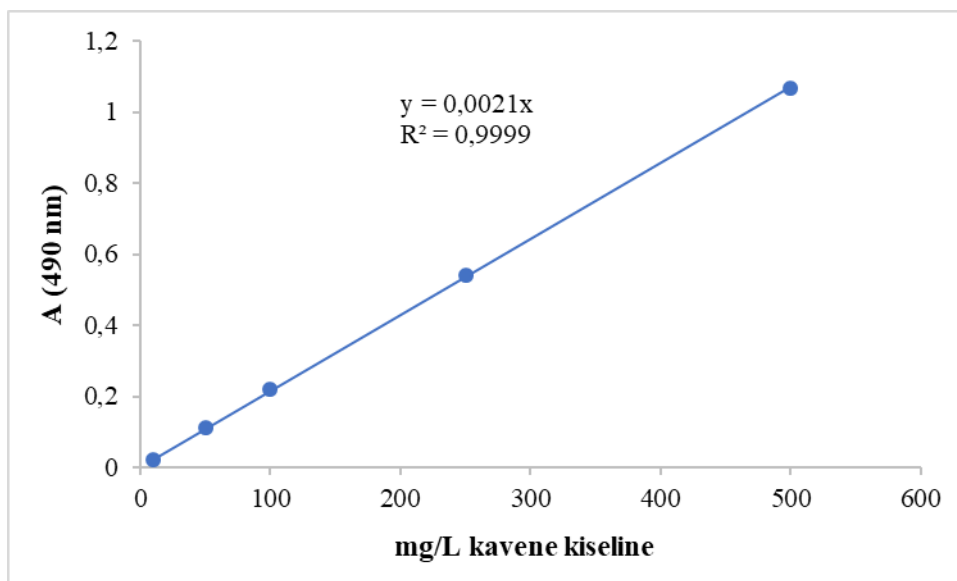
Slika 11. Baždarni pravac galne kiseline za određivanje ukupnih polifenola

Ukupni flavonoidi: Određeni su metodom s aluminijevim kloridom (Zhishen i sur., 1999) uz male promjene. Po 20 μ L uzorka dodano je u 800 μ L destilirane vode (svaki uzorak otpipetiran je u triplikatu). Reakcija je započeta dodavanjem 60 μ L natrijeva nitrita (1:20), a 5 min kasnije smjesi je dodano 60 μ L aluminijeva klorida (1:10). Nakon 6 min dodano je 400 μ L 1 M otopine natrijeva hidroksida. Otopini je na kraju dodano još 480 μ L destilirane vode da bi ukupni reakcijski volumen bio 2 mL. Gotova otopina je crveno obojena. Sve je dobro promiješano te je određena apsorbancija na 510 nm. Na isti način pripremljena je slijepa proba, ali umjesto uzorka korišten je 80%-tni metanol. Za izradu baždarnog pravca korištena je otopina katehina u koncentraciji 0-300 mg/L, a baždarni pravac prikazan je na slici 12.



Slika 12. Baždarni pravac katehina za određivanje ukupnih flavonoida

Fenolne kiseline: Određivanje fenolnih kiselina vrši se kolorimetrijskom metodom (European Pharmacopoeia, 2004). Prvo je pripremljen Arnovov reagens na način da je u 100 mL destilirane vode otopljeno 1 g NaNO_2 i 1,17 g $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$. Nakon toga u svaku kivetu otpipetirano je 300 μL destilirane vode, 300 μL metanolnog ekstrakta uzorka (za slijepu probu 300 μL 80%-tnog metanola), 100 μL 0,5 M HCl i 100 μl Arnovova reagensa. Kivete su dobro promiješane te je u svaku dodano 100 μL 1 M natrijeve lužine (NaOH) i 100 μL destilirane vode. Nakon toga je određena apsorbancija svake otopine na 490 nm u odnosu na slijepu probu. Otopina kavene kiseline (0-500 mg/L) korištena je za izradu baždarnog pravca, a baždarni pravac prikazan je na slici 13.

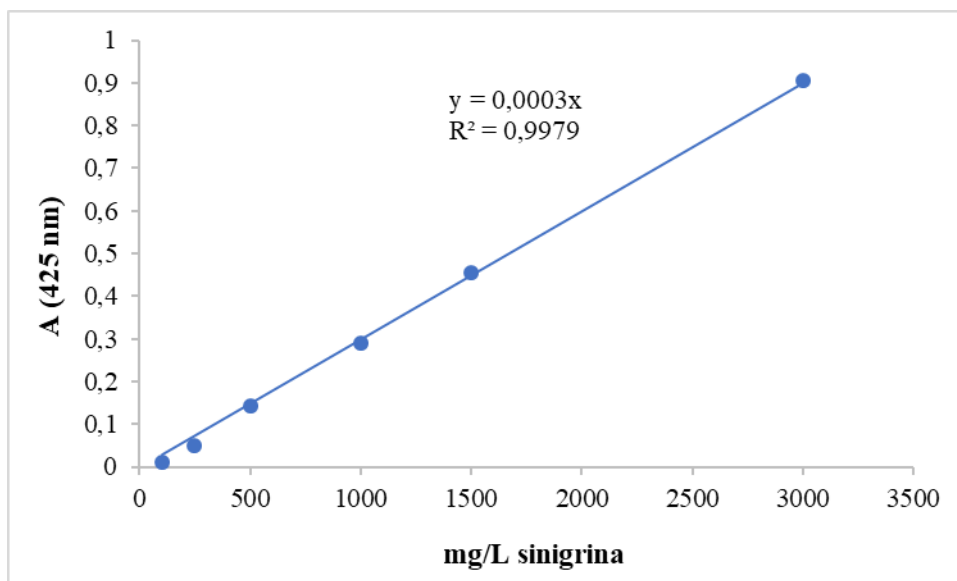


Slika 13. Baždarni pravac kavene kiseline za određivanje fenolnih kiselina

2.3.6.2. Glukozinolati

Ekstrakcija: Za određivanje ukupnih glukozinolata pripremljeni su metanolni ekstrakti uzoraka. U Eppendorf epruvetama od 2 mL u triplicatu je odvagano po 30 mg uzoraka. U svaku je epruvetu dodan 1 mL 80%-tnog metanola. Sadržaj epruveta kratko je homogeniziran na miješalici. Nakon homogenizacije, epruvete su stavljene u „termo blok“ 5 min na 95° C kako bi se inaktivirala mirozinaza koja može hidrolizirati glukozinolate, zatim na hlađenje u posudu s ledom. Nakon hlađenja uzorci su centrifugirani 5 min na 3 000 rpm. Tako pripremljeni metanolni ekstrakti čuvani su u mraku na –20 °C do korištenja.

Određivanje ukupnih glukozinolata uključuje ekstrakciju u vrućem metanolu zbog inaktivacije mirozinaze prema protokolu (Aghajanzadeh i sur., 2014). U svaku kivetu otpipetirano je 30 µL ekstrakta (za slijepu probu korišten 80%-tni metanol) te 900 µL reagensa koji se dobije otapanjem 58,8 mg Na₂PdCl₄ i 170 µL HCl u 100 mL vode. Nakon 30 min, određena je apsorbancija svake otopine na 425 nm. Za izradu baždarnog pravca korišten je sinigrin (0-3000 mg/L), a baždarni pravac prikazan je na slici 14.



Slika 14. Baždarni pravac sinigrina za određivanje ukupnih glukozinolata

2.3.7. Klorofil *a* i *b*, ukupni klorofili i ukupni karotenoidi

U Eppendorf epruvetama od 2 mL u triplicatu je odvagano po 10 mg uzoraka te je u svaku dodano po 2 mL 80%-tnog acetona. Sadržaj epruveta kratko je homogeniziran na miješalici, zatim su uzorci stavljeni u mikser visoke frekvencije 3 min na frekvenciji od 400 Hz, potom su uzorci centrifugirani te je supernatant prebačen u nove Eppendorf epruvete, a u epruvete s talogom dodano je još po 2 mL acetona i postupak je ponovljen sve dok nisu isprani svi pigmenti. Nakon toga 4 mL ekstrakta prebačeno je u kivete od kvarca koje su otporne na aceton.

Pigmenti su određeni prema protokolu (Lichtenthaler i Buschmann, 2001) koristeći formulu za preračun za ekstrakciju s 80%-tnim acetonom. Apsorbancije su mjerene na 663,2 nm, 646,8 nm i 470 nm u odnosu na slijepu probu (80%-tni aceton). Valna duljina maksimuma apsorpcije 663,2 nm specifična je za klorofil *a*, valna duljina maksimuma apsorpcije 646,8 nm specifična je za klorofil *b*, a valna duljina maksimuma apsorpcije 470 nm specifična je za karotenoide. Prema formulama su određene koncentracije klorofila *a* i *b*, ukupnog klorofila i ukupnih karotenoida:

$$c_a = 12,25A_{663,2} - 2,79 A_{646,8} [\mu g/ml]$$

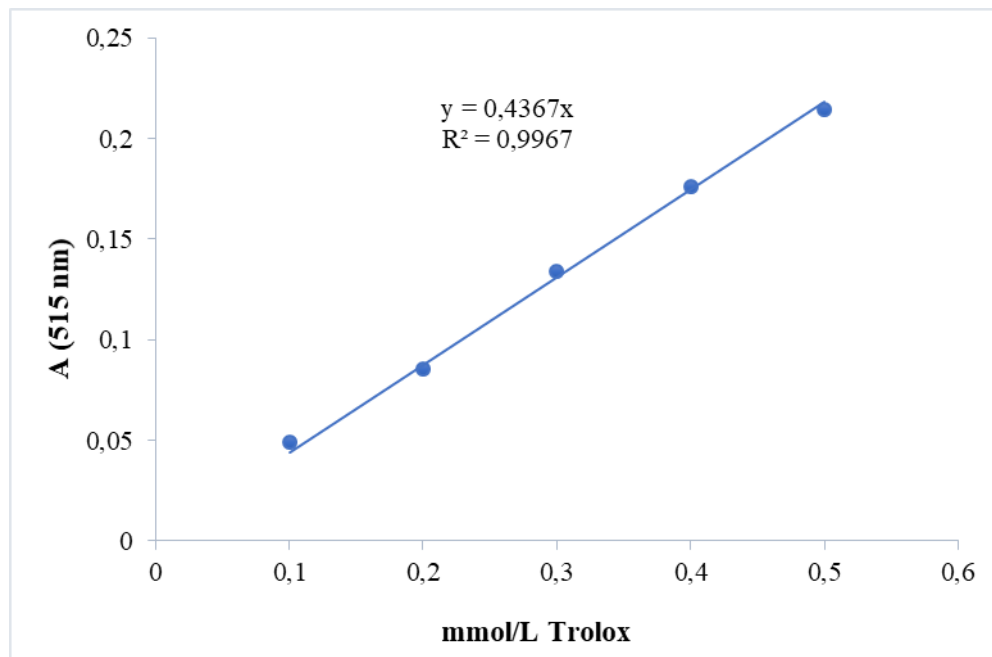
$$c_b = 21,50A_{646,8} - 5,10A_{663,2} [\mu g/ml]$$

$$(\text{ukupni klorofil}) = c_a + c_b [\mu g/ml]$$

$$(\text{ukupni karotenodi}) = (1000A_{470} - 1,82c_a - 85,02c_b)/198 [\mu g/ml]$$

2.3.8. Antioksidacijska aktivnost

Antioksidacijska aktivnost izmjerena je DPPH metodom (Brand-Williams i sur., 1995) koja se bazira na redukciji DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) radikala antioksidansom. U obliku radikala DPPH apsorbira na 515 nm, nakon redukcije dolazi do promjene boje otopine od ljubičaste do žute. Spektrofotometrijski je praćeno smanjenje apsorbancije na određenoj valnoj duljini u toku reakcije, odnosno praćena je promjena boje. Otopina DPPH pripremljena je otapanjem 1,85 mg DPPH u 50 mL spektroskopski čistog metanola. U Eppendorf epruvete od 2 mL otpipetirano je 980 μ L otopine DPPH i 20 μ L metanolnog ekstrakta uzorka. Kao slijepa proba korišten je 80%-tni metanol. Sadržaj epruveta homogeniziran je na miješalici te su epruvete ostavljene 30 min u mraku, nakon čega je izmjerena apsorbancija. Za izradu baždarnog pravca korištena je otopina Troloxa (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilne kiseline) (0-0,5 mmol/L), a baždarni pravac prikazan je na slici 15.



Slika 15. Baždarni pravac Troloxa za određivanje antioksidacijske aktivnosti

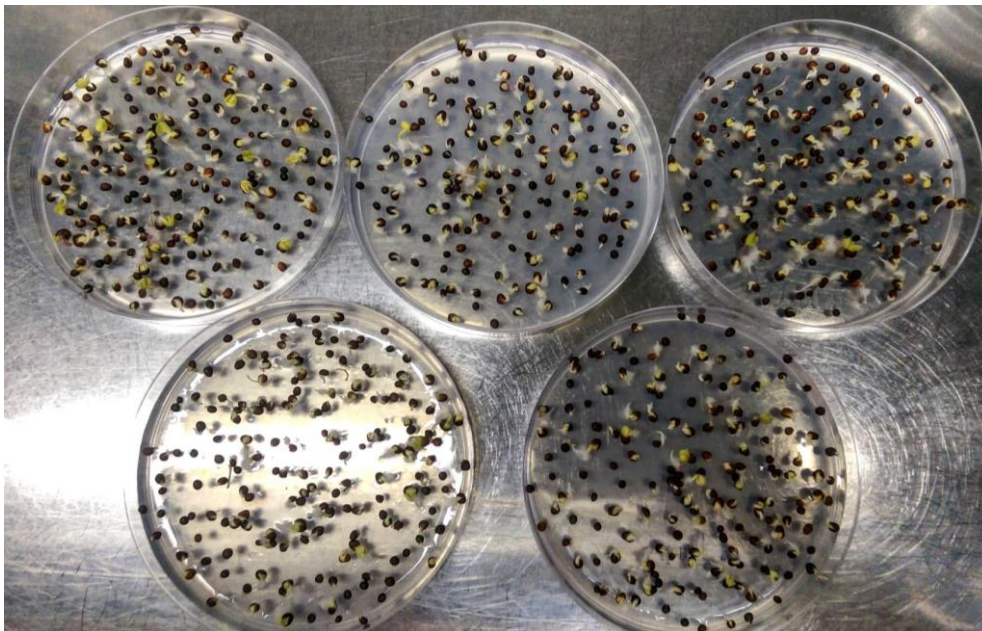
2.3.9. Statistička obrada

Mjerenja su provedena u triplikatima, tijekom 3 uzgoja (prvi uzgoj 8 °C i 21 °C; drugi i treći uzgoj -8 °C, 8 °C i 21 °C), te je ukupan broj uzoraka iznosio 24. Statistička obrada napravljena je u Microsoft Office Excel programu nadograđenom na XLStat. Usporedba uzoraka je provedena pomoću jednosmjerne analize varijance (ANOVA).

3. Rezultati

3.1. Klijavost

Slika 16. prikazuje sjemenke raštike na 1%-tnom agaru nakon 4 dana (48 h na 4 °C i 48 h na 21 °C).



Slika 16. Proklijale sjemenke raštike stare 4 dana tijekom jednog od tri uzgoja, raspoređene u 5 Petrijevih zdjelica prije prijenosa u nove Petrijeve zdjelice (fotografija S. Fistanić)

Postotak klijavosti kod klijanaca starih 4 dana na 1%-tnom agaru prikazan je u tablici 2. Iako su kod sva tri uzgoja uvjeti klijanja bili jednaki, najbolja klijavost uočena je kod prvog uzgoja, a najniža kod trećeg uzgoja, međutim razlika među njima je mala te je ukupna klijavost sjemena oko 80%.

Tablica 2. Postotak (%) klijavosti sjemena raštike kod sva 3 uzgoja

Uzgoj	Klijavost / %
I.	84
II.	77
III.	76

3.2. Duljina korijena i masa klijanaca raštike

Na slici 17. prikazani su klijanci raštike nakon stresa niskom temperaturom, klijanci izloženi temperaturi pothlađivanja (8 °C) imali su kraće korijenje s obzirom na klijance 21 °C (kontrola).



Slika 17. Klijanci raštike nakon stresa niskom temperaturom, u gornjem redu kontrola pri 21 °C a u donjem redu klijanci raštike izloženi temperaturi pothlađivanja (8 °C) (fotografija S. Fistanić)

Vidljiva je razlika u duljini korijena na što upućuju i brojčane vrijednosti prikazane u tablici 3. Srednja vrijednost duljine korijena klijanaca uzgajanih na 21 °C kretala se oko 6 cm dok je kod onih izloženih temperaturi pothlađivanja od 8 °C bila oko 4 cm, točnije $3,98 \pm 1,54$, $4,33 \pm 0,93$ i $4,26 \pm 0,87$ cm u tri uzgoja. Kod klijanaca u drugom i trećem uzgoju koji su bili dodatno izloženi i temperaturama smrzavanja od -8 °C srednja vrijednost duljine korijena je još niža te iznosi $3,36 \pm 0,78$ te $3,25 \pm 0,90$ cm.

Tablica 3. Srednja, minimalna i maksimalna vrijednost duljine korijena klijanaca raštike izloženih niskim temperaturama kroz tri uzgoja

Uzgoj	temperatura izlaganja T(°C)	srednja vrijednost duljine korijena (cm)	minimalna duljina korijena (cm)	maksimalna duljina korijena (cm)
I.	8	3,98 ± 1,54 ^{ab}	0,50	6,60
	21	5,76 ± 1,56 ^c	1,00	8,10
II.	-8	3,36 ± 0,78 ^a	0,50	4,60
	8	4,33 ± 0,93 ^b	3,00	6,50
	21	6,06 ± 0,89 ^c	4,10	8,50
III.	-8	3,25 ± 0,90 ^a	0,90	4,30
	8	4,26 ± 0,87 ^b	3,10	5,90
	21	5,80 ± 0,74 ^c	3,90	6,90

Prikazana je srednja vrijednost tri replike i standardna devijacija. Brojevi unutar stupca označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ($p < 0,05$). Različita slova označavaju značajne razlike među uzorcima.

Kraće vrijednosti duljine korijena prati i manja masa klijanaca izloženih stresu niskim temperaturama što je prikazano u tablici 4. Srednja vrijednost mase pojedinog klijanca kod kontrole (21 °C) iznosi redom po uzgojima $31,92 \pm 4,88$, $25,63 \pm 3,53$ i $24,61 \pm 8,67$ mg, dok kod biljaka izloženih temperaturi pothlađivanja (8 °C) iznosi $25,62 \pm 3,23$, $24,18 \pm 2,77$ i $22,79 \pm 6,83$ mg te su niže nego kod kontrole. Dodatna izloženost temperaturi smrzavanja (-8 °C) je uzrokovala smanjenje u masi klijanaca te su one u oba slučaja bile ispod 20 mg.

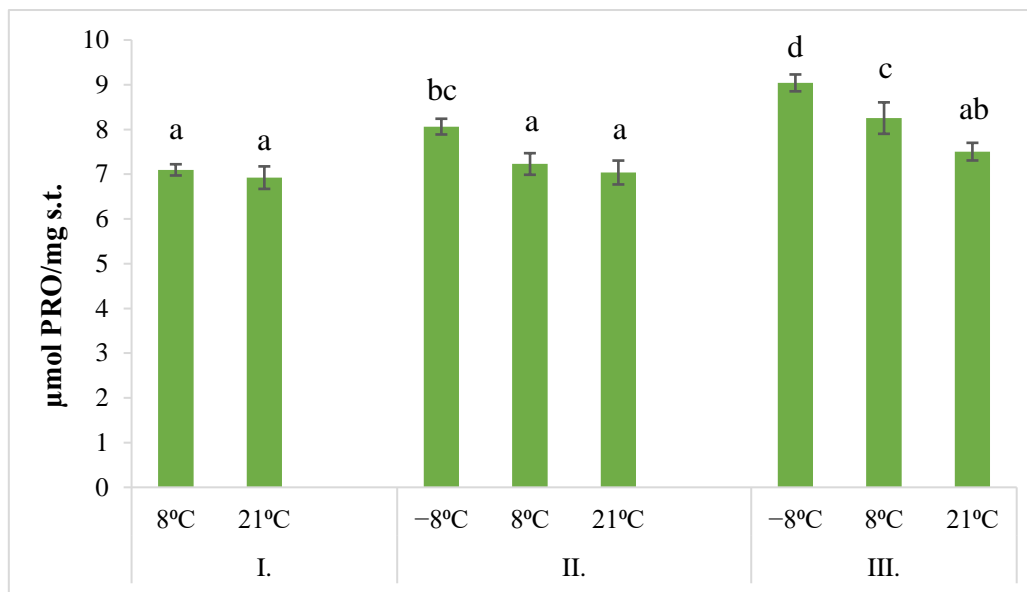
Tablica 4. Srednja, minimalna i maksimalna vrijednost mase klijanaca raštike izloženih niskim temperaturama kroz tri uzgoja

Uzgoj	temperatura izlaganja T(°C)	srednja vrijednost mase (mg)	minimalna vrijednost mase (mg)	maksimalna vrijednost mase (mg)
I.	8	25,62 ± 3,23 ^{abc}	21,9	30,6
	21	31,92 ± 4,88 ^c	26,8	39,6
II.	-8	18,61 ± 4,74 ^a	11,5	27
	8	24,18 ± 2,77 ^{abc}	20,3	28,5
	21	25,63 ± 3,53 ^{bc}	17	31
III.	-8	19,01 ± 5,10 ^a	11,5	27
	8	22,79 ± 6,83 ^{ab}	13,3	34,4
	21	24,61 ± 8,67 ^{abc}	13,9	42,2

Prikazana je srednja vrijednost tri replike i standardna devijacija. Brojevi unutar stupca označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ($p < 0,05$).

3.3. Prolin

Konačni sadržaj prolina izražen je u μmol prolina (PRO) po mg suhog tkiva te je prikazan na slici 18. Sadržaj prolina u uzorcima kretao se od $6,92 \pm 0,25 \mu\text{mol/mg}$ s.t. (I. uzgoj, 21 °C) do $9,04 \pm 0,19 \mu\text{mol/mg}$ s.t. (III. Uzgoj, -8 °C) te je primijećen trend porasta količine prolina sa sniženjem temperature. Izlaganje biljaka temperaturi pothlađivanja (8 °C) povećava razinu prolina, no ta vrijednost nije značajna dok je kod temperature smrzavanja porast razine prolina bitno viši u drugom i trećem uzgoju.

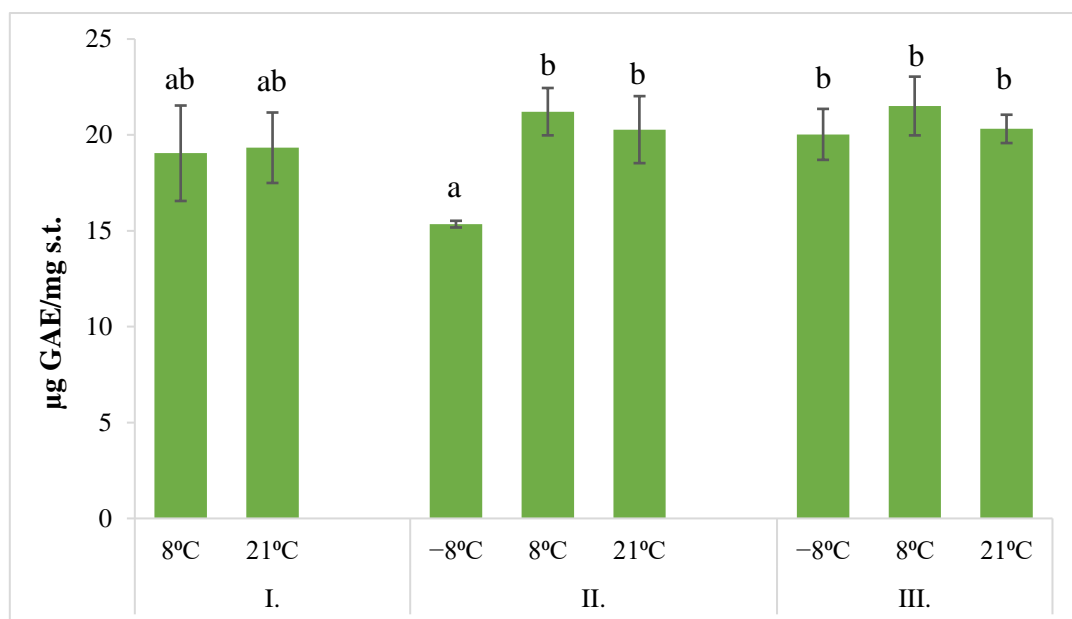


Slika 18. Sadržaj prolina (PRO) u klijancima raštike nakon izlaganja temperaturi od 21 °C (kontrola), temperaturi pothlađivanja (8 °C) i temperaturi smrzavanja (–8 °C) tijekom tri uzgoja. Stupci prikazuju srednju vrijednost tri replike, a na stupcima je označena standardna devijacija. Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ($p < 0,05$).

3.4. Polifenolni spojevi

3.4.1. Ukupni polifenoli

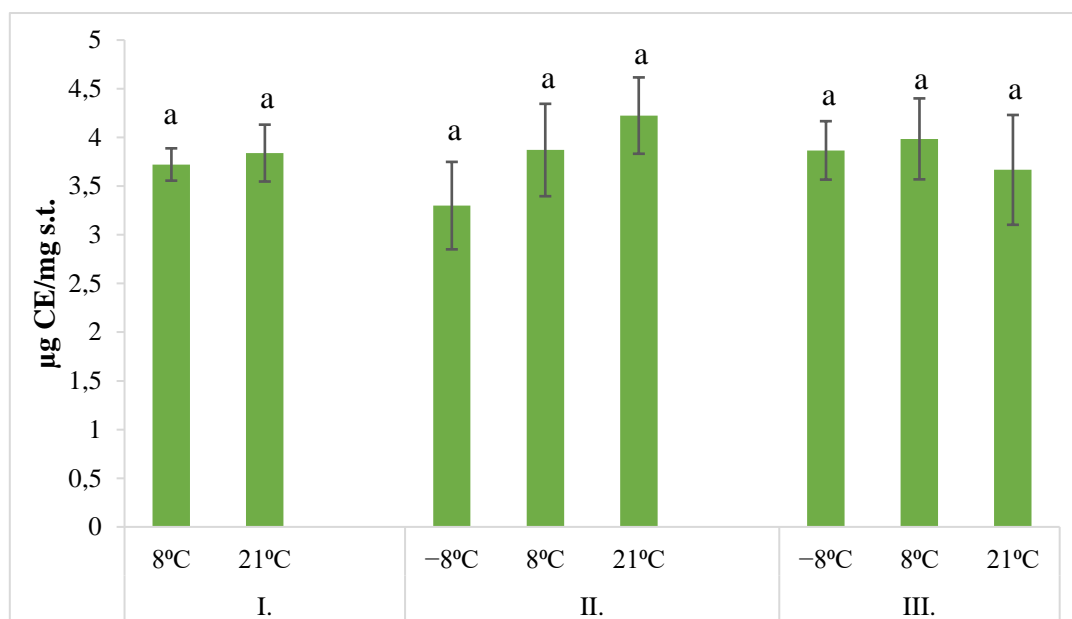
Sadržaj ukupnih polifenola izražen je u μg ekvivalenta galne kiseline (GAE) po mg suhog tkiva te je prikazan na slici 19. Sadržaj ukupnih polifenola u uzorcima kretao se od $15,35 \pm 0,17 \mu\text{g GAE/mg s.t.}$ (II. Uzgoj, $-8 \text{ }^\circ\text{C}$) do $21,51 \pm 1,53 \mu\text{g GAE/mg s.t.}$ (III. uzgoj, $8 \text{ }^\circ\text{C}$). Sadržaj ukupnih polifenola nije se razlikovao u uzorcima uzgojenim u različito vrijeme no pokazivao je značajno nižu vrijednost kod biljaka izloženih temperaturi smrzavanja od $-8 \text{ }^\circ\text{C}$ u drugom uzgoju gdje je vrijeme izlaganja toj temperaturi bilo 24 h. Nasuprot tome, kad je vrijeme izlaganja temperaturi smrzavanja bilo samo 4 h kao u trećem uzgoju, razlike u sadržaju ukupnih polifenola nema.



Slika 19. Sadržaj ukupnih polifenola u klijancima raštike nakon izlaganja temperaturi od 21 °C (kontrola), temperaturi pothlađivanja (8 °C) i temperaturi smrzavanja (−8 °C) tijekom tri uzgoja. Stupci prikazuju srednju vrijednost tri replike, a na stupcima je označena standardna devijacija. Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ($p < 0,05$).

3.4.2. Ukupni flavonoidi

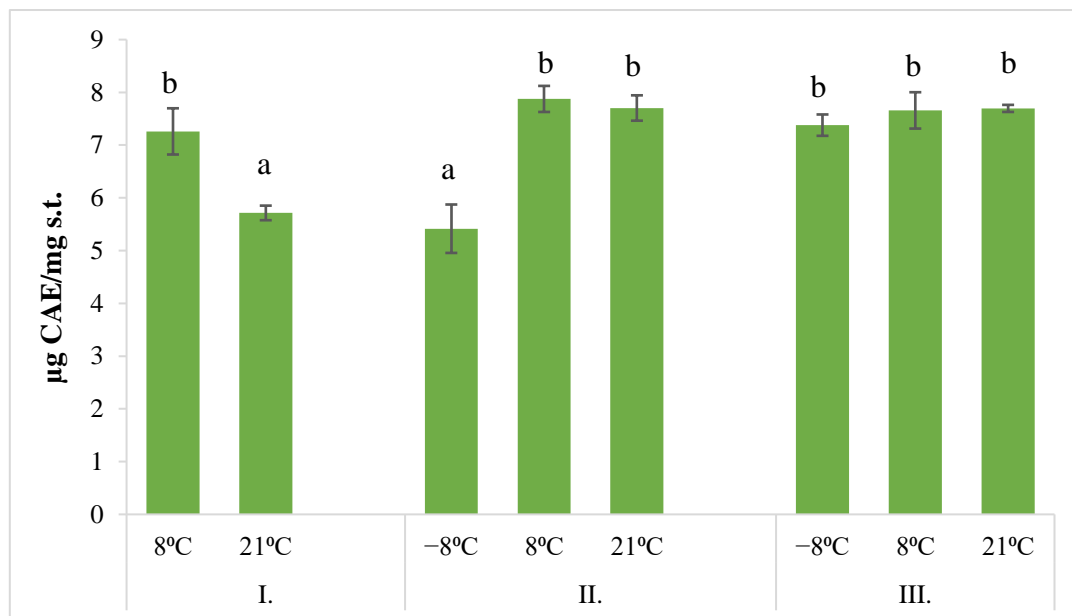
Sadržaj ukupnih flavonoida izražen je u μg ekvivalenta katehina (CE) po mg suhog tkiva te je prikazan na slici 20. Sadržaj ukupnih flavonoida u uzorcima se kretao od $3,3 \pm 0,45 \mu\text{g CE/mg s.t.}$ (II. uzgoj, $-8 \text{ }^\circ\text{C}$) do $4,22 \pm 0,39 \mu\text{g CE/mg s.t.}$ (II. uzgoj, $21 \text{ }^\circ\text{C}$). Nisu primijećene značajne razlike u sadržaju flavonoida s obzirom na vrijeme uzgoja te je tek lagani pad u sadržaju flavonoida primijećen kod drugog uzgoja i temperature smrzavanja, no taj pad nije statistički značajan. Sličan je trend uočen za ukupne polifenole.



Slika 20. Sadržaj ukupnih flavonoida u klijancima raštike nakon izlaganja temperaturi od 21 °C (kontrola), temperaturi pothlađivanja (8 °C) i temperaturi smrzavanja (−8 °C) tijekom tri uzgoja. Stupci prikazuju srednju vrijednost tri replike, a na stupcima je označena standardna devijacija. Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ($p < 0,05$).

3.4.3. Fenolne kiseline

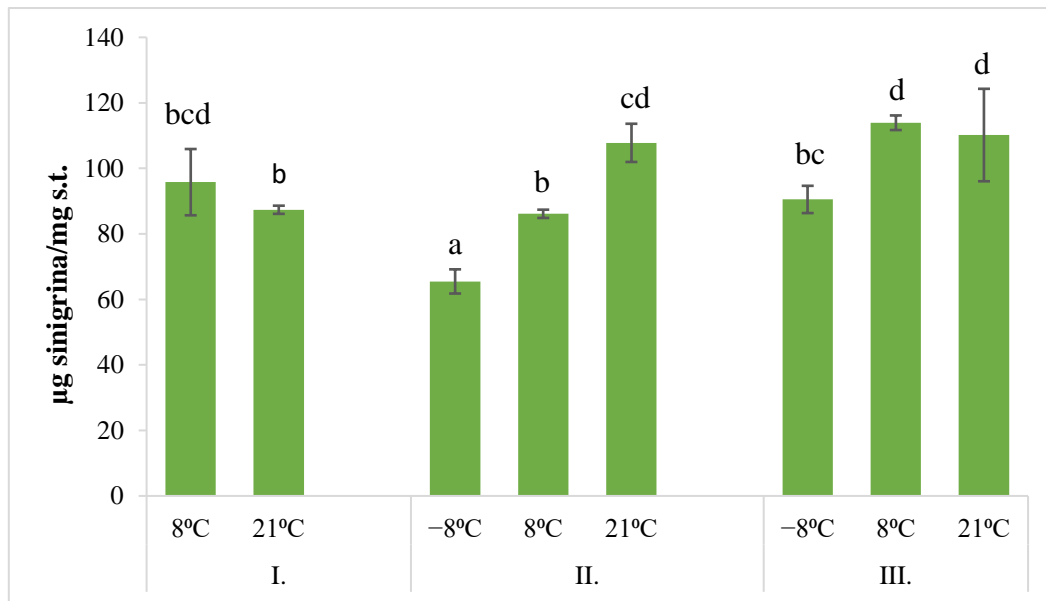
Sadržaj ukupnih fenolnih kiselina izražen je u µg ekvivalenta kavene kiseline (CAE) po mg suhog tkiva te je prikazan na slici 21. Sadržaj ukupnih fenolnih kiselina kretao se od $5,42 \pm 0,46$ µg CAE/mg s.t. (II. uzgoj, −8 °C) do $7,88 \pm 0,25$ µg CAE/mg s.t (II. uzgoj, 8 °C). Kod drugog i trećeg uzgoja nisu primijećene razlike u sadržaju fenolnih kiselina kod kontrole i biljaka izloženih temperaturi pothlađivanja, dok je kod prvog uzgoja trend drugačiji te je u uzorcima izloženim temperaturi pothlađivanja uočen trend porasta sadržaja fenolnih kiselina u usporedbi s kontrolom. Slično kao i za ukupne polifenole i flavonoide u drugom uzgoju, izlaganje biljaka temperaturi smrzavanja uzrokuje pad u sadržaju fenolnih kiselina.



Slika 21. Sadržaj ukupnih fenolnih kiselina u klijancima raštike nakon izlaganja temperaturi od 21 °C (kontrola), temperaturi pothlađivanja (8 °C) i temperaturi smrzavanja (–8 °C) tijekom tri uzgoja. Stupci prikazuju srednju vrijednost tri replike, a na stupcima je označena standardna devijacija. Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ($p < 0,05$).

3.5. Glukozinolati

Sadržaj ukupnih glukozinolata izražen je u μg ekvivalenta sinigrina po mg suhog tkiva te je prikazan na slici 22. Sadržaj glukozinolata u uzorcima se kretao od $65,48 \pm 3,7 \mu\text{g}$ sinigrina/mg s.t. (II. uzgoj, $-8 \text{ }^\circ\text{C}$) do $113,93 \pm 2,23 \mu\text{g}$ sinigrina/mg s.t. (III. uzgoj, $8 \text{ }^\circ\text{C}$). Kod prvog uzgoja nisu primijećene razlike u sadržaju glukozinolata kod kontrole i biljaka izloženih temperaturi pothlađivanja, dok je kod drugog uzgoja primijećen pad u sadržaju glukozinolata u ovisnosti o temperaturi (što je temperatura niža i sadržaj ukupnih glukozinolata je niži). Kod trećeg uzgoja niži sadržaj glukozinolata primijećen je kod biljaka izloženih temperaturi smrzavanja.

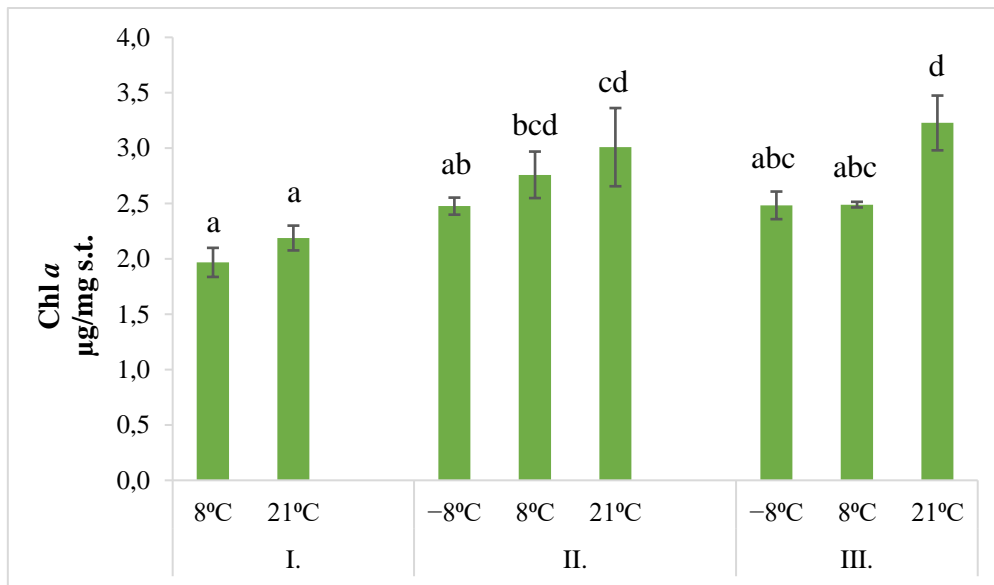


Slika 22. Sadržaj ukupnih glukozinolata u klijancima raštike nakon izlaganja temperaturi od 21 °C (kontrola), temperaturi pothlađivanja (8 °C) i temperaturi smrzavanja (-8 °C) tijekom tri uzgoja. Stupci prikazuju srednju vrijednost tri replike, a na stupcima je označena standardna devijacija. Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ($p < 0,05$).

3.6. Fotosintetski pigmenti: klorofil *a* i *b*, ukupni klorofil i ukupni karotenoidi

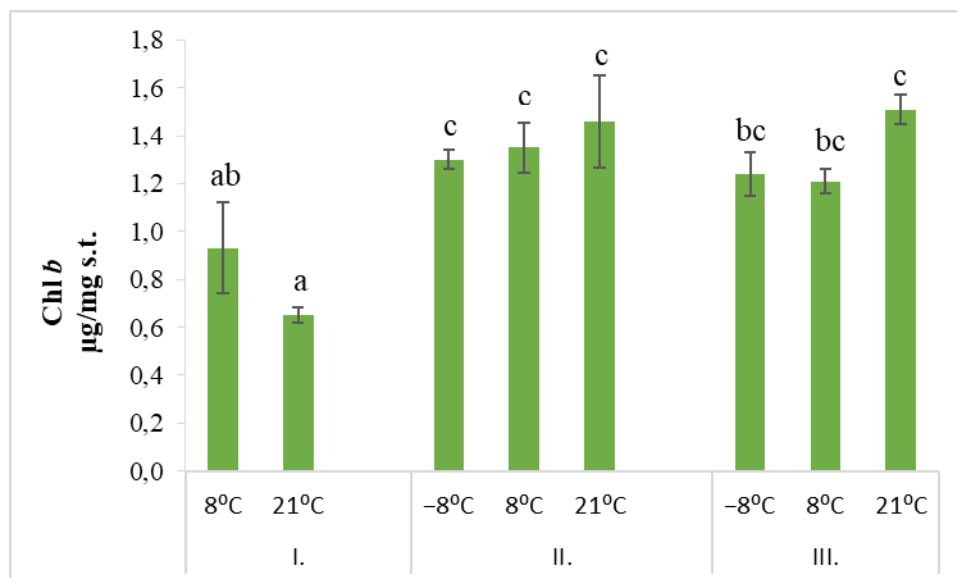
Sadržaj klorofila *a* prikazan je na slici 23, klorofila *b* na slici 24, ukupnog klorofila na slici 25, ukupnih karotenoida na slici 26.

Sadržaj klorofila *a* (Slika 23.) kretao se od $1,97 \pm 0,13$ µg/mg s.t. (I. uzgoj, 8 °C) do $3,23 \pm 0,25$ µg/mg s.t. (III. uzgoj, 21 °C). Evidentan je trend da izlaganje biljaka niskim temperaturama smanjuje sadržaj klorofila *a*.



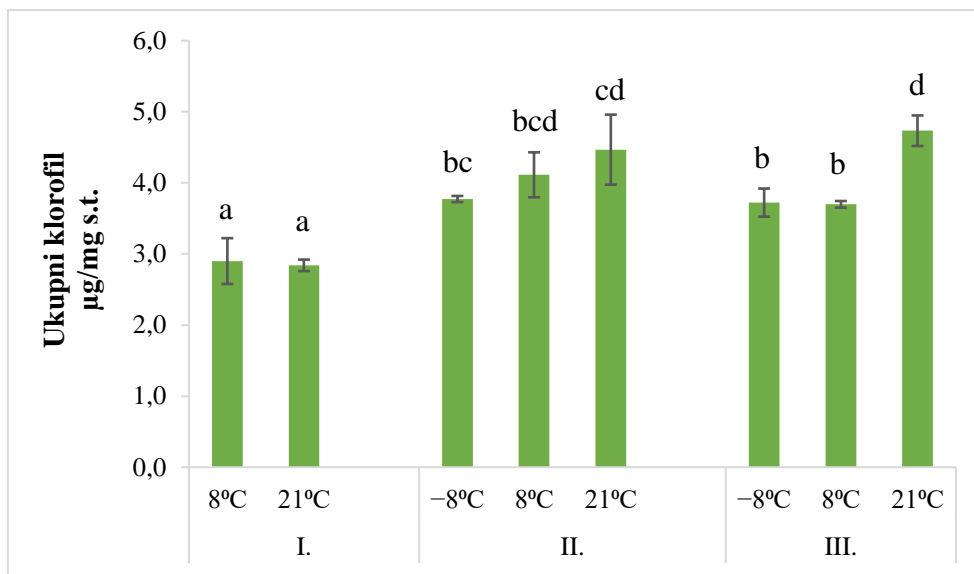
Slika 23. Sadržaj klorofila *a* u klijancima raštike nakon izlaganja temperaturi od 21 °C (kontrola), temperaturi pothlađivanja (8 °C) i temperaturi smrzavanja (–8 °C) tijekom tri uzgoja. Stupci prikazuju srednju vrijednost tri replike, a na stupcima je označena standardna devijacija. Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ($p < 0,05$).

Sadržaj klorofila *b* (Slika 24.) kretao se od $0,65 \pm 0,03$ µg/mg s.t. (I. uzgoj, 21 °C) do $1,51 \pm 0,06$ µg/mg s.t. (III. uzgoj, 21 °C). Slično kao i kod klorofila *a*, niske temperature izazivaju pad u količini klorofila *b* u drugom i trećem uzgoju.



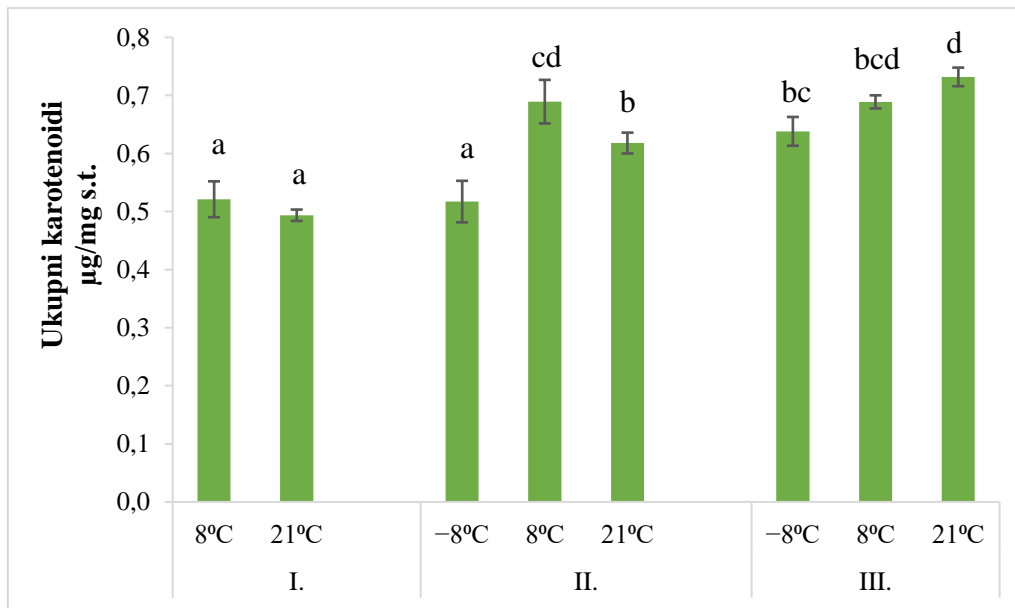
Slika 24. Sadržaj klorofila *b* u klijancima raštike nakon izlaganja temperaturi od 21 °C (kontrola), temperaturi pothlađivanja (8 °C) i temperaturi smrzavanja (–8 °C) tijekom tri uzgoja. Stupci prikazuju srednju vrijednost tri replike, a na stupcima je označena standardna devijacija. Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ($p < 0,05$).

Sadržaj ukupnog klorofila (Slika 25.) kretao se od $2,84 \pm 0,08 \mu\text{g}/\text{mg s.t.}$ (I. uzgoj, 21 °C) do $4,73 \pm 0,21 \mu\text{g}/\text{mg s.t.}$ (III. uzgoj, 21 °C). Trend u sadržaju ukupnog klorofila prati trend primijećen za sadržaj klorofila *a* i *b*, odnosno smanjenje njegove vrijednosti uslijed izlaganja niskim temperaturama.



Slika 25. Sadržaj ukupnog klorofila u klijancima raštike nakon izlaganja temperaturi od 21 °C (kontrola), temperaturi pothlađivanja (8 °C) i temperaturi smrzavanja (–8 °C) tijekom tri uzgoja. Stupci prikazuju srednju vrijednost tri replike, a na stupcima je označena standardna devijacija. Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ($p < 0,05$).

Sadržaj ukupnih karotenoida (Slika 26.) kretao se od $0,49 \pm 0,01 \mu\text{g}/\text{mg s.t.}$ (I. uzgoj, 21 °C) do $0,73 \pm 0,02 \mu\text{g}/\text{mg s.t.}$ (III. uzgoj, 21 °C). Kod prvog i drugog uzgoja sadržaj tih pigmenata nije se razlikovao kod kontrole i biljaka izloženih temperaturi pothlađivanja, dok je kod drugog uzgoja temperatura smrzavanja uzrokovala pad u sadržaju karotenoida u odnosu na odgovarajuću kontrolu. Kod trećeg uzgoja sadržaj karotenoida se snižavao sa snižavanjem temperature.



Slika 26. Sadržaj ukupnih karotenoida u klijancima raštike nakon izlaganja temperaturi od 21 °C (kontrola), temperaturi pothlađivanja (8 °C) i temperaturi smrzavanja (-8 °C) tijekom tri uzgoja. Stupci prikazuju srednju vrijednost tri replike, a na stupcima je označena standardna devijacija. Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ($p < 0,05$).

Osim sadržaja klorofila *a* i *b*, ukupnog klorofila i ukupnih karotenoida izračunat je i omjer klorofila *a* i *b* te omjer ukupnog klorofila i ukupnih karotenoida (Tablica 5.).

Tablica 5. Omjer klorofila *a* i klorofila *b* te ukupnog klorofila i karotenoida u klijancima raštike tijekom 3 uzgoja pri izlaganju niskim temperaturama: pothlađivanja (8 °C) i smrzavanja (−8 °C) u odnosu na kontrolu (21 °C)

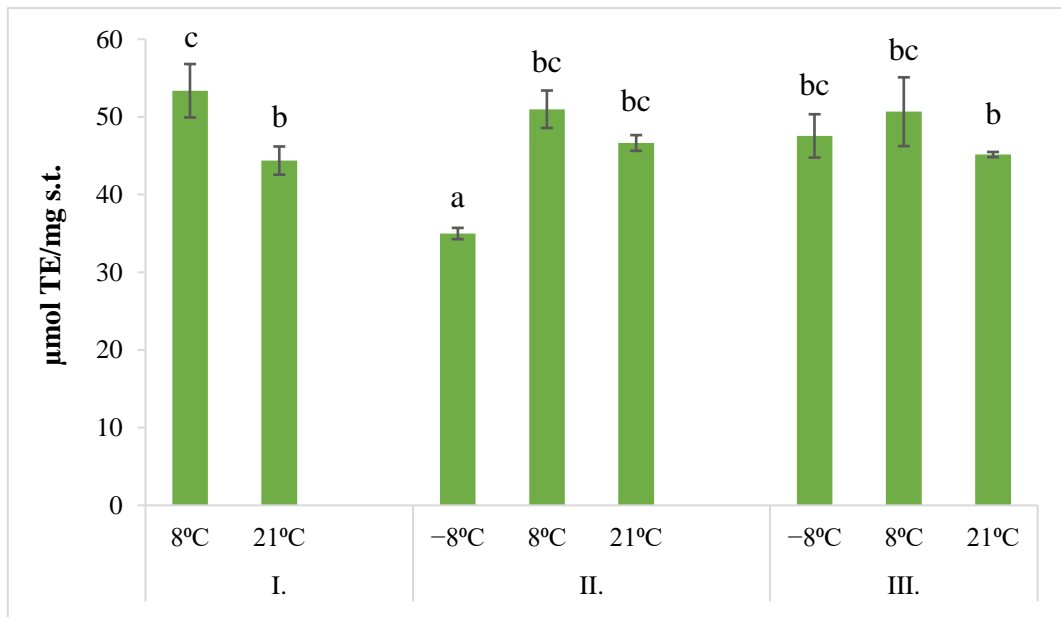
Uzgoj	temperatura izlaganja T(°C)	klorofil <i>a</i> / klorofil <i>b</i>	ukupni klorofil/ ukupni karotenoidi
I.	8	2,15 ± 0,29 ^a	5,60 ± 0,96 ^a
	21	3,37 ± 0,34 ^b	5,75 ± 0,10 ^a
II.	−8	1,91 ± 0,11 ^a	7,31 ± 0,45 ^c
	8	2,04 ± 0,01 ^a	5,96 ± 0,20 ^{ab}
	21	2,07 ± 0,22 ^a	7,22 ± 0,68 ^{bc}
III.	−8	2,00 ± 0,10 ^a	5,83 ± 0,24 ^a
	8	2,06 ± 0,09 ^a	5,37 ± 0,15 ^a
	21	2,15 ± 0,23 ^a	6,47 ± 0,21 ^{abc}

Prikazana je srednja vrijednost tri replike i standardna devijacija. Brojevi unutar stupca označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ($p < 0,05$).

Omjer klorofila *a* i klorofila *b* kretao se od $1,91 \pm 0,11$ (II. uzgoj, −8 °C) do $3,37 \pm 0,34$ (I. uzgoj, 21 °C), dok se omjer ukupnog klorofila i ukupnih karotenoida kretao od $5,37 \pm 0,15$ (III. uzgoj, 8 °C) do $7,31 \pm 0,45$ (II. uzgoj, −8 °C). Tijekom sva 3 uzgoja primijećen je trend porasta omjera između klorofila *a* i *b* s porastom temperature. Nasuprot tome, omjer između ukupnog klorofila i ukupnih karotenoida najmanji je kod sva tri uzgoja pri temperaturi pothlađivanja (8 °C), a najveći pri temperaturi od 21 °C (kontrola).

3.7. Antioksidacijska aktivnost

Antioksidacijska aktivnost izražena je u μmol ekvivalenta Troloxa (TE) po mg suhog tkiva, rezultati su prikazani na slici 27. Antioksidacijska aktivnost kod prvog i trećeg uzgoja nije se značajno razlikovala u uzorcima, osim kod kontrole (21 °C) gdje je bila manja. Kod drugog uzgoja antioksidacijska aktivnost pri temperaturi smrzavanja od −8 °C bila je znatno manja nego kod trećeg uzgoja pri istoj temperaturi te je iznosila $34,99 \pm 0,73 \mu\text{mol TE/mg s.t.}$



Slika 27. Antioksidacijska aktivnost u klijancima raštike nakon izlaganja temperaturi od 21 °C (kontrola), temperaturi pothlađivanja (8 °C) i temperaturi smrzavanja (−8 °C) tijekom tri uzgoja. Stupci prikazuju srednju vrijednost tri replike, a na stupcima je označena standardna devijacija. Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ($p < 0,05$).

4. Rasprava

4.1. Klijavost, duljina korijena i masa klijanaca

Klijavost je izražena kao postotak (%) proklijalih biljaka nakon 4 dana (48 h na 4 °C i 48 h na svjetlu na 21 °C). Naklijavanje sjemena radilo se pod sterilnim uvjetima u laminaru te je kod sva tri uzgoja bilo jednako, jedina razlika je bila u broju steriliziranih sjemenki. Kod prvog uzgoja uočena je najbolja klijavost, dok je kod trećeg bila najniža. Razlika u postotku (%) klijavosti između tri uzgoja je mala te je ukupna klijavost sjemena oko 80% što se može smatrati dobrom klijavošću te da je sjeme sakupljeno u optimalnoj zrelosti i dobro skladišteno.

Nakon uzgoja i stresa niskim temperaturama, na klijanacima raštike izloženim temperaturi pothlađivanja (8 °C) i temperaturi smrzavanja (-8 °C) u odnosu na kontrolu (21 °C) izmjerena je duljina korijena i masa svakog pojedinog klijanca. Prema literaturnim podacima, stres niskim temperaturama usporava mnoge biokemijske procese u biljkama te izaziva zastoje u rastu (Hatfield i Prueger, 2015) što je evidentno i iz naših rezultata (Tablica 3. i Tablica 4.). Izlaganje niskim temperaturama uzrokovalo je smanjenje duljine korijena te nižu masu klijanaca, odnosno niska temperatura uzrokovala je smanjenje prinosa. Slične rezultate zabilježili su Rodríguez i sur. (2015) koji su primijetili da *Brassica oleracea* var. *acephala* koja raste na temperaturi pothlađivanja (12 °C) ima čak 50% nižu masu u usporedbi s kontrolom.

4.2. Prolin

Prema literaturnim podacima poznato je da se uslijed stresa u biljkama nakuplja više prolina (Fuller i sur., 2006) te se prolina smatra i markerom stresa, odnosno u stresnim uvjetima njegov sadržaj u biljkama se povećava. Njegovim nakupljanjem tijekom stresa biljka postaje otpornija na stres (Hayat i sur., 2012). To je potvrđeno i našim rezultatima gdje je primijećen trend porasta količine prolina kod biljaka izloženih stresu, odnosno niskoj temperaturi. Značajan je bio porast razine prolina kod klijanaca izloženih temperaturi smrzavanja i kod drugog i kod trećeg uzgoja. Naši su rezultati u skladu s rezultatima Atici i sur. (2003) koji su mjerili razinu prolina u *Brassica oleracea* var. *acephala* i primijetili da uslijed izlaganja niskim temperaturama dolazi do povećanja razine prolina. Ti su autori primijetili da što je period izlaganja niskim temperaturama bio duži i razina prolina bila je viša. Često se smatra

da su biljke koje akumuliraju više prolina otpornije na stresne uvjete, a raštika u usporedbi s bijelim i kineskim kupusom ima višu razinu endogenog prolina (Pavlović i sur., 2018). Neka istraživanja pokazuju i da transgenične biljke koje akumuliraju više prolina imaju višu toleranciju na stres niskim temperaturama (Ashraf i Foolad, 2007).

4.3. Specijalizirani metaboliti

4.3.1. Polifenolni spojevi

Sadržaj ukupnih polifenola se u uzorcima kretao od $15,35 \pm 0,17$ $\mu\text{g GAE/mg s.t.}$ (II. uzgoj, -8 °C) do $21,51 \pm 1,53$ $\mu\text{g GAE/mg s.t.}$ (III. uzgoj, 8 °C) te su te vrijednosti usporedive s vrijednostima za klijance raštike koje su objavljene u radu Šamec i sur., (2018a). Sadržaj ukupnih polifenola nije se razlikovao u uzorcima uzgojenim u različito vrijeme no pokazivao je značajno nižu vrijednost kod biljaka izloženih temperaturi smrzavanja od -8 °C u drugom uzgoju gdje je vrijeme izlaganja toj temperaturi bilo 24 h. Nasuprot tome, kad je vrijeme izlaganja temperaturi smrzavanja bilo samo 4 h kao u trećem uzgoju, razlike u sadržaju ukupnih polifenola nije bilo. To upućuje na činjenicu da do smanjenja razine ukupnih polifenola dolazi kada je izlaganje temperaturi smrzavanja dulje. Kod drugog i trećeg uzgoja došlo je do blagog porasta razine ukupnih polifenola kod biljaka izloženih temperaturi pothlađivanja, no taj porast nije bio statistički značajan. Soengas i sur., (2018) su također kod vrste *Brassica oleracea* var. *acephala* primijetili da uslijed izlaganja temperaturama pothlađivanja (u njihovom slučaju 12 °C) dolazi do povišenja razine ukupnih polifenola. No, u njihovom je radu izlaganje nižim temperaturama dulje pa je i ta razlika veća. Međutim, točni mehanizmi djelovanja polifenola u stresnim uvjetima su nepoznati.

Za ukupne flavonoide nisu primijećene statistički značajne razlike s obzirom na različite uzgoje i stres niskim temperaturama. Općenito, za flavonoide je utvrđeno da njihov sadržaj može biti pod utjecajem okolišnih čimbenika, a literaturni podatci pokazuju da su niske temperature povezane s višim sadržajem flavonoida (Klimov i sur., 2008), što u ovom radu nije zabilježeno. U radu Schmidt i sur., (2010) gdje je cilj istraživanja bio utvrditi sadržaj flavonoida kod vrste *Brassica oleracea* var. *sabellica* pod utjecajem genotipskih i klimatskih čimbenika (temperatura), s nižom temperaturom sadržaj flavonoida bio je viši, no vrijeme izlaganja niskoj temperaturi bilo je dulje nego u našem radu.

Treća skupina polifenolnih komponenata koju smo određivali bile su ukupne fenolne kiseline. Kod drugog i trećeg uzgoja nema značajnijih razlika u sadržaju fenolnih kiselina kod kontrole

i biljaka izloženih temperaturi pothlađivanja, dok je kod prvog uzgoja, iznenađujuće, s nižom temperaturom viši sadržaj fenolnih kiselina. U drugom uzgoju izlaganje biljaka temperaturi smrzavanja uzrokovalo je pad u sadržaju fenolnih kiselina, slično kao što je primijećeno i za ukupne polifenole. No, u trećem uzgoju taj trend nije zabilježen, vjerojatno zbog kraćeg izlaganja biljaka stresu. Prethodno je također ispitivan utjecaj niskih temperatura na sadržaj fenolnih kiselina. U radu Soengas i sur., (2018) ispitivan je utjecaj temperaturnog stresa na antioksidacijsku obranu kod *Brassica oleracea* var. *acephala* i var. *capitata* i u tom istraživanju sadržaj fenolnih kiselina povećao se s hladnim tretmanom te je zaključeno da biljke akumuliraju fenolne spojeve kao odgovor na temperaturni stres pothlađivanjem. U njihovom eksperimentu viši sadržaj fenolnih kiselina zabilježen je pri temperaturi od 12 °C u odnosu na kontrolu od 20 °C, no period izlaganja bio je dulji nego kod našeg eksperimenta.

4.3.2. Glukozinolati

Sadržaj glukozinolata pokazuje značajne razlike s obzirom na uzgoj. Kod prvog uzgoja nisu primijećene razlike u sadržaju glukozinolata kod kontrole i biljaka izloženih temperaturi pothlađivanja. Kod drugog je uzgoja primijećen pad u sadržaju glukozinolata u ovisnosti o temperaturi, odnosno što je temperatura niža i sadržaj ukupnih glukozinolata je niži. Kod trećeg uzgoja niži sadržaj glukozinolata primijećen je kod biljaka izloženih temperaturi smrzavanja. Iako su tri uzgoja pokazala različite trendove te je teško nedvosmisleno zaključiti uzrokuje li izlaganje biljaka temperaturama pothlađivanja promjene u sadržaju glukozinolata, kod temperatura smrzavanja taj trend je jasan te dolazi do pada razine glukozinolata. Uloga glukozinolata u obrani od temperaturnog stresa još uvijek nije do kraja istražena i često različiti autori dobivaju različite rezultate, jer na glukozinolate mogu utjecati i mnogi drugi faktori kao što su doba dana, svjetlost i sl., ali i mnogi, još uvijek nepoznati faktori (Martínez-Ballesta i sur., 2013).

4.3.3. Fotosintetski pigmenti: klorofil *a* i *b*, ukupni klorofili i ukupni karotenoidi

Osim što limitira rast i razvoj biljaka, temperaturni stres može utjecati i na proces fotosinteze (Rodríguez i sur., 2015). Stoga smo u ovom radu određivali i sadržaj fotosintetskih pigmenata, klorofila *a*, *b*, ukupnih klorofila te karotenoida. Generalno, sa sniženjem temperature uočen je pad razine klorofila *a* kod sva tri uzgoja. Taj pad nije statistički značajan kod temperature pothlađivanja dok kod temperature smrzavanja sadržaj klorofila *a* se

značajno smanjio. Slijedom toga, i sadržaj ukupnih klorofila prati isti trend. Sličan trend smanjenja klorofila uslijed izlaganja temperaturi pothlađivanja kod *Brassica oleracea* var. *acephala* primijećen je i u radu Soengas i sur., (2018) što je u skladu s pretpostavkama da hladnoća izaziva promjene u fotosintetskom aparatu. Osim na sadržaj klorofila, taj utjecaj odražava se i u sadržaju karotenoida koji je također niži kod biljaka izloženih niskim temperaturama, posebice temperaturi smrzavanja.

Omjer klorofila *a* i *b* pokazatelj je učinkovitosti fotosinteze te često ovisi o količini svjetla kojemu je biljka izložena tijekom rasta (Lichtenthaler i Buschmann, 2001). U našem eksperimentu, iako su biljke bile izložene niskim temperaturama nema značajnije razlike između kontrole i nižih temperatura, jer su klijanci kod sve tri temperature uzgajani pod istim uvjetima. Taj je omjer kod nas oko 2 što odgovara biljkama koje su rasle izložene direktnom svjetlu. Zanimljivo je, što jedino kod prvog uzgoja i temperature od 21 °C je taj omjer značajno viši te je teško pretpostaviti mogući uzrok. Svakako treba uzeti u obzir i moguću tehničku pogrešku kod izvođenja eksperimenta.

Omjer ukupnog klorofila i karotenoida može biti pokazatelj jesu li biljke izložene stresu (Lichtenthaler i Buschmann, 2001). Kod biljaka koje su izložene stresu taj omjer često je niži nego kod kontrole, jer dolazi do bržeg propadanja klorofila nego karotenoida (Lichtenthaler i Buschmann, 2001). No, taj trend nije ujednačeno zabilježen u našem eksperimentu te je prolin sigurniji pokazatelj stresa nego omjer ukupnog klorofila i karotenoida.

4.4. Antioksidacijska aktivnost

Antioksidacijska aktivnost kod prvog i trećeg uzgoja nije se značajno razlikovala, osim kod drugog uzgoja gdje je antioksidacijska aktivnost pri temperaturi smrzavanja bila niža. Sličan trend zabilježen je za ukupne polifenole i fenolne kiseline što i ne čudi, jer upravo te dvije skupine specijaliziranih metabolita pokazuju antioksidacijsku aktivnost te pridonose antioksidacijskoj aktivnosti (Soengas i sur., 2018). Stoga, vjerojatno kod temperature smrzavanja dolazi do pada u razini tih komponenata i posljedično do smanjenja antioksidacijske aktivnosti.

5. Zaključak

U ovom radu cilj istraživanja bio je odrediti promjene u klijancima raštike uzgajanim na 1%-tnoj agaroznoj podlozi izloženim temperaturi pothlađivanja (8 °C) te smrzavanja (-8 °C) uz odgovarajuću kontrolu (21 °C). Sjeme raštike pokazalo je zadovoljavajući postotak klijavosti od oko 80%. Kao što je i bilo očekivano, niske temperature usporile su rast i razvoj te su klijanci izloženi niskim temperaturama imali kraće korijene te posljedično i manju masu. Usporenje fizioloških funkcija, odnosno fotosintetskog procesa evidentno je i po razini klorofila *a*, *b*, ukupnih klorofila i karotenoida čija je razina niža kod nižih temperatura. Razina prolina bila je povećana kod biljaka izloženih niskim temperaturama te je potvrđeno da je prolin koristan marker stresa i kod eksperimenta niskim temperaturama. Nasuprot tome, nismo primijetili da omjer ukupnih klorofila i karotenoida, koji se također ponekad koristi kao marker stresa, pokazuje razlike u eksperimentima stresa izazvanog niskim temperaturama.

Izloženost temperaturama pothlađivanja nije značajno utjecala na razinu ukupnih polifenola, ukupnih flavonoida i fenolnih kiselina, dok je izloženost temperaturi smrzavanja utjecala na smanjenje ukupnih polifenola i fenolnih kiselina kod drugog uzgoja, odnosno dužeg izlaganja temperaturi smrzavanja. Taj trend zabilježen je i za antioksidacijsku aktivnost što navodi na činjenicu da su upravo polifenoli i fenolne kiseline primarno odgovorni za antioksidacijsku aktivnost raštike.

Razina glukozinolata nije pokazala jasan trend s obzirom na temperaturu i različite uzgoje što navodi na zaključak da na razinu glukozinolata možda utječu i neki drugi faktori koji nisu bili kontrolirani u ovom eksperimentu te to svakako treba detaljnije istražiti u budućnosti. Posebno bi bilo važno ispitati razinu specijaliziranih metoda nekim sofisticiranijim instrumentima kao što su HPLC-DAD i HPLC-MS/MS kako bi se dobili točniji podaci o sadržaju pojedinih specijaliziranih metabolita.

6. Literatura

Aghajanzadeh T., Hawkesford M. J., Kok L. J. (2014): The significance of glucosinolates for sulfur storage in Brassicaceae seedlings. *Frontiers in Plant Science* **5**: 704.

Al-Shehbaz I. A. (2011): Brassicaceae (mustard family). U: *Encyclopedia of Life Sciences (ELS)*. Wiley, Chichester. Dostupno na:
<https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0003690.pub2>.

Al-Shehbaz I.A., Belstein M.A., Kellog E.A. (2006): Systematics and phylogeny of the Brassicaceae. *Plant Systematics and Evolution* **259**: 89-120.

Armstrong, G. A., Hearst, J. E. (1996.): Carotenoids 2: Genetics and molecular biology of carotenoid pigment biosynthesis. *The FASEB Journal* **10**: 228-237.

Ashraf, M., Foolad, M. R. (2007): Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environmental and Experimental Botany* **59**: 206-216.

Atici Ö., Demir Y., Kocaçalışkan İ. (2003): Effects of low temperature on winter wheat and cabbage leaves. *Biologia Plantarum* **46**: 603-606.

Avalos J., Carmen-Limon M. (2015): Biological roles of fungal carotenoids. *Current Genetics* **61**: 309-324.

Ayaz F. A., Glew, R. H., Millson M., Huang H. S., Chuang L. T., Sanz C., Hayırlıoğlu-Ayaz S. (2006): Nutrient contents of kale (*Brassica oleraceae* L. var. *acephala* DC.). *Food Chemistry* **96**: 572–579.

Azevedo C. H., Rodriguez-Amaya D. B. (2005): Carotenoid composition of kale as influenced by maturity, season and minimal processing. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **85**: 591–597.

Balkaya A., Yanmaz R., Apaydin A., Kar H. (2005): Morphological characterization of white head cabbage (*Brassica oleracea* var. *acephala* subvar. *alba*) genotypes in Turkey. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science* **33**: 333-341.

Bartels D., Sunkar R. (2005): Drought and salt tolerance in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences* **24**: 23-58.

Batelja K., Goreta Ban S., Žanić K., Miloš B., Dumičić G., Matotan Z. (2009): Svojstva autohtonih populacija raštike (*Brassica oleracea* var. *acephala*) hrvatskog priobalja. *Poljoprivreda* **15**: 8-14.

Brand-Williams W., Cuvelier M. E., Berset C. (1995): Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel - Wissenschaft und – Technologie* **28**: 25–30.

Cartea M. E., Francisco M., Soengas P., Velasco P. (2011): Phenolic compounds in Brassica vegetables. *Molecules* **16**: 251-280.

Cross J. M., von Korff M., Altmann, T., Bartzetko L., Sulpice R., Gibon Y., Palacios N., Stitt M. (2006): Variation of enzyme activities and metabolite levels in 24 Arabidopsis accessions growing in carbon-limited conditions. *Plant Physiology* **142**: 1574-1588.

Dai J., Mumper R. J. (2010): Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules* **15**: 7313-7352.

European Pharmacopoeia (2004): 4. izdanje Council of Europe, Strasbourg. 2377–2378.

Fahey J.W., Zalcmann A.T., Talalay P. (2001): The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. *Phytochemistry* **56**: 5–51.

Franzke A., Lysak M.A., Al-Shehbaz I.A., Koch M.A., Mummenhoff K. (2011): Cabbage family affairs: the evolutionary history of Brassicaceae. *Trends in plant science* **16**: 108-116.

Fuller M. P., Metwali E. M. R., Eed M. H. & Jellings A. J. (2006): Evaluation of abiotic stress resistance in mutated populations of cauliflower (*Brassica oleracea* var. *botrytis*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **86**: 239–248.

Gruz J., Novak O., Strnad M. (2008): Rapid analysis of phenolic acids in beverages by UPLC–MS/MS. *Food Chemistry* **111**: 789-794.

Hatfield J. L. i Prueger J. H. (2015): Temperature extremes: Effect on plant growth and development. *Weather and Climate Extremes* **10**: 4-10.

Hayat S., Hayat Q., Alyemeni M. N., Wani A. S., Pichtel J., Ahmad A. (2012): Role of proline under changing environments. *Plant Signaling & Behavior* **7**: 1456-1566.

<http://blog.linio.com.co/hipotiroidismo-en-adultos/>

Ibaraki Y., Murakami J. (2007): Distribution of chlorophyll fluorescence parameter Fv/Fm within individual plants under various stress conditions. *Acta Horticulturae* **761**: 222-260.

- Jin S., Yoshida M., Nakajima T., Murai A. (2003): Accumulation of hydroxycinnamic acid amides in winter wheat under snow. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* **67**: 1245-1249.
- Katalinić V., Smole Možina S., Skroza D., Generalić I., Abramović H., Miloš M., Ljubenković I., Piskernik S., Pezo I., Terpinč P., Boban M. (2010): Polyphenolic profile, antioxidant properties and antimicrobial activity of grape skin extracts of 14 *Vitis vinifera* varieties grown in Dalmatia (Croatia). *Food Chemistry* **119**: 715-723.
- Kazazić S. P. (2004): Antioksidacijska i antiradikalska aktivnost flavonoida. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju* **55**: 279-290.
- Kliebenstein D. J., Osbourn A. (2012): Making new molecules – evolution of pathways for novel metabolites in plants. *Current Opinion in Plant Biology* **15**: 415–423.
- Klimov S. V., Burakhanova E. A., Dubinina I. M., Alieva G. P., Sal'nikova E. B., Olenichenko N. A. i sur. (2008): Suppression of the source activity affects carbon distribution and frost hardiness of vegetating winter wheat plants. *Russian Journal of Plant Physiology* **55**: 308–314.
- Krasensky J., Jonak C. (2012): Drought, salt, and temperature stress-induced metabolic rearrangements and regulatory networks. *Journal of Experimental Botany* **63**: 1593–1608.
- Lichtenthaler H. K., Buschmann C. (2001): *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, F4.3.1-F4.3.8.
- Manikandan R., Thiagarajan R., Goutham G., Arumugam M., Beulaja M., Rastrelli L., Skalicka-Woźniak K., Habtemariam S., Erdogan Orhan I., Nabavi S. F., Nabavi S. M. (2016): Zeaxanthin and ocular health, from bench to bedside. *Fitoterapia* **109**: 58-66.
- Martinez V., Mestre T. C., Rubio F., Girones-Vilaplana A., Moreno D. A., Mittler R., Rivero R. M. (2016): Accumulation of flavonols over hydroxycinnamic acids favors oxidative damage protection under abiotic stress. *Frontiers in Plant Science* **7**: 1-17.
- Martinez-Ballesta M., Carvajal M. (2015): Myrosinase in Brassicaceae: the most important issue for glucosinolate turnover and food quality. *Phytochemistry Reviews* **14**: 1045-1051.
- Namdeo A. G. (2007): Plant cell elicitation for production of secondary metabolites: a review. *Pharmacognosy Reviews* **1**: 1-11.

Nisar N., Li L., Lu S., Chi Khin N., Pogson Barry J. (2015): Carotenoid metabolism in plants. *Molecular Plant* **8**: 68-82.

Pandey K. B., Rizvi S. I. (2009): Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **2**: 270-278.

Pavlović I. (2017): Uloga auksina i hormona stresa u odgovoru kupusnjača (*Brassicaceae*) na povišeni salinitet, doktorska disertacija, Osijek: Sveučilište J.J. Strossmayera

Pavlović I., Petřík I., Tarkowská D., Lepeduš H., Vujčić Bok V., Radić Brkanac S., Novak O., 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**: 2866.

Ramakrishna A., Gokare A. R. (2011): Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant Signaling & Behaviour* **6**: 1720-1731.

Ribera A. E., Zuniga G. (2012): Induced plant secondary metabolites for phytopatogenic fungi control: a review. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition* **12**: 893-911.

Rodríguez V. M., Soengas P., Alonso-Villaverde V., Sotelo T., Cartea M. E., Velasco P. (2015): Effect of temperature stress on the early vegetative development of *Brassica oleracea* L. *BMC Plant Biology* **15**: 1-9.

Schmidt S., Zietz M., Schreiner M., Rohn S., Kroh L. W., Krumbein A. (2010): Genotypic and climatic influences on the concentration and composition of flavonoids in kale (*Brassica oleracea* var. *sabellica*). *Food Chemistry* **119**: 1293-1299.

Singleton V. L., Rossi J. A. (1965): Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic – phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture* **16**: 144–158.

Soengas P., Rodriguez V. M., Velasco P., Cartea M. E. (2018): Effect of temperature stress on antioxidant defenses in *Brassica oleracea*. *ACS Omega* **3**: 5237-5243.

Šamec D., Pavlović I., Radojčić Redovniković I., Salopek-Sondi B. (2018a): Comparative analysis of phytochemicals and activity of endogenous enzymes associated with their stability, bioavailability and food quality in five *Brassicaceae* sprouts. *Food Chemistry* **269**: 96-102.

Šamec D., Salopek-Sondi B. (2018): Cruciferous (Brassicaceae) Vegetables. Dostupno na: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812491-8.00027-8>.

Šamec D., Urlić B., Salopek-Sondi B. (2018b): Kale (*Brassica oleracea* var. *acephala*) as a superfood: Review of the scientific evidence behind the statement. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, prihvaćen, doi: 10.1080/10408398.2018.1454400.

Travers-Martin N., Kuhlmann F., Müller C. (2008): Revised determination of free and complexed myrosinase activities in plant extracts. *Plant Physiology and Biochemistry* **46**: 506-516.

Tsao R. (2010): Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients* **2**: 1231-1246.

Verkerk R., Dekker M., Jongen W. M. F. (2001): Postharvest increase of indolyl glucosinolates in response to chopping and storage of brassica vegetables. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **81**: 953–95.

Zhishen J., Mengcheng T. & Jianming W. (1999): The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry* **64**: 555–559.

7. Životopis

Stjepana Fistanić rođena je 22. lipnja 1994. godine u Supetru na otoku Braču. Pohađa osnovnu školu u Selcima koju završava 2009. godine, a zatim upisuje klasični smjer u Prvoj gimnaziji Split. Nakon završene srednje škole, upisuje integrirani preddiplomski i diplomski studij biologije i kemije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Zagrebu. U sklopu fakulteta, dvije godine za redom sudjeluje u organizaciji Noći biologije na Biološkom odsjeku, a treću godinu sudjeluje u organizaciji Otvorenih dana PMF-a na Kemijskom odsjeku. 2015. postaje aktivni član sekcije za edukaciju udruge BIUS te sudjeluje u osmišljavanju i provođenju radionice „Mali vrt u mojoj kuhinji“, financirane od strane Sveučilišta u Zagrebu, u osnovnim školama Zagreba i Samobora. Tri godine za redom je voditeljica sekcije za edukaciju u udruzi studenata biologije – BIUS. Potom, 2016. osmišljava i provodi radionice „Na mladima svijet ostaje: ZELENA BUDUĆNOST“, financirane od strane Sveučilišta u Zagrebu, u osnovnim školama Zagreba. 2016. i 2017. sudjeluje u organizaciji Istraživačko-edukacijskog projekta MURA-DRAVA, a godinu kasnije Istraživačko-edukacijskog projekta DUGI OTOK. Dio rezultata nastalih za vrijeme istraživanja na Institutu Ruđer Bošković u sklopu izrade diplomskog rada prezentirani su na tri međunarodna znanstvena skupa te je Stjepana Fistanić koautor na tri sažetka s međunarodnih znanstvenih skupova (7th Slovenian Symposium on Plant Biology with international participation, Natural resources green technology & sustainable development/GREEN, Advances in Phytochemical Analysis – Trends in Natural Products Research).