

Učinak biljnih hormona stresa na klijance kineskog kupusa (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*)

Janković, Iva

Master's thesis / Diplomski rad

2012

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:217:852354>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-04-01**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Iva Janković

**Učinak biljnih hormona stresa na klijance kineskog kupusa
(*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*)**

Diplomski rad

Zagreb, 2012.

Ovaj rad, izrađen u Zavodu za molekularnu biologiju Instituta Ruder Bošković, pod vodstvom dr. sc. Branke Salopek Sondi i suvodstvom doc. dr. sc. Biljane Balen, predan je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja mag. molekularne biologije.

Najiskrenije se zahvaljujem svojoj mentorici, dr. sc. Branki Salopek Sondi na izvrsnom vodstvu, strpljenju, pomoći i sugestijama prilikom izrade diplomskog rada.

Zahvaljujem Ani Smolko na izuzetnom strpljenju, pomoći, brojnim savjetima i prijateljskoj podršci oko eksperimentalnog dijela ovog rada.

Zahvaljujem se doc. dr. sc. Biljani Balen što je srdačno ustupila laboratorij na PMF-u za eksperimente, na opremi, izradi protokola i ljubaznosti.

Dunja Šamec je sudjelovala u određivanju lipidne peroksidacije i ukupnih fenola u klijancima i na tome joj od srca hvala.

Zahvaljujem se svim ostalim članovima Laboratorija za kemijsku biologiju, kao i kolegicama iz Laboratorija za celularnu biokemiju na ugodnoj atmosferi i savjetima za vrijeme boravka u laboratorijima.

Veliko hvala mojoj mami, Teni i Đuki te svim prijateljima i kolegama za bezuvjetnu potporu tijekom studiranja i izrade ovog rada.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Diplomski rad

UČINAK BILJNIH HORMONA STRESA NA KLIJANCE KINESKOG KUPUSA (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*)

Iva Janković

Rooseveltove trg 6, 10000 Zagreb

Biljni hormoni auksini neophodni su u regulaciji biljnog razvitka kao i odgovoru biljaka na čimbenike stresa. Auksini se u biljnom tkivu pojavljuju slobodni (aktivne forme) ili konjugirani s aminokiselinama i šećerima (skladišne i transportne forme). Iako precizni mehanizam održavanja homeostaze auksina još nije razjašnjen, pretpostavlja se da glavnu ulogu imaju procesi konjugacije te hidrolize konjugiranih auksina po potrebi (pomoću enzima auksin-amidohidrolaza). Da bismo dobili uvid u interakcije hormona stresa i auksinskog metabolizma, u ovom radu istražen je učinak hormona stresa: salicilne kiseline (SA), jasmonske kiseline (JA) i apscizinske kiseline (ABA) na klijance kineskog kupusa (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*). Koristeći biotest inhibicije korijena *in vivo* utvrđeno je da hormoni stresa djeluju inhibitorno na rast korijena uglavnom ovisno o koncentraciji. Na genskoj razini je metodom lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu utvrđeno stimulatívno djelovanje JA i SA na ekspresiju transkripta za auksin-amidohidrolazu BrILL2, dok je ABA djelovala inhibitorno. Spektrofotometrijskim metodama izmjereno je oksidacijsko stanje klijanaca te se pokazalo da ne dolazi do značajnog oksidacijskog stresa uslijed tretmana hormonima stresa.

(68 stranica, 20 slika, 4 tablice, 46 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: auksin, auksin-amidohidrolaza, jasmonska kiselina, apscizinska kiselina, salicilna kiselina

Voditelj: Dr. sc. Branka Salopek Sondi

Suvoditelj: Dr. sc. Biljana Balen, doc.

Ocjenitelji: Dr. sc. Biljana Balen, doc.

Dr. sc. Branka Salopek Sondi

Dr. sc. Sandra Radić Brkanac, doc.

Rad prihvaćen: 02.02.2012.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb

Faculty of Science

Division of Biology

Graduation Thesis

Plant stress hormones effect on the Chinese cabbage seedlings (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*)

Iva Janković

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb

Plant hormones auxins play important role in regulation of plant development as well as plant response to stress. Auxins can be found in plants as free forms (active forms), and conjugated with amino acids or sugars (storage and transport forms). Although the precise mechanism of auxin homeostasis is not fully discovered, it is assumed that their homeostasis is regulated by processes of conjugation, and hydrolysis upon tissue demand (which is accomplished by auxin amidohydrolases enzymes). In order to gain information about influence of stress hormones on the auxin homeostasis, the effect of stress hormones: salicylic acid (SA), jasmonic acid (JA), and abscisic acid (ABA) was investigated on the Chinese cabbage seedlings (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*). Inhibition of root growth upon treatment with stress hormones was identified *in vivo*, mostly in a dose dependent manner, using root growth bioassay. An expression level of auxin amidohydrolase BrILL2 transcript upon treatments was examined by RT-PCR. JA and SA caused up regulation, while ABA caused down regulation of BrILL2 transcript expression. Finally, oxidation status of Chinese cabbage seedlings upon treatments was discovered using spectrophotometric methods and it was found that stress hormones do not significantly affect oxidation status of seedlings.

(68 pages, 20 figures, 4 tables, 46 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central biological library

Key words: auxin, auxin amidohydrolase, jasmonic acid, abscisic acid, salicylic acid

Supervisor: Dr. sc. Branka Salopek Sondi

Co-supervisor: Dr. sc. Biljana Balen, Ass. Prof.

Reviewers: Dr. sc. Biljana Balen, Ass. Prof.

Dr. sc. Branka Salopek Sondi

Dr. sc. Sandra Radić Brkanac, Ass. Prof.

Thesis accepted: 02.02.2012.

SADRŽAJ

1.	Uvod.....	1
1.1	Biljni hormoni	2
1.2	Auksini	2
1.2.1	Homeostaza auksina	4
1.2.1.1	Biosinteza auksina	5
1.2.1.2	Reverzibilna i ireverzibilna konjugacija auksina.....	8
1.2.1.2.1	Auksin amidohidrolaze kao dio homeostaze	9
1.3	Stres kod biljaka i mehanizmi prilagodbe	10
1.3.1	Auksini u odgovoru biljaka na stres	12
1.3.2	Hormoni stresa i međudjelovanje s auksinima.....	13
1.3.2.1	Apscizinska kiselina	14
1.3.2.2	Salicilna kiselina.....	15
1.3.2.3	Jasmonska kiselina	17
1.4	Cilj istraživanja	19
2.	Materijal i metode	20
2.1	Materijal	21
2.1.1	Biljni materijal.....	21
2.1.2	Podloge za uzgoj i tretiranje klijanaca	22
2.1.3	Puferi i otopine	22
2.1.3.1	Otopine hormona stresa	22
2.1.3.2	Reagens za određivanje lipidne peroksidacije.....	22

2.1.3.3	Otopine i reagensi za određivanje ukupnih fenola	23
2.1.3.4	Puferi za analizu aktivnosti antioksidacijskih enzima	23
2.1.3.4.1	Puferi za ekstrakciju proteina.....	23
2.1.3.4.2	Puferi za određivanje specifične aktivnosti antioksidacijskih enzima.....	24
2.1.3.5	Reagens za određivanje koncentracije proteina metodom po Bradford-u.....	25
2.1.3.6	Otopine za određivanje količine vodikovog peroksida	25
2.1.3.7	Puferi za lančanu reakciju polimerazom u stvarnom vremenu (RT-PCR).....	25
2.1.3.7.1	Sastav detergenta za pranje pribora („RNase free SDS detergent“)	25
2.1.3.7.2	Sastav pufera za ekstrakciju RNA	25
2.1.3.7.3	Sastav „SSTE“ pufera	26
2.1.3.7.4	Sastav pufera za reakciju DNaze (10x).....	26
2.1.3.7.5	Sastav reakcijske smjese za reakciju DNaze.....	26
2.1.3.7.6	Pufer za elektroforezu RNA (TBE)	27
2.1.3.7.7	Otopina etidijevog bromida	27
2.1.3.7.8	Otopine za postupak reverzne transkripcije	27
2.1.3.7.9	Otopine za analizu ekspresije gena metodom „Real-time PCR“	28
2.2	Metode.....	30
2.2.1	Uzgoj i tretiranje klijanaca kineskog kupusa	30
2.2.2	Inhibicija rasta korijena uslijed tretmana hormonima stresa.....	30
2.2.3	Određivanje lipidne peroksidacije i ukupnih fenola	31
2.2.3.1	Priprema ekstrakta za određivanje lipidne peroksidacije i ukupnih fenola	31
2.2.3.2	Mjerenje lipidne peroksidacije	31

2.2.3.3	Mjerenje ukupnih fenola.....	32
2.2.4	Aktivnost antioksidacijskih enzima	33
2.2.4.1	Priprema ekstrakta	33
2.2.4.2	Određivanje koncentracije proteina metodom po Bradford-u	33
2.2.4.3	Određivanje aktivnosti katalaze.....	34
2.2.4.4	Određivanje aktivnosti askorbat peroksidaze	35
2.2.4.5	Određivanje aktivnosti pirogalol peroksidaze	35
2.2.5	Određivanje količine vodikovog peroksida.....	36
2.2.6	Određivanje ekspresije gena BrILL2 metodom lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu (RT-PCR)	37
2.2.6.1	Izolacija RNA	37
2.2.6.2	Uklanjanje DNA iz otopina djelovanjem enzima DNaze.....	38
2.2.6.3	Provjera uspješnosti izolacije RNA elektorforezom u agaroznom gelu	38
2.2.6.4	Obrnuto prepisivanje (reverzna transkripcija)	39
2.2.6.5	Analiza ekspresije gena BrILL2 metodom „REAL-TIME PCR“	39
2.2.7	Statistička obrada	42
3.	Rezultati	43
3.1	Inhibicija rasta korijena uslijed tretmana hormonima stresa.....	44
3.2	Lipidna peroksidacija	46
3.3	Ukupni fenoli.....	46
3.4	Specifična aktivnost katalaze	48
3.5	Specifična aktivnost askorbat peroksidaze.....	49
3.6	Specifična aktivnost pirogalol peroksidaze.....	50

3.7	Količina vodikovog peroksida	51
3.8	Ekspresija gena BrILL2	51
4.	Rasprava	55
5.	Zaključci	61
6.	Literatura	63

POPIS KRATICA

ABA	apscizinska kiselina
AMP	adenozil-monofosfat
AOX	alternativna oksidaza
APX	askorbat peroksidaza
BTH	benzotiadiazol S-metilester
CAT	Katalaza
cDNA	komplementarna DNA
COX	citokrom oksidaza
CTAB	cetil-3-metil-amonijev bromid
DTT	Ditiotreitol
EDTA	etilen-diamin-tetraoctena kiselina
FC reagens	Folin Ciacalteau reagens
HSP	<i>heat shock proteins</i>
IAA	indol-3-octena kiselina
IAAld	indol-3-acetaldehid
IAM	indol-3-acetamid
IAN	indol-3-acetonitril
IAOx	indol-3-acetaldoksim
IBA	indol-3-maslačna kiselina
IGP	indol-3-glicerol fosfat
IPA	indol-3-piruvatna kiselina
JA	jasmonska kiselina
JIP	jasmonat-inducirani proteini (<i>jasmonate induced proteins</i>)
MAPK	kaskada mitogen aktiviranih proteina kinaza
MDA	Malondialdehid
mqH ₂ O	deionizirana sterilna voda
NPQ	nefluorescencijski hvatač (<i>nonfluorescence quencher</i>)

PCD	programirana stanična smrt (<i>programmed cell death</i>)
PCR	lančana reakcija polimerazom (<i>polymerase chain reaction</i>)
PR geni	geni povezani s patogenezo (<i>pathogenesis related genes</i>)
PVP40	Polivinilpirolidon
ROS	reaktivni kisikovi oblici (<i>reactive oxygen species</i>)
rpm	okretaji u minuti (<i>revolutions per minute</i>)
SA	salicilna kiselina
SDS	natrijev dodecilsulfat
SOD	superoksid dismutaza
TAM	Triptamin
TBA	tiobarbiturna kiselina
TCA	trikloroetna kiselina
UGT	UDP-glukoza transferaza

1. UVOD

1.1 BILJNI HORMONI

Biljni hormoni su signalne molekule prisutne u vrlo niskim koncentracijama u biljnom tkivu. Za razliku od animalnih organizama, koji imaju specijalizirana tkiva i žlijezde za proizvodnju hormona, u biljnih organizama svaka stanica je sposobna za proizvodnju hormona. Glavna uloga im je u regulaciji i međusobnoj koordinaciji metabolizma, rasta i morfogeneze biljnih organizama. Uključeni su u mnoštvo fizioloških procesa, kao što su klijanje sjemenki, rast stabljike i korijena, razvitak cvjetova i određivanje njihova spola, razvitak i sazrijevanje plodova, obrambeni mehanizmi biljaka i mnogi drugi procesi. Kako biljni hormoni nemaju specifična ciljna tkiva, u različitim tkivima mogu izazvati različite odgovore.

Za sada je definirano pet osnovnih skupina biljnih hormona ili biljnih regulatora rasta: auksini, citokinini, giberelini, abscizinska kiselina i etilen. Uz nabrojane, danas se u posebnu skupinu biljnih hormona svrstavaju jasmonska i salicilna kiselina, molekule uključene u obrambene mehanizme protiv različitih stresnih čimbenika, kao što su napad patogena, herbivora i ostali nepovoljni okolišni uvjeti.

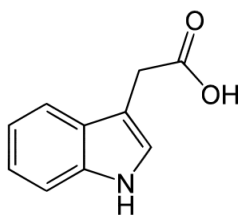
Regulacija biljnog rasta i razvitka te preživljavanje biljaka u ponekad vrlo nepovoljnim klimatskim uvjetima posljedica je kompleksnog međudjelovanja spomenutih biljnih hormona. U ovom radu je prikazan poseban osvrt na auksine, njihovu ulogu u biljnom rastu i razvitku kao i ulogu auksina u odgovoru biljke na uvjete stresa, realiziranu kroz kompleksne i za sada nedovoljno istražene interakcije s hormonima stresa.

1.2 AUKSINI

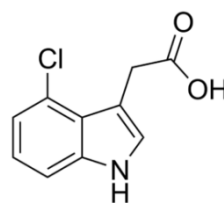
Auksini su prvi otkriveni hormoni, čija je glavna uloga u regulaciji produžnog rasta biljaka te u odgovoru biljaka na jednosmjerne podražaje (Pevalek-Kozlina 2003). Osim toga, poznato je da stimuliraju stanične diobe u stabljici i vaskularnom kambiju, potiču razvitak adventivnog korijenja, nastanak provodnog tkiva lista, rast plodova te razvoj partenokarpnih plodova u nekim biljnim vrstama. Istovremeno inhibiraju produžni rast korijena te stanične diobe u bočnim pupovima (Pevalek-Kozlina 2003).

Naziv auksini potječe od grčke riječi *auxien*, što znači rasti. Sredinom 30-tih godina 20. stoljeća otkrivena je kemijska struktura auksina. Utvrđeno je da je auksin indol-3-octena kiselina (IAA) koja se u biljkama javlja u nanomolarnim koncentracijama. Nadalje, otkriveni su i drugi prirodni auksini (slika 1.1), kao što su klorirani oblik IAA (4-klorindol-3-octena kiselina) (Woodward i Bartel 2005), feniloctena kiselina (Ludwig-Müller i Cohen 2002; Woodward i Bartel 2005) i indol-3-maslačna kiselina (IBA) (Ludwig-Müller 2007, Bajguz i Piotrowska 2009).

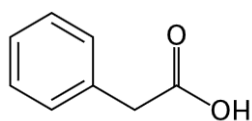
A)



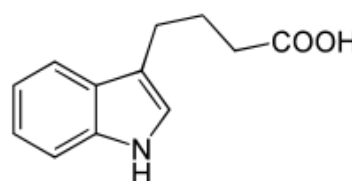
B)



C)



D)



Slika 1.1. Endogeni auksini. A) indol-3-octena kiselina, najzastupljeniji i prvi otkriveni auksin; B) 4-klorindol-3-octena kiselina; C) feniloctena kiselina; D) indol-3-maslačna kiselina.

Biologija auksina je jedno od najstarijih područja istraživanja biljne fiziologije, koje datira još iz vremena Darwina. On je krajem 19. stoljeća na klijancima kanarske trave (*Phalaris canariensis*) istraživao međuovisnost smjera upada svjetlosti i rasta biljnih organa (fototropizam). Pokazao je da se mladi izdanak neće orijentirati prema izvoru svjetlosti, ukoliko mu se prethodno odreže vršak koleoptile (Woodward i Bartel 2005), što upućuje na to da se u samom vršku izdanka sintetizira tvar (auksin) koja se prenosi prema donjem dijelu koleoptile i uzrokuje njezino zakrivljenje.

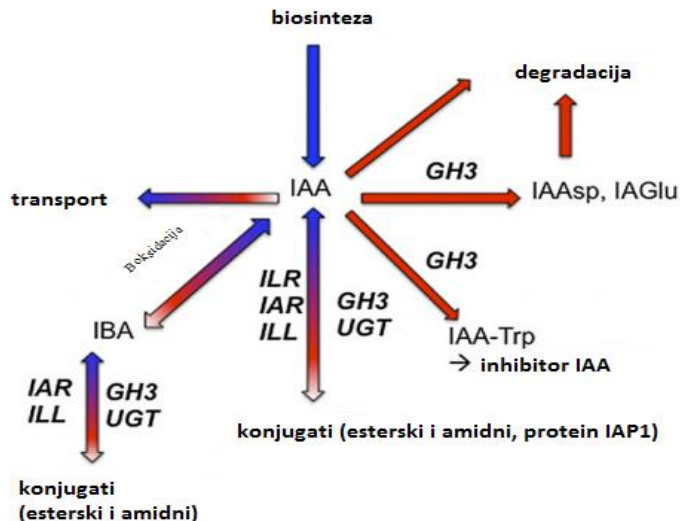
Skoog i Miller su 1957. godine pokazali da auksini potiču zakorijenjivanje iz nediferenciranog kalusa u kulturi. Zajedno s fitohormonom citokininom, auksini omogućuju regeneraciju čitave biljke u kulturi tkiva (Woodward i Bartel 2005).

Danas se istraživanje auksina uglavnom provodi na uročnjaku (*Arabidopsis thaliana* L.) kao modelnoj biljci, uzgojem sjemenki na podlogama u koje su egzogeno dodane komponente čiji utjecaj se želi ispitati. Ovakvom vrstom eksperimenata dokazano je da auksini utječu na morfologiju korijena, inhibirajući njihov rast uz istovremeno poticanje rasta lateralnog i adventivnog korijenja (Woodward i Bartel 2005).

Glavna mjesta nastanka auksina u višim biljkama su meristemska tkiva i tkiva embrija te fotosintetizirajući organi. IAA može također biti prisutna u visokim koncentracijama i u spremišnim tkivima, npr. endospermu i supkama te koleoptilama i peludu. Danas se proizvode i brojni sintetski auksini koji imaju široku primjenu u hortikulturi i agronomiji (Pevalek-Kozlina 2003).

1.2.1 HOMEOSTAZA AUKSINA

S obzirom da su auksini djelotvorni u niskim koncentracijama, a postaju toksični za biljni organizam u visokim koncentracijama, biljke moraju imati vrlo fine mehanizme održavanja potrebne razine auksina. U homeostazi auksina sudjeluju procesi biosinteze, reverzibilne i ireverzibilne konjugacije, transporta i degradacije auksina (Ludwig-Müller 2011) (slika 1.2).



Slika 1.2. Homeostaza auksina. Plave strelice označavaju reakcije koje dovode do povećanja razine slobodne IAA, dok crvene strelice prikazuju reakcije koje dovode do smanjenja razine slobodne IAA. Na strelicama su navedeni geni koji su uključeni u konjugaciju auksina i njihovu hidrolizu. Preuzeto iz Ludwig-Müller (2011).

1.2.1.1 BIOSINTEZA AUKSINA

Suprotno dugo uvriježenoj hipotezi da se biosinteza auksina događa isključivo u apikalnim regijama kako bi se oni dalje prenosili u ostale dijelove biljke, danas je dokazano da to nije točno (Normanly 2010). Magnus i sur. (1980) mjerili su ugradnju deuterija u indolni prsten indol-3-octene kiseline (IAA), koji predstavlja mjeru IAA sinteze *de novo*. Pokazali su kako se vodikovi atomi ne zamjenjuju deuterijem na položajima 2, 4, 5, 6 i 7 indolnog prstena, čak ni u jako alkaličnim uvjetima. Time je dokazano da su svi dijelovi mladih klijanaca sposobni sintetizirati IAA, pri čemu posebno jaku biosintetsku aktivnost pokazuju tek oplodeni embriji, mladi listovi te korijenje (Normanly 2010).

Biosintetski putevi IAA se mogu klasificirati kao Trp-ovisni (ako IAA nastaje iz metaboličkog puta aminokiseline triptofana) ili Trp-neovisni (ako IAA nastaje iz molekule koja je rani prekursor aminokiseline triptofana, vjerojatno indol-3-glicerol fosfata (IGP)) (slika 1.2) (Woodward i Bartel 2005; Normanly 2010).

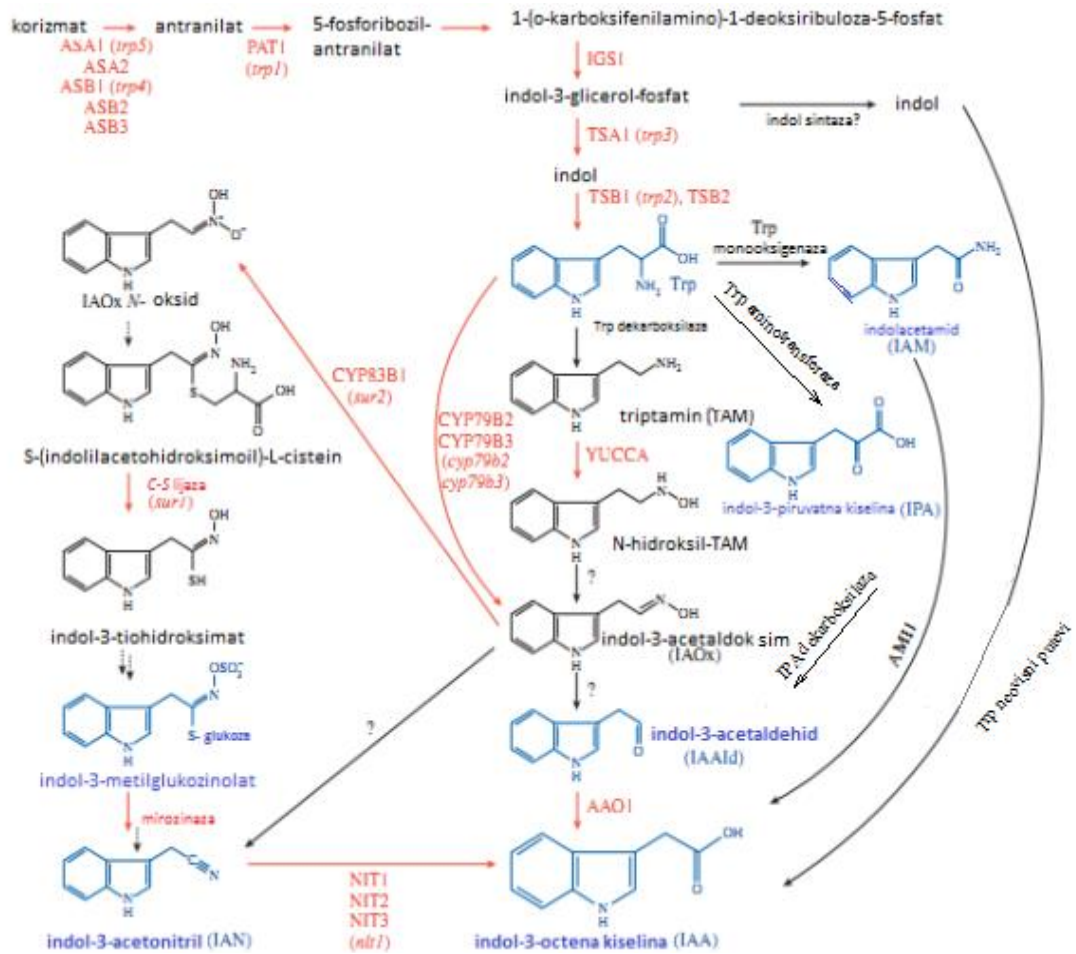
Biosinteza auksina triptofan-ovisnim putem događa se pomoću nekoliko opisanih puteva nazvanih prema intermedijeru (slika 1.2.; Woodward i Bartel 2005):

- IPA (indol-3-piruvatna kiselina) biosintetski put: [Trp → IPA → indol-3-acetaldehid (IAAld) → IAA]
- IAM (indol-3-acetamid) biosintetski put: [Trp → IAM → IAA]
- TAM (triptamin) biosintetski put: [Trp → TAM → N-hidroksil-TAM → indol-3-acetaldoksim (IAOx) → IAAld → IAA]
- IAOx (indol-3-acetaldoksim) biosintetski put: [Trp → IAOx → IAN (indol-3-acetonitril) ili IAAld → IAA]

Zajednička karakteristika nabrojanih puteva je da nastaju iz aminokiseline triptofana, koja potječe od ranog prekursora korizmata ili antranilata.

Od posebne važnosti za biljke koje sintetiziraju indolne glukozinolate kao sekundarne metabolite je put biosinteze auksina IAOx (Sugawara i sur. 2009; Normanly 2010). IAOx predstavlja točku grananja u signalnom putu; u jednom smjeru će se sintetizirati glukozinolati, dok će u drugom doći do sinteze auksina. Osim na uročnjaku, visoke količine IAOx su izmjerene u biljkama kao što su riža, duhan, kukuruz (Sugawara i sur. 2009) i borovi (Quittenden i sur. 2009).

Enzimi koji imaju najvažniju ulogu u signalnom putu opisanom na uročnjaku su P450 monooksigenaze CYP79B2 i CYP79B3, koje oksidiraju Trp u IAOx *in vitro* (Woodward i Bartel 2005) (slika 1.3). Treća važna monooksigenaza je CYP83B1, koja pretvara IAOx u N-oksid. N-oksid nakon nekoliko enzimatskih koraka prelazi u indol-3-metil-glukozinolat. U porodici *Brassicaceae*, indol-3-metil-glukozinolat se katalitičkim djelovanjem mirozinaze hidrolizira u indol-3-acetonitril (IAN), koji se djelovanjem nitrilaza pretvara u IAA. Nitrilaze su izolirane iz nekoliko biljnih porodica, uključujući krstašice i trave (Woodward i Bartel 2005).



Slika 1.3. Potencijalni biosintetski putevi auksina u uročnjaku. Spojevi izolirani iz uročnjaka prikazani su plavom bojom, dok su enzimi čiji su geni do sada identificirani prikazani crvenom bojom. Moguće reakcije, za koje još nisu otkriveni geni, označene su upitnicma (?). Preuzeto iz Woodward i Bartel (2005).

Triptofan-neovisni put biosinteze auksina također je moguć, što je i dokazano na genetičkim mutantama uročnjaka. Ove mutante su konstruirane tako da su im nedostajali geni za Trp sintazu α i β koja omogućuje sintezu triptofana iz indol-3-glicerol fosfata (Woodward i Bartel 2005). Unatoč tome što su imale vrlo nisku razinu Trp, u ovim mutantama je izolirana visoka količina IAA, kao i IAA-konjugata. Pokazalo se da se signalni put Trp-neovisne biosinteze IAA odvaja od Trp-ovisnog na mjestu biosinteze indol-3-glicerol fosfata.

1.2.1.2 REVERZIBILNA I IREVERZIBILNA KONJUGACIJA AUKSINA

Pored procesa biosinteze, u regulaciji auksina važnu ulogu imaju i procesi konjugacije što znači da biljke mogu pohranjivati auksine u formi konjugata. U biljnim tkivima većina auksina je prisutna u konjugiranom obliku, tj. 95% svih auksina u biljci nalazi se u obliku konjugata, dok je samo 5% prisutno u slobodnoj formi.

Najzastupljeniji oblici auksina u biljnim tkivima su upravo konjugati IAA s različitim molekulama. Pretpostavlja se da IAA-konjugati nemaju biološku aktivnost te da uglavnom služe kao skladišne forme auksina (reverzibilna konjugacija) ili kao biljezi za degradaciju (ireverzibilna konjugacija) (Ludwig-Müller 2011). Konjugati auksina se klasificiraju ovisno o vezi kojom su vezani za IAA (Bajguz i Pietrowska 2009):

- a) esterskom vezom nastaju konjugati IAA i šećera (IAA-glukoza, IAA-mioinozitol) te konjugat velike molekularne mase (IAA-glikan)
- b) amidnom vezom nastaju konjugati IAA s aminokiselinama, peptidima i proteinima.

Mnogi konjugati auksina su otkriveni i opisani u raznim biljnim vrstama (Ludwig-Müller 2011). Prvi konjugat IAA, IAA-Asp otkriven je 1955. godine u klijancima smreke te kasnije identificiran u drugim vrstama poput običnog bora i biljaka iz roda duglazija (*Pseudotsuga*). IAA-Asp i IAA-Glu dokazani su u bundevi i soji. IAA-Ala izoliran je iz smreke. Istraživanja na uročnjaku pokazala su postojanje IAA-Ala, IAA-Asp, IAA-Leu i IAA-Glu, a konjugati s aminokiselinama Val i Phe otkriveni su nedavno u sjemenkama kukurjeka (Brcko i sur. 2012, u tisku).

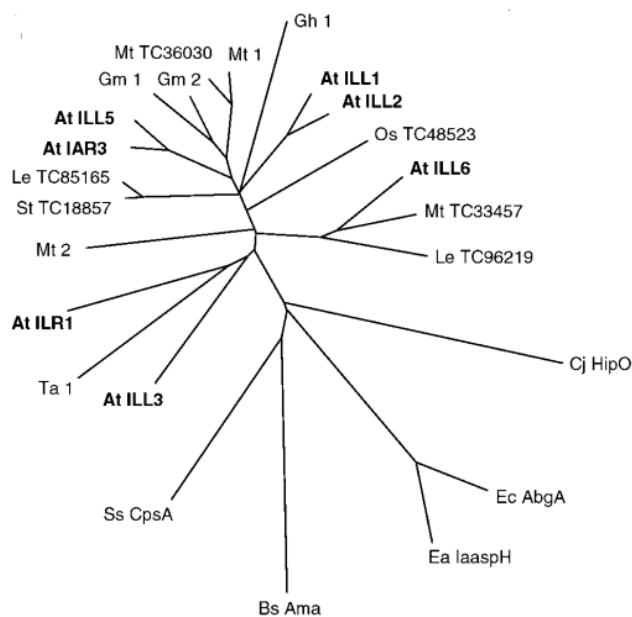
Enzimologija procesa konjugacije još uvijek je relativno neobjašnjeno područje. Pretpostavlja se da biosinteza konjugata uključuje nastanak auksin-AMP anhidrida kao glavnih intermedijera (Staswick i sur. 2002). Hidroliza IAA-amidnih konjugata događa se pomoću auksin amidohidrolaza, pri čemu se oslobađaju slobodni auksini (Woodward i Bartel 2005; Ludwig-Müller 2011.). Hidrolaze su prvi put izolirane iz uročnjaka (LeClere i sur. 2002), a nešto kasnije i iz pšenice (Campanella i sur. 2004), djeteline (Campanella i sur. 2008) i kineskog kupusa (Savić i sur. 2009).

1.2.1.2.1 Auksin amidohidrolaze kao dio homeostaze

Genski lokus uročnjaka At5g56660.1 kodira protein ILL2 (*IAA-leucine-resistantlike 2 gene*) iz porodice auksin amidohidrolaza (M20D porodica peptidaza) (Bitto i sur. 2008). Nekoliko dodatnih auksin amidohidrolaza otkriveno je testovima inhibicije rasta korijena u uročnjaka: ILR1 i IAR3. Osim spomenutih, izolirani su još i ILL1, ILL2, ILL4, ILL5 i ILL6, koji pokazuju 40-85% sličnosti u aminokiselinskom slijedu proteina (Bitto i sur. 2008). Velika raširenost ove multigenske porodice proteina ukazuje na ranu evolucijsku divergenciju u biljnom carstvu. Bioinformatičkim metodama je dokazano da ILL1, IAR3 te ILL5 imaju aminoterminalni signalni slijed, te karboksiterminalni tetrapeptid His/Lys-Asp-Glu-Leu koji predstavlja oznaku za usmjeravanje u endoplazmatski retikulum. Značenje procesa lokalizacije u endoplazmatski retikulum do danas nije objašnjeno (Bitto i sur. 2008).

Biokemijskim metodama je pokazano kako ILL2 amidohidrolaza iz uročnjaka ima najveću katalitičku aktivnost, a najbolji supstrat joj je IAA-Ala. ILR1 se najradije veže za IAA-Leu, IAA-Tyr i IAA-Phe kao supstrate (Bitto i sur. 2008). Campanella i sur. (2003) izolirali su amidohidrolazu sILR1 iz srodne vrste *A. suecica*. Osim toga, istraživanje auksin amidohidrolaza provedeno je i na modelnoj vrsti *Brassica rapa* L. te se pokazalo da su amidohidrolaze visoko homologne onima opisanim na uročnjaku (Ludwig-Müller i sur. 1996; Schuller i Ludwig-Müller 2006; Savić i sur. 2009). Savić i sur. (2009) su pokazali kako BrIAR3 te BrILL2 pokazuju najbolju specifičnu aktivnost prema konjugatima dugolančanih auksina (IPA-Ala i IBA-Ala) kao supstratima, iako mogu hidrolizirati i IAA-Ala, IAA-Val i IAA-Leu s manjom specifičnom aktivnošću. Specifičnost za aminokiselinske konjugate dugolančanih auksina također pokazuje auksin amidohidrolaza iz pšenice TaIAR3 (Campanella i sur. 2004). Genskim analizama dokazano je postojanje homologa auksin amidohidrolaza u ostalim vrstama (jednosupnice i dvosupnice), a ne samo u uročnjaku (LeClere i sur. 2002). Filogenetske analize pokazale su da ILR1/ILL3, IAR3/ILL5/ILL3/ILL2 te ILL6 pripadaju različitim granama filogenetskog stabla, što upućuje da je za više biljke karakteristična različitost u funkcijama amidohidrolaza. Pravilo je da amidohidrolaze izolirane iz drugih biljaka pokazuju veću sličnost nekoj od amidohidrolaza uročnjaka, nego amidohidrolaze uročnjaka među sobom. To indicira da su članovi genske porodice auksin amidohidrolaza divergirali prije nego što je došlo do razdvajanja jednosupnica i dvosupnica (LeClere i sur. 2002, slika 1.4). Zahvaljujući ovim saznanjima, danas postaje jasno da procesi

konjugacije auksina vjerojatno predstavljaju glavni mehanizam održavanja homeostaze auksina u biljkama.



Slika 1.4. Filogenetsko stablo auksin amidohidrolaza i srodnih proteina iz biljaka i mikroba. Na slici su označene kratice auksin-amidohidrolaza, kao i vrste iz kojih su izolirane: At: *Arabidopsis thaliana* (uročnjak); Os: *Oryza sativa* (riža); Ta: *Triticum aestivum* (pšenica); Le: *Lycopersicon esculentum* (rajčica); Mt: *Medicago truncatula* (djetelina); St: *Solanum tuberosum* (krumpir); Gm: *Glycine max* (soja); Gh: *Gossypium hirsutum* (pamuk). Preuzeto iz LeClere i sur. (2002).

1.3 STRES KOD BILJAKA I MEHANIZMI PRILAGODBE

U prirodnom staništu biljke su gotovo stalno izložene različitim biotičkim i abiotičkim čimbenicima stresa. Najčešći abiotički čimbenici koji djeluju nepovoljno na biljke su onečišćenje zraka (povišene koncentracije ozona i sumpornog dioksida), nepovoljne promjene vodnog režima (suša i poplava), previsoki salinitet, previsoke ili preniske temperature i jaki intenzitet svjetla, koji može rezultirati fotoinhibicijom (Buchanan i sur. 2000). Kao univerzalna posljedica izlaganja nepovoljnim okolišnim uvjetima, u biljnim stanicama dolazi do nakupljanja reaktivnih oblika kisika (ROS, *reactive oxygen species*). Najosjetljivije su

tilakoidne membrane u kloroplastima (jer se na njima obavljaju procesi fotosinteze) te membrane mitohondrija (na kojima se događa stanično disanje) u kojima dolazi do brzog prijenosa elektrona s jedne molekule na drugu. Kako ovi procesi često rezultiraju nepotpunom redukcijom kisika ili oksidacijom vode (zbog nedovoljne regulacije ovih procesa ili zbog oslabljene aktivnosti pojedinih enzima izazvane nepovoljnim okolišnim uvjetima), u takvim uvjetima dolazi do nastanka štetnih reaktivnih oblika kisika. Najčešći oblici koji pritom nastaju su singletni kisik ($^1\text{O}_2$), superoksidni radikal ($\text{O}_2^{\cdot-}$), hidroksilni radikal (HO^{\cdot}) i vodikov peroksid (H_2O_2) (Arora i sur. 2002). Reaktivni oblici kisika su izuzetno agresivni te izazivaju oštećenje membrana organela i stanica, nukleinskih kiselina i proteina (Arora i sur. 2002). Najčešće oštećenje membrana koje nastaje kao posljedica djelovanja ROS je lipidna peroksidacija, proces oksidativne degradacije sastavnih dijelova membrana (nezasićenih masnih kiselina, fosfolipida, glikolipida, kolesterola i estera kolesterola).

Kako bi preživjele različite nepovoljne okolišne uvjete, biljke imaju razvijene obrambene sustave, kojima se uspijevaju uspješno obraniti od agresivnih kisikovih radikala. Dva su osnovna načina uklanjanja štetnih kisikovih radikala: enzimski i neenzimski načini (Buchanan i sur. 2000). Neki od enzima uključenih u antioksidacijski odgovor i odgovornih za razgradnju ROS-a redom su:

- 1) Peroksidaze (PPX EC 1.11.1.7) – pripadaju velikoj porodici enzima oksidoreduktaza koje generalno kataliziraju razgradnju H_2O_2 uz nastanak vode. Najčešće su hemoproteini i nalaze se u mnogim staničnim odjeljcima: vakuoli, Golgijevom tijelu, endoplazmatskom retikulumu, mitohondrijima, staničnoj stijenci, kao i u izvanstaničnim prostorima. Imaju veliki broj nespecifičnih supstrata, a jedan od njih je pirogalol koji je korišten u ovom radu (Arora i sur. 2002).
- 2) Askorbat peroksidaza (APX EC 1.11.1.11) – ovaj hemoprotein detoksificira perokside (kao npr H_2O_2) pomoću askorbata u reakciji u kojoj nastaje dehidrogen askorbat. Dio je glutation-askorbatnog ciklusa koji djeluje u citosolu, mitohondrijima, plastidima i peroksisomima (Arora i sur. 2002).
- 3) Katalaza (CAT EC 1.11.1.6) – pripada u hemoproteine i nalazi se u gotovo svim živim organizmima koji su izloženi kisiku gdje razgrađuje vodikov peroksid (H_2O_2) na kisik i vodu; nalazi se u organelima koji se zovu peroksisomi (Arora i sur. 2002).

Neenzimski načini obrane biljaka u stanju oksidacijskog stresa uključuju djelovanje askorbata, β -karotena, glutationa, poliamina, α -tokoferola (vitamin E) te zeaksantina (Buchanan i sur. 2000). Kako je α -tokoferol vezan za membrane, posebno je uspješan u uklanjanju singletnog kisika i lipidnih peroksida. Jako je dobar antioksidans jer je pri fiziološkim uvjetima relativno slab donor elektrona te uglavnom djeluje tako da prenosi atome vodika. Karotenoidi također uklanjaju singletni kisik, dok istovremeno štite tilakoidne membrane od oštećenja prilikom apsorpcije svjetlosne energije u molekulama klorofila (Arora i sur. 2002).

1.3.1 AUKSINI U ODGOVORU BILJAKA NA STRES

Kako je već spomenuto, biljke su tijekom životnog ciklusa često izložene različitim biotičkim i abiotičkim stresnim čimbenicima. Velike količine ROS koje nastaju prilikom stresa, osim što oštećuju membrane i posljedično dovode do smrti stanica, djeluju i tako da potiču različite signalne puteve u stanicama (Tognetti i sur. 2010). Tako je pokazano da visoke koncentracije H_2O_2 u stanici preusmjeravaju signalne odgovore na transkripcijskoj razini, mijenjajući time ukupni metabolizam i staničnu homeostazu (Tognetti i sur. 2010). Prilikom stresnih uvjeta dolazi do jakog međudjelovanja između ROS i hormona, kao što su salicilna kiselina, jasmonska kiselina, apscizinska kiselina, etilen, dušikov oksid i giberelini.

Najbolje opisano djelovanje ROS na metabolizam auksina pokazano je na primjeru vodikovog peroksida, koji djeluje na kaskadu mitogen aktiviranih proteina kinaza (MAPK kinaza). Posljedica djelovanja vodikovog peroksida na ovaj signalni put je smanjena ekspresija gena koji su auksin-inducibilni (Nagakami i sur. 2006; Tognetti i sur. 2010). Osim toga, dokazano je da ROS mijenjaju i smjer polarnog transporta auksina (Pasternak i sur. 2005; Tognetti i sur. 2010), kao i da izazivaju promjenu staničnog pH, što ima za posljedicu promjenu u profilu auksina (Potters i sur. 2007; Tognetti i sur. 2010).

Fenotipske manifestacije izlaganja biljaka stresnim uvjetima najčešće se očituju kroz usporeni rast i metabolizam općenito, vjerojatno zbog premještanja metabolita u cilju preživljavanja stresnih uvjeta (Park i sur. 2007). Park i sur. (2007) pokazali su kako ključnu ulogu u adaptaciji imaju auksini. Način na koji su auksini regulirani nije posve jasan, ali je sigurno da glavnu ulogu ima ukupna razina slobodnih auksina, koja se održava na konstantnoj

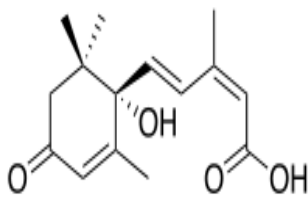
razini. Auksini djeluju tako da reguliraju skupinu gena: *Aux/IAA* gene, *GH3* gene i *small auxin-up RNAs (SAUR)*. Obitelj proteina GH3 najbolje je istražena u ovom kontekstu. Pokazalo se kako dolazi do pojačane aktivacije ovih proteina u stresnim uvjetima, što rezultira konjugacijom auksina te posljedično i smanjenjem koncentracije slobodnih auksina u biljaka.

Adaptacija na oksidacijski stres postiže se i aktivacijom glukoziltransferaze UGT74E2, koja glikozilira indol-3-maslačnu kiselinu (IBA). Pokusi u kojima je napravljena prekomjerna ekspresija enzima UGT74E2 u uročnjaku pokazali su da ove biljke imaju promijenjen profil auksina, što rezultira promijenjenom biljnom arhitekturom i povišenom tolerancijom na stres (Tognetti i sur. 2010).

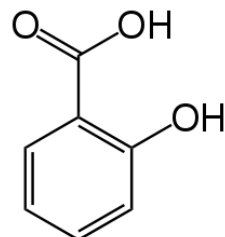
1.3.2 HORMONI STRESA I MEĐUDJELOVANJE S AUKSINIMA

U nepovoljnim uvjetima, bilo da se radi o čimbenicima biotičkog stresa (napad patogena, herbivora i sl.) ili čimbenicima abiotičkog stresa (nepovoljni klimatski uvjeti), biljke obično reagiraju povišenim količinama tzv. hormona stresa. U tu grupu hormona pripadaju apscizinska kiselina (ABA), salicilna kiselina (SA) i jasmonska kiselina (JA) (slika 1.5.).

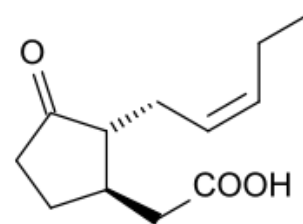
A)



B)



C)

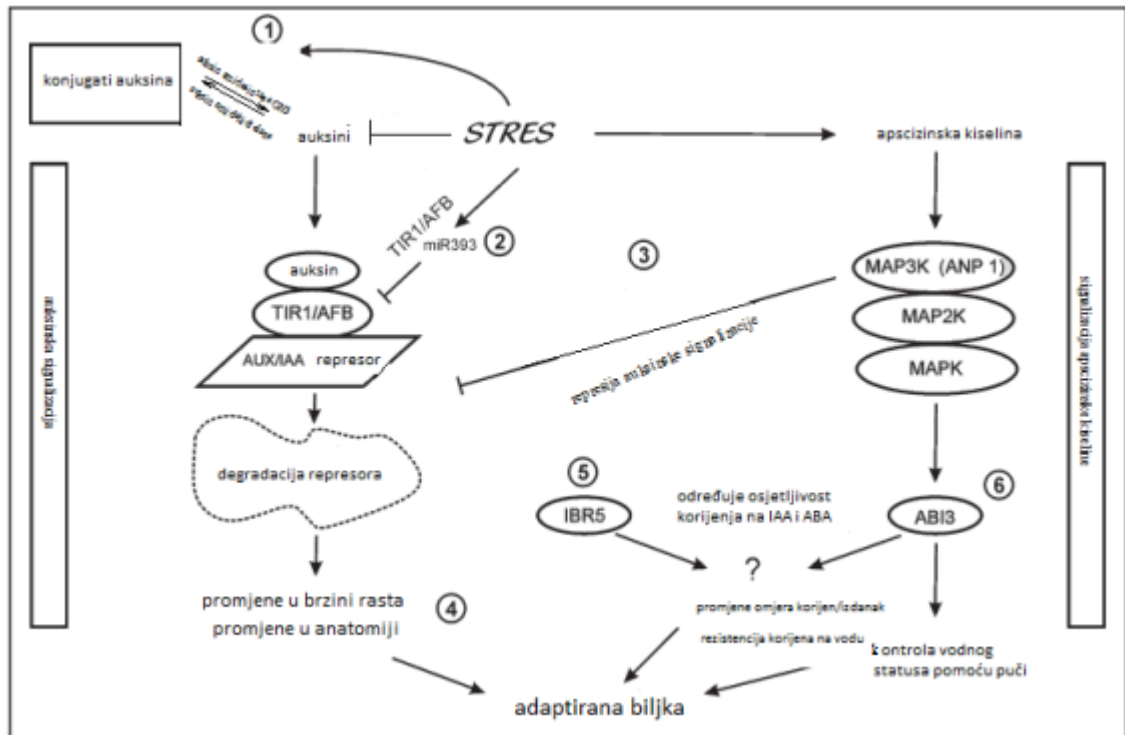


Slika 1.5. Strukture biljnih hormona stresa. A) apscizinska kiselina; B) salicilna kiselina; C) jasmonska kiselina.

1.3.2.1 APSCIZINSKA KISELINA

Apscizinska kiselina je hormon koji djeluje kao endogeni signal u slučaju kad su biljke u nepovoljnim okolišnim uvjetima (suša, visoki salinitet, ekstremne temperature) (Zhu 2002; Popko i sur. 2010). Djelovanje ABA posebno je istaknuto za vrijeme vodnog stresa. U uvjetima suše, koncentracija ABA može se povećati i do 50 puta. Vrlo je djelotvorna u zatvaranju puči i njezino nakupljanje u listovima ima važnu ulogu u smanjivanju gubitka vode transpiracijom. Zatvaranje puči počinje prije povećanja ukupnog sadržaja apscizinske kiseline u listu i smatra se da je uzrokovano preraspodjelom ABA u listu uslijed promjene pH vrijednosti u mezofilu lista izloženog stresu (Pevalek-Kozlina 2002).

Apscizinska kiselina i auksini sudjeluju u regulaciji vodnog statusa biljaka. Njihova uloga u stabljikama je jednaka, dok je u korijenju suprotna. Otkrivena je čitava mreža u kojoj je povezano međudjelovanje ova dva hormona (slika 1.6). Dobro je opisan signalni put apscizinske kiseline u kojeg je uključena kaskada MAPK kinaza (Popko i sur. 2010). Aktivacijom kaskade mitogen aktiviranih protein kinaza dolazi do aktivacije transkripcijskih faktora ABI3 i ABI5. Točka grananja je na mjestu proteina ANP1, kinaze koja djeluje kao aktivator signala apscizinske kiseline, dok istovremeno djeluje represivno na auksinsku signalizaciju. Kao posljedica ovakve signalizacije, dolazi do smanjenog rasta biljke.

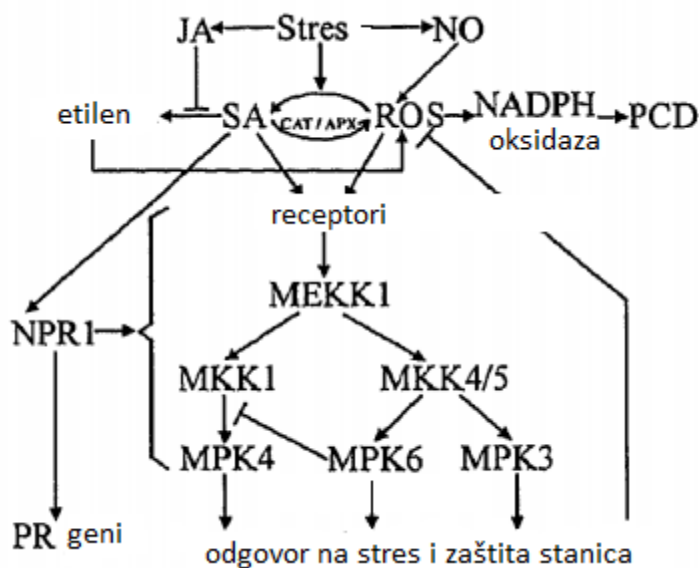


Slika 1.6. Odgovor biljaka na abiotički stres povezivanjem signalnih puteva IAA i ABA. Stresni čimbenici općenito uvjetuju smanjenje razine slobodnih IAA, procesima konjugacije (1). Hladnoća djeluje tako da izaziva smanjenje razine auksinskih receptora te posljedično dovodi i do inhibicije auksina (2). Osmotski stres generalno dovodi do povećanja razine ABA. Spojevi iz signalnog puta ABA povezuju puteve ABA i IAA tako da zaustavljaju aktivnost auksina (3). Smanjena aktivnost auksina, kao i inhibicija signalnih puteva IAA dovode do smanjenja rasta biljke, a kod drvenastih biljaka i do promjena u anatomiji (4). ABI3 i IBR5 su transkripcijski faktori uključeni u signalizaciju ABA i IAA. Preuzeto iz Popko i sur. (2010).

1.3.2.2 SALICILNA KISELINA

Eksperimenti u kojima je proučavana funkcija SA pokazali su da je salicilna kiselina uglavnom uključena u ekspresiju gena koji su vezani uz patogenezu (PR geni; *pathogenesis related*), sistemsku stečenu otpornost i hipersenzitivni odgovor (Juan i Lin 2008). Također je dokazano da je uključena i u odgovore na abiotički stres (Juan i Lin 2008).

Usljed abiotičkog stresa, salicilna kiselina u biljkama djeluje tako da nizvodnom signalizacijom potiče aktivnost antioksidacijskih enzima (katalaza, askorbat peroksidaza, gvajakol peroksidaza, superoksid dismutaza) i proteina HSP (*heat shock proteini*). Međutim, hoće li nastupiti aktivacija obrambenog mehanizma ili naprotiv, programirana stanična smrt, jako ovisi o koncentraciji SA (Juan i Lin 2008). Tako se pokazalo da tretiranjem pšenice i rajčice salicilnom kiselinom u rasponu koncentracija 0,01-0,05 mM dolazi do značajnog povećanja tolerancije na stres, većinom kroz aktivaciju katalaze (Juan i Lin 2008), HSP (proteina „heat shock“) (Juan i Lin 2008) te alternativne oksidaze (Norman i sur. 2004; Juan i Lin 2008). Tretman salicilnom kiselinom u koncentracijama 0,1-0,5 mM rezultirao je povećanjem razine ROS, jer je došlo do inhibicije antioksidacijskih enzima. Pokazalo se da se mehanizmom povratne sprege tada aktiviraju stanični enzimi uključeni u toleranciju na stres (APX, CAT, SOD, AOX, HSP). Ovaj mehanizam pokazuje da SA pri ovim koncentracijama djeluje tako da povećava toleranciju na stres kroz tzv. ROS-ovisni put, a ne SA-ovisni put (Juan i Lin 2008). Naposljetku, tretman biljaka salicilnom kiselinom u koncentracijama većim od 1 mM uglavnom preusmjerava metabolizam stanice prema programiranoj staničnoj smrti. Mehanizam uključuje pozitivnu povratnu spregu između SA i H₂O₂, tj. visoke koncentracije SA potiču stvaranje H₂O₂ nizvodno. SA tada djeluje tako da inhibira enzime kojima se eliminira H₂O₂ iz stanice, a H₂O₂ istovremeno uslijed povišene koncentracije u stanici djeluje tako da dodatno potiče stvaranje SA. Na taj način dolazi do nakupljanja ROS koji se više ne mogu metabolizirati što rezultira staničnom smrću (Juan i Lin 2008). Mehanizam kojim se ostvaruje tolerancija na stresne uvjete preko SA signalnog puta uključuje aktivnost mitogen aktiviranih protein kinaza, kako je prikazano na slici 1.7.



Slika 1.7. Hipotetski model koji prikazuje ulogu ROS i SA u poticanju ekspresije gena uključenih u obranu biljaka u stresnim uvjetima, kao i programiranu staničnu smrt (PCD). Preuzeto iz Juan i Lin (2008).

Poznato je da je salicilna kiselina uključena u imuni odgovor biljaka na napad patogena. Kako bi ispitali molekularnu osnovu SA-ovisne imunologije, napravljeno je istraživanje transkriptoma na modelnoj biljci uročnjaku, koja je egzogeno tretirana analogom salicilne kiseline, benzotiadiazol S-metilesterom (BTH). Rezultati ove studije pokazali su da BTH uzrokuje globalnu represiju auksinskih gena, što za posljedicu ima inhibiciju auksinog odgovora. Osim toga, pokazalo se da BTH aktivira djelovanje dva enzima koji kataliziraju konjugaciju auksina (Woodward i Bartel 2005; Wang i sur. 2007), što ukazuje da BTH mijenja profil auksina u smjeru povećane razine konjugiranih, odnosno smanjene razine slobodnih auksina.

1.3.2.3 JASMONSKA KISELINA

Metilni ester JA prvi puta je izoliran 1962. godine iz esencijalnog ulja biljke *Jasminum grandifolium* (Wasternack 2007). Tek je dva desetljeća kasnije ustanovljena funkcija estera jasmonske kiseline, kao i same jasmonske kiseline. Pokazalo se kako jasmonska kiselina potiče procese starenja te da pripada skupini inhibitora rasta (Wasternack 2007). Biokemijske analize pokazale su da se pod utjecajem jasmonske kiseline aktiviraju tzv. jasmonat-

inducirani proteini (JIP), koji uzrokuju degradaciju nekih važnih gena s konstitutivnom ekspresijom, poput Rubisco-a (Wasternsck 2007).

Jasmonska kiselina, osim toga, ima dokazanu ulogu u sazrijevanju sjemenki, starenju listova, sazrijevanju plodova, razvoju polena te odgovorima na različite biotičke i abiotičke čimbenike, posebno u zacjeljivanju rana i obrani od patogena (Liu i Wang 2006).

Istraživanja o međusobnoj povezanosti djelovanja auksina i jasmonske kiseline su relativno nova i malo toga je poznato. Jedna grupa znanstvenika je primijetila na biljkama iz porodice *Rubiaceae* povišene koncentracije JA nakon tretmana IAA (Liu i Wang 2006). Isto tako, u mutantama koje posjeduju nefunkcionalne auksinske receptore došlo je do smanjenja koncentracije JA, što ukazuje na međusobno sinergističko djelovanje ova dva hormona (Liu i Wang 2006). Liu i Wang (2006) su prvi puta pokazali na uročnjaku da auksini izazivaju inhibiciju biosinteze JA.

1.4 CILJ ISTRAŽIVANJA

Biljni hormoni auksini neophodni su u regulaciji ekspresije gena, diobi i proliferaciji stanica te pri diferencijaciji biljnog tkiva. Auksini se u biljnom tkivu pojavljuju slobodni (aktivne forme) ili konjugirani s aminokiselinama i šećerima (skladišne i transportne forme). Iako precizni mehanizam održavanja homeostaze auksina do danas nije razjašnjen, pretpostavlja se da glavnu ulogu u homeostazi imaju upravo procesi konjugacije (djelovanjem enzima auksin-aminosintetaza) te hidrolize konjugiranih auksina (pomoću enzima auksin-amidohidrolaza).

Nedavna istraživanja su pokazala da u metaboličkoj regulaciji auksina i djelovanju enzima auksin-amidohidrolaza značajnu ulogu imaju hormoni stresa, prvenstveno SA. U okviru tih istraživanja, u ovom radu istraživan je utjecaj hormona stresa na klijance kineskog kupusa, i to na tri razine:

- a) na fiziološkoj razini – izmjerena je inhibicija rasta korijena *in vivo* u klijancima kineskog kupusa (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*) nakon tretmana hormonima stresa: SA, JA I ABA.
- b) na biokemijskoj razini – proučavano je oksidacijsko stanje klijanaca uslijed tretmana hormonima stresa. Oksidacijsko stanje je određeno mjerenjem aktivnosti antioksidacijskih enzima askorbat peroksidaze, katalaze i pirogalol peroksidaze. Osim toga, utvrđena je količina vodikovog peroksida, stopa lipidne peroksidacije i količina ukupnih fenola kao pokazatelja stresa.
- c) na genskoj razini - metodom lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu (Real-time PCR) utvrđena je razina ekspresije transkripta za auksin-amidohidrolazu (BrILL2) u klijancima kineskog kupusa nakon tretmana hormonima stresa u odnosu na netretirane klijance.

2. MATERIJAL I METODE

2.1 MATERIJAL

2.1.1 BILJNI MATERIJAL

Istraživanja predstavljena u ovom radu provedena su na kineskom kupusu (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*) (slika 2.1). Kineski kupus pripada porodici kuspunjača ili krstašica (*Brassicaceae*). Porodica kupusnjača broji više od 3000 vrsta, od kojih su najpoznatije kupus, kelj, cvjetača, brokula, radič i uljana repica. Izuzetno su važne poljoprivredne kulture u Hrvatskoj i šire. U istu porodicu pripada i uročnjak (*Arabidopsis thaliana* L.), biljka koja nema značaj u agronomskom smislu, ali je važna s biološkog stajališta, jer predstavlja jedan od najboljih biljnih modela za proučavanje biljne biologije. Početkom 1990-tih godina počela se koristiti u znanstvenim istraživanjima koja uključuju razvojnu biologiju biljaka, dok je u području genetike, evolucije te populacijske genetike prepoznata još i ranije kao izvrstan model. Neke od osobina uročnjaka koje ga čine dobrim modelnim organizmom su relativno mala veličina genoma (157 milijuna parova baza organiziranih na 5 kromosoma), kratak životni ciklus, jednostavna mogućnost transformacije bakterijama (posebno bakterijama *Agrobacterium tumefaciens*).

Za uzgoj klijanaca kineskog kupusa (*B. rapa* L. ssp. *pekinensis* var. Cantonner Witkrop) koristila sam sjemenke nabavljene od International Seed Processing GmbH, Quedlinburg, Njemačka.



Slika 2.1. Kineski kupus (*B. rapa* L. ssp. *pekinensis*)

2.1.2 PODLOGE ZA UZGOJ I TRETIRANJE KLIJANACA

Za uzgoj klijanaca kineskog kupusa koristila sam podloge koje su sadržavale agar (1%). Podloge su pripravljene u Erlenmeyerovim tikvicama na način da sam agar (Sigma) resuspendirala u dvostruko destiliranoj vodi (mqH_2O) te sterilizirala autoklaviranjem na temperaturi $118^{\circ}C$ i tlaku 1,5 atm u trajanju od 20 minuta. Nakon sterilizacije, u podloge ohlađene na oko $60^{\circ}C$ dodavala sam pojedinačno hormone stresa do koncentracija (mM): 0,0001, 0,001, 0,01 i 0,1. Pri tom su korištene koncentrirane (stock) otopine hormona, prethodno pripravljene i pohranjene na $-20^{\circ}C$. Pripravljene podloge sam zatim razdijelila u sterilne plastične Petrijeve zdjelice (20 mL po zdjelici) i, nakon što se agar polimerizirao, pohranila na $4^{\circ}C$ do upotrebe.

Metalni (pincete) i stakleni (čaše) pribor steriliziran je autoklaviranjem u jednakim uvjetima.

2.1.3 PUFERI I OTOPINE

2.1.3.1 OTOPINE HORMONA STRESA

Za pripremu podloga s različitim koncentracijama hormona stresa korištene su koncentrirane (stock) otopine:

Apscizinska kiselina (ABA) (Sigma)	1 mg/mL
Salicilna kiselina (SA) (Sigma)	100 mM
Jasmonska kiselina (JA) (Sigma)	100 mM

Otopine hormona su sterilizirane koristeći filtre ($0,2 \mu m$) i pohranjene na $-20^{\circ}C$

2.1.3.2 REAGENS ZA ODREĐIVANJE LIPIDNE PEROKSIDACIJE

Tiobarbiturna kiselina (TBA) (Sigma)	0,5% (m/v)
Trikloroctena kiselina (TCA) (Merck)	0,1% (m/v)

2.1.3.3 OTOPINE I REAGENSI ZA ODREĐIVANJE UKUPNIH FENOLA

Galna kiselina (Sigma) (standard za izradu baždarne krivulje)

Metanol (Kemika) 80%

Folin Ciocalteau reagens (FC) (Kemika) 1N

Na₂CO₃ (Kemika) 20%

200 g Na₂CO₃ dodano u 800 mL vode te zagrijano do vrenja. Nakon 24 h otopina je profiltrirana te nadopunjena vodom do 1 L.

2.1.3.4 PUFERI ZA ANALIZU AKTIVNOSTI ANTIOKSIDACIJSKIH ENZIMA**2.1.3.4.1 Pufferi za ekstrakciju proteina**

A) Puffer za ekstrakciju proteina u svrhu određivanja specifične aktivnosti katalaze i pirogalol peroksidaze:

Kalij-fosfatni puffer, 0,1M, pH 7,0:

1 M KH₂PO₄ (Kemika) 1,925 mL

1 M K₂HPO₄ (Kemika) 3,075 mL

mqH₂O do 50 mL

pH je podešen dodatkom 0,2 M KOH (Kemika) i 1 M H₃PO₄ (Kemika) (744 pH Meter, Metrohm). Puffer se čuva na 4°C.

B) Puffer za ekstrakciju proteina u svrhu određivanja specifične aktivnosti askorbat peroksidaze:

Kalij-fosfatni puffer (pH 7,0) 0,1 M

EDTA (Sigma) 1 mM

Askorbinska kiselina (Sigma)	5 mM
------------------------------	------

pH je podešen dodatkom 0,2 M KOH (Kemika) i 1 M H₃PO₄ (Kemika). Pufer se čuva na 4°C.

2.1.3.4.2 Puferi za određivanje specifične aktivnosti antioksidacijskih enzima

A) Pufer za određivanje specifične aktivnosti katalaze (Aebi 1984)

Kalij-fosfatni pufer (50 mM, pH 7,0)	50 mL
H ₂ O ₂ (30% w/v)	51 μL

B) Pufer za određivanje specifične aktivnosti askorbat peroksidaze (Nakano i Asada 1981)

Pufer1:

Kalij-fosfatni pufer (50 mM, pH 7,0)	50 mL
EDTA (10 mM)	500 μL

Neposredno prije mjerenja u Pufer1 se dodaje određeni volumen sljedećih komponenti:

Askorbinska kiselina	(10 mM)
H ₂ O ₂	(12 mM)

C) Pufer za određivanje specifične aktivnosti pirogalol peroksidaze (Chance i Mahley 1955)

Kalij-fosfatni pufer (50 mM, pH 7,0)	50 mL
Pirogalol (Sigma)	0,126 g
H ₂ O ₂ (30% w/v) (Kemika)	5,5 μL

2.1.3.5 REAGENS ZA ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE PROTEINA METODOM PO BRADFORD-U (1976)

Coomassie Brilliant Blue G-250 (Merck)	100 mg/L
Etanol (0,95 v/v, Kemika)	50 mL/L
Fosfatna kiselina (Kemika)	100 mL/L
mqH ₂ O	do 1L

2.1.3.6 OTOPINE ZA ODREĐIVANJE KOLIČINE VODIKOVOG PEROKSIDA

Titanov reagens (O₅STi (H₂SO₄)) (Sigma)

NH₄OH (Kemika)

H₂SO₄ (Kemika) (2M)

2.1.3.7 PUFERI ZA LANČANU REAKCIJU POLIMERAZOM U STVARNOM VREMENU (RT-PCR)

2.1.3.7.1 Sastav otopine detergenta za pranje pribora („RNase free SDS detergent“)

NaOH (Kemika)	0,1 M
EDTA (Sigma)	1mM
SDS (Sigma)	1%

2.1.3.7.2 Sastav pufera za ekstrakciju RNA

CTAB (cetil-3-metil-amonijev bromid) (Sigma)	2%
--	----

2.MATERIJAL I METODE

PVP40 (polivinilpirolidon) (Sigma)	2%
Tris-HCl (pH 8,0)	100 mM
NaCl (Kemika)	2M
Spermidin (Sigma)	3,44 mM
β -merkaptoetanol (Fluka)	2%

2.1.3.7.3 Sastav „SSTE“ pufera

SDS (Sigma)	0,5%
NaCl (Kemika)	1M
Tris-HCl (pH 8,0)	10 mM
EDTA (Sigma)	1mM

2.1.3.7.4 Sastav pufera za reakciju DNaze (10x)

Tris-HCl (pH 8,0)	400 mM
MgCl ₂ (Kemika)	60 mM
CaCl ₂ (Kemika)	10 mM

2.1.3.7.5 Sastav reakcijske smjese za reakciju DNaze

RNA	5 μ g
DNaza (DNase I, RNase free, Roche)	1 U / μ g RNA
Inhibitor ribonukleaza (RNaseOUT, Invitrogen)	1 μ L / 10 μ g RNA

2.MATERIJAL I METODE

10X pufer za reakciju DNaze (2.1.3.7.4.)	1 X
Sterilna mqH ₂ O	do 120 µL

2.1.3.7.6 Pufer za elektroforezu RNA (TBE)

Tris (Sigma)	2,16 g/L
Borna kiselina (Kemika)	1,1 g/L
EDTA (0,5 M, pH 8,0)	0,8 mL
mqH ₂ O	do 1L

2.1.3.7.7 Otopina etidijevog bromida

Etidijev bromid (Sigma) (500 µL/mL)	100 µL
mqH ₂ O	do 100 mL

2.1.3.7.8 Otopine za postupak reverzne transkripcije

Sastav otopine A

RNA	1 µg
Oligo(dT) ₁₂₋₁₈ (0,5 µg/µL, Invitrogen)	1 µL
dNTP mix (10 mM)	1 µL
sterilna mqH ₂ O	do 12,5 µL

Sastav otopine B

5X First-Strand Buffer (Invitrogen)	4 µL
0,1 M DTT (Invitrogen)	2 µL
Inhibitor ribonukleaza (RNaseOUT, 40 U/µL, Invitrogen)	0,5 µL
Superscript II RT (reverzna transkriptaza) (200 U/µL, Invitrogen)	1 µL
Sterilna mqH ₂ O	do 7,5 µL

2.1.3.7.9 Otopine za analizu ekspresije gena metodom „Real-time PCR“

Tablica 2.1. Početnice i sonde korištene za praćenje ekspresije gena

Gen	Početnica F	Početnica R	Sonda	Proizvođač
BrILL2	5'-TGT CTT CTT CTT CTT CCT CTC ACA-3'	5'-TAC TTG ACT CCG ATG ATG TCC A-3'		Eurogentec Deutschlan d GmbH, Njemačka
Cox	5'-CGT CGC ATT CCA GAT TAT CCA-3'	5'-CAA CTA CGG ATA TAT AAG AGC CAA AAC TG-3'	5'- TGC TTA CGC TGG ATG GAA TGC CCT- 3'	Applied Biosystems, USA
18S rRNA	5'- GGACTTGCACGAC TAA-3'	5'- CCGTACGTCAATTG AC-3'	5'- TTCGAACTGA TCAT-3'	Applied Biosystems, USA

Sastav reakcijske smjese za analizu ekspresije gena BrILL2

2X Power SYBR [®] Green PCR Master Mix (Applied Biosystems)	1X
Početnica F	50 nM
Početnica R	50 nM

2.MATERIJAL I METODE

cDNA	100 ng
Sterilna mqH ₂ O	do 20 µL

Sastav reakcijske smjese za analizu ekspresije gena COX (kontrola)

2X TaqMan Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems)	1X
Početnica F	300 nM
Početnica R	300 nM
Sonda	150 nM
cDNA	100 ng
sterilna mqH ₂ O	do 20 µL

Sastav reakcijske smjese za analizu ekspresije gena 18S rRNA (kontrola)

2X TaqMan Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems)	1X
20X smjesa početnica (TaqMan Assay, Applied Biosystems)	1X
20X TaqMan sonda (Applied Biosystems)	1X
cDNA	100 ng
sterilna mqH ₂ O	do 20 µL

2.2 METODE

2.2.1 UZGOJ I TRETIRANJE KLIJANACA KINESKOG KUPUSA

Sjemenke kineskog kupusa su neposredno prije nasađivanja na prethodno pripremljene podloge sterilizirane u 50 mL 3% Izosana G (Pliva) miješanjem na magnetskoj miješalici u trajanju od 10 minuta. Nakon sterilizacije, sjemenke su isprane u sterilnoj mqH₂O (3 puta) te položene na podloge (1% agar) u laminaru (komori s horizontalnim strujanjem sterilnog zraka). Pri polaganju sjemenki na podloge metalni pribor je dodatno steriliziran uranjanjem u 96%-tni etanol (Kemika) i spaljivanjem.

Petrijeve posude sa sjemenkama položenim na površinu podloge inkubirane su preko noći na 4°C da bi sjemenke ravnomjerno nabubrile. Sljedeći dan posudice su premještene u komoru za uzgoj biljaka u uvjete kontinuiranog svjetla, pri temperaturi 22°C, u trajanju od 24 sata. Petrijeve zdjelice sam vertikalno postavila u nosače kako bi se korijen klijanaca nesmetano razvijao na površini podloge. Sjemenke su u ovom razdoblju proklijale i klijanci veličine oko 1 cm presađeni su na podloge s dodatkom hormona stresa. Kao kontrole korišteni su klijanci presađeni na podlogu (1%-tni agar) bez dodatka hormona. Posađeno je oko 10 klijanaca u jednu zdjelicu raspoređenih u jednom redu. Zdjelice s klijancima potom su inkubirane sljedeća 24 sata, pri temperaturi od 22°C i u uvjetima kontinuiranog svjetla. Pri tom sam pazila da zdjelice postavim vertikalno u položaj s korijenom klijanaca prema dolje. Po uzgoju, tkivo je korišteno svježe za određivanje morfoloških parametara ili je smrznuto u tekućem dušiku i pohranjeno na -80°C za određivanje različitih biokemijskih parametara opisanih u sljedećim poglavljima.

2.2.2 INHIBICIJA RASTA KORIJENA USLIJED TRETMANA HORMONIMA STRESA

Utjecaj hormona stresa na rast korijena određen je tako da su klijanci, neposredno po tretmanu s hormonima stresa (tj. nakon 24h tretmana) fotografirani. Mjerenjem razlike u duljini korijena tretiranih i kontrolnih klijanaca prije i nakon pokusa odredila sam prirast duljine korijena. Koristeći vrijednosti prirasta duljine korijena napravljene su krivulje rasta

korijena uslijed tretmana rastućim koncentracijama hormona stresa (0-1 mM) te izračunate vrijednosti inhibicije rasta korijena za svaki pojedini tretman (%).

2.2.3 ODREĐIVANJE LIPIDNE PEROKSIDACIJE I UKUPNIH FENOLA

2.2.3.1 PRIPREMA EKSTRAKTA ZA ODREĐIVANJE LIPIDNE PEROKSIDACIJE I UKUPNIH FENOLA

Biljno tkivo usitnjeno je u tarioniku u prah uz pomoć tekućeg dušika. Po 100 mg usitnjenog tkiva odvagano je na analitičkoj vagi u plastične tubice (Eppendorf) od 2 mL te je dodan 1 mL 80%-tnog metanola (Kemika). Uzorci su inkubirani na rotacijskoj miješalici dva sata na sobnoj temperaturi te pola sata u ultrazvučnoj kupelji (Iskra, Zagreb). Da bi se odijelio supernatant (ekstrakt) od taloga, uzorke sam centrifugirala 10 min na 10 000 rpm na sobnoj temperaturi (centrifuga Eppendorf 5415 R). Supernatant je odvojen u nove tubice dekantiranjem te je korišten za određivanje ukupnih fenola i lipidne peroksidacije.

2.2.3.2 MJERENJE LIPIDNE PEROKSIDACIJE

Lipidni peroksidi, nastali kao posljedica oksidacijskog stresa, tijekom zagrijavanja kisele reakcijske smjese se raspadaju te pri tome nastaje malondialdehid (MDA) koji reagira s tiobarbiturnom kiselinom, a nastalo crveno obojenje mjeri se spektrofotometrijski. Za određivanje MDA u klijancima kineskog kupusa korištena je modificirana metoda prema Heath i Packer (1968). U plastičnu tubicu dodano je redom 400 μ L biljnog ekstrakta, 400 μ L destilirane vode te 400 μ L reagensa za lipidnu peroksidaciju (točka 2.1.3.2). Smjesa je zagrijavana 30 minuta na 95°C u termobloku (Eppendorf). Nakon 30 min reakcijsku smjesu sam naglo ohladila na ledu i centrifugirala 15 minuta, pri 10 000 rpm, 4°C (Eppendorf 5415 R). Supernatant sam odvojila u kivete i izmjerila apsorbanciju uzoraka pri 532 i 600 nm (spektrofotometar Biospec 1601-Shimadzu). Količinu malondialdehida izračunala sam koristeći Beer-Lambertov zakon, na temelju ekstinkcijskog koeficijenta koji iznosi 155 mM⁻¹ cm⁻¹ i izrazila u nmol/g_{svježe tvari}:

Jednadžba Beer-Lambertovog zakona: $A = c \times l \times \epsilon$

Iz ove jednadžbe može se izraziti koncentracija:

$$c = (A_{532-600} / (l \times \varepsilon)) / m_{\text{svježe tvari}} \quad [\text{nmol/g}_{\text{svježe tvari}}]$$

$A_{(532-600)}$ = razlika apsorbancija mjerenih pri 532 nm i 600 nm

l = duljina optičkog puta (1cm)

ε = ekstinkcijski koeficijent ($155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)

$m_{\text{svježeg tkiva}}$ = masa svježeg tkiva (g)

2.2.3.3 MJERENJE UKUPNIH FENOLA

Za određivanje ukupnih fenola u biljnim uzorcima korištena je metoda koja se bazira na reakciji Folin-Ciocalteu (FC) reagensa (kompleks fosfomolibdene/fosfovolframne kiseline) s reducirajućim agensom (fenolnim spojem/antioksidansom) pri čemu dolazi do pojave plave boje (Singleton i Rossi 1965). Kao standard najčešće se koristi galna kiselina te se iz baždarne krivulje **A vs. c** (g/L galna kiselina), konstruirane za standard, određuje količina ukupnih fenola u uzorku. Rezultati su izraženi u mg GAE/g svježe tvari.

Za izradu baždarne krivulje pripremljene su otopine galne kiseline koncentracija 0, 50, 100, 150, 250 i 500 mg/L u 80% metanolu. U kivete od 2 mL je dodano 20 μL otopine galne kiseline, 1,58 mL destilirane vode, 100 μL FC reagensa te 300 μL zasićene otopine natrijevog bikarbonata (točka 2.1.3.3.). Za slijepu probu, umjesto otopine galne kiseline, u smjesu je dodan 80% metanol. Otopina je promiješana te je nakon inkubacije 2 sata na sobnoj temperaturi izmjerena apsorbancija standarda pri valnoj duljini 765 nm. Kreiran je pravac ovisnosti c (mg/L GAE) (x) vs. A (y) koji je korišten za određivanje ukupnih fenola u tkivu kljanaca kupusa.

Za određivanje ukupnih fenola u biljnim ekstraktima u kivete od 2 mL dodani su reagensi kako je navedeno za baždarnu krivulju, no umjesto otopina galne kiseline dodano je po 20 μL biljnih ekstrakata. Nakon inkubacije od 2 h izmjerena je apsorbancija na 765 nm te

je očitavanje apsorbancije bilo proporcionalno intenzitetu proizašle plave boje i koncentraciji ukupnih fenola koji su izraženi kao ekvivalent galne kiseline.

2.2.4 AKTIVNOST ANTIOKSIDACIJSKIH ENZIMA

2.2.4.1 PRIPREMA EKSTRAKTA

Biljno tkivo uzgojeno na način prikazan u točki 2.2.1. je izvagano je (0,5 g) i pohranjeno na -80°C . Za određivanje aktivnosti katalaze i pirogolol peroksidaze tkivo je homogenizirano u ohlađenom tarioniku u 2 mL ohlađenog ekstrakcijskog pufera. Za određivanje aktivnosti aksorbat perkosidaze tkivo je homogenizirano na isti način, osim što je ekstrakcijski pufer dodatno sadržavao EDTA i askorbinsku kiselinu (sastav ekstrakcijskih pufera, točka 2.1.3.4.1). Prije početka ekstrakcije na biljno tkivo sam dodala malu količinu polivinilpirolidona (PVP40, Sigma). Dobiveni homogenat centrifugirala sam 20 minuta na 13 200 rpm, pri 4°C (Eppendorf 5415 R). Supernatant je premješten u čiste tubice, te je, zbog kvalitetnijeg pročišćavanja, postupak centrifugiranja ponovljen dodatnih 60 minuta. Supernatant sam pohranila na -20°C i kasnije ga koristila u mjerenjima.

2.2.4.2 ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE PROTEINA METODOM PO BRADFORD-U (1976)

Metoda određivanja koncentracije proteina po Bradford-u (1976) je standardna metoda koja se temelji na spektrofotometrijskom mjerenju apsorbancije boje „Coomassie brilliant blue“ koja se veže na proteine u uzorku, pri čemu se njen maksimum apsorpcije bilježi pri valnoj duljini 595 nm. Količina proteina u ekstraktu određuje se uz pomoć baždarne krivulje napravljene na osnovu mjerenja poznatih koncentracija proteinskog standarda. Za baždarnu krivulju koristila sam otopine goveđeg serum albumina (Sigma) u rasponu koncentracija od $0,95\ \mu\text{g}/\mu\text{L}$ do $23,81\ \mu\text{g}/\mu\text{L}$. Otopine standarda ($10\ \mu\text{L}$) miješala sam s reagensom po Bradford-u ($200\ \mu\text{L}$) (sastav reagensa, točka 2.1.3.5.) te nakon inkubacije od 30 minuta mjerila apsorbancije pri valnoj duljini 595 nm (uređaj Labsystems Multiscan MS). Slijepa proba je

umjesto proteinskog ekstrakta sadržavala isti volumen mqH₂O. Na isti način mjerila sam apsorbancije u uzorcima. Mjerenja sam izvodila u tri replike radi preciznije statistike.

2.2.4.3 ODREĐIVANJE AKTIVNOSTI KATALAZE

Za određivanje aktivnosti antioksidacijskog enzima katalaze koristila sam metodu koja se zasniva na spektrofotometrijskom mjerenju pada apsorbancije uzoraka svakih deset sekundi kroz vremenski period od 1 minute. U 950 μL pufera za mjerenje specifične aktivnosti katalaze (2.1.3.4.2) dodavala sam 50 μL biljnog ekstrakta. Apsorbanciju uzoraka mjerila sam pri valnoj duljini od 240 nm koristeći uređaj Biospec-1601 Shimadzu. Aktivnost katalaze izračunala sam koristeći ekstinkcijski koeficijent definiran prema Aebi (1984): 40 mM⁻¹ cm⁻¹, prema sljedećoj formuli:

$$dA/\text{min} = dc/\text{min} \times \varepsilon \times l$$

dA/min = izmjerena promjena apsorbancije uzorka u zadanom mjerenju vremena

dc/min = promjena nepoznate koncentracije supstrata u zadanom mjerenju vremena

l = duljina optičkog puta (1cm)

ε = ekstinkcijski koeficijent (40 mM⁻¹ cm⁻¹).

Izmjenom formule Beer-Lambertovog zakona može se izraziti aktivnost enzima:

$$dc/\text{min} = (dA/\text{min} \times V_{\text{uk.}} \times \text{F.R.}) / (V_{\text{uz.}} \times l \times \varepsilon) \quad [\text{mM min}^{-1}]$$

$V_{\text{uk.}}$ = ukupni volumen reakcijske smjese

$V_{\text{uz.}}$ = volumen uzorka

F.R. = faktor razrjeđenja uzorka.

Specifična aktivnost enzima podrazumijeva aktivnost enzima izraženu po koncentraciji proteina u uzorku:

$$c_{s.a.} = (dA/\text{min} \times 1/l \times 1/\epsilon) / \gamma \quad [\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}]$$

$c_{s.a.}$ = specifična aktivnost enzima

γ = masena koncentracija proteina u uzorku izmjerena metodom po Bradford-u (izražena u mg/mL).

2.2.4.4 ODREĐIVANJE AKTIVNOSTI ASKORBAT PEROKSIDAZE

Aktivnost askorbat peroksidaze odredila sam metodom po Nakanu i Asadi (1981) koristeći pufer za mjerenje (definiran u točki 2.1.3.4.2.). U 800 μL Pufera 1 dodaje se 180 μL biljnog ekstrakta, 10 μL prethodno pripremljene askorbinske kiseline (10 mM) i 10 μL H_2O_2 (12 mM).

Aktivnost askorbat peroksidaze izrazila sam kao smanjivanje količine askorbata, tj. kao pad apsorbancije svake sekunde u vremenskom rasponu od 60 sekundi pri valnoj duljini od 290 nm (Biospec – 1601 Shimadzu). Aktivnost askorbat peroksidaze izračunata je na jednak način kao i aktivnost katalaze, uz odgovarajući ekstinkcijski koeficijent ($2,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

2.2.4.5 ODREĐIVANJE AKTIVNOSTI PIROGALOL PEROKSIDAZE

Za određivanje aktivnosti pirogalol peroksidaze korištena je metoda prema Chance i Mahley (1955). U 980 μL prethodno pripremljenog pufera za mjerenje aktivnosti pirogalol peroksidaze (točka 2.1.3.4.2.) dodano je po 20 μL biljnog ekstrakta te je mjeren porast apsorbancije u uzorku pri valnoj duljini 430 nm (svakih 15 sekundi u vremenskom periodu od 150 sekundi) (uređaj Biospec 1601 Shimadzu). Ekstinkcijski koeficijent upotrijebljen za određivanje aktivnosti pirogalol peroksidaze iznosi $2,47 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, dok se specifična aktivnost pirogalol peroksidaze računa na jednak način kao i aktivnost katalaze (prikazano u točki 2.2.4.3).

2.2.5 ODREĐIVANJE KOLIČINE VODIKOVOG PEROKSIDA

Količinu vodikovog peroksida odredila sam posredno, mjerenjem količine kompleksa titan-peroksida koji se taloži kada se biljnom ekstraktu doda titanov reagens i amonijev hidroksid (Mukherjee i Choudhuri 1983).

Smrznuto tkivo (500 mg) homogenizirala sam na ledu uz dodatak 1 mL ledenog acetona (-20°C). Homogenat sam centrifugirala 3 minute na 3 000 rpm, pri 4°C. U supernatant dobiven centrifugiranjem u prethodnom koraku dodano je 400 µL TiSO₄ i 500 µL NH₄OH. Postupak se izvodi u digestoru na ledu. Nakon miješanja uzorci su centrifugirani 10 minuta na 9 700 rpm, pri 4°C. Supernatant sam uklonila, a na talog sam dodala 1 mL 2 M H₂SO₄ (Kemika) te sam uzorke taloga otapala u ultrazvučnoj kupelji 10 minuta. Pripremljenim uzorcima sam mjerila apsorbanciju na valnoj duljini od 415 nm. Kao slijepu probu koristila sam 1 mL acetona.. Koncentracija H₂O₂ računa se prema formuli koja se zasniva na Beer-Lambertovom zakonu uz korištenje ekstinkcijskog koeficijenta (1,878 mM⁻¹ cm⁻¹):

$$c(\text{H}_2\text{O}_2) = A \times V_{r.s.} \times F.R. / V_{uz.} \times \varepsilon \times l \quad [\mu\text{M}/\text{mL}]$$

A = apsorbancija izmjerena pri λ=415 nm

V_{r.s.} = volumen reakcijske smjese (1mL)

F.R. = faktor razrjeđenja (1)

V_{uz.} = volumen uzorka (1mL)

ε = ekstinkcijski koeficijent (1,878 mM⁻¹cm⁻¹)

l = duljina optičkog puta (1cm)

Iz ove formule izvodi se formula za izražavanje količine vodikovog peroksida po gramu svježeg tkiva:

$$\text{H}_2\text{O}_2 = [\text{H}_2\text{O}_2] \times 1000 / (m / V) \quad [\text{nM} / \text{g}_{\text{svježeg tkiva}}]$$

m = masa svježeg tkiva (0,5g)

V = volumen acetona (1mL)

2.2.6 ODREĐIVANJE EKSPRESIJE GENA *BrILL2* METODOM LANČANE REAKCIJE POLIMERAZE U STVARNOM VREMENU (RT-PCR)

2.2.6.1 IZOLACIJA RNA

Sav pribor potreban za izolaciju i analizu molekula RNA temeljito je ispran u detergentu bez prisutnosti RNaza („*RNase free detergent*“, 2.1.3.7.1.), kako bi se smanjila razgradnja RNA sveprisutnim enzimima RNazama.

Izolaciju RNA iz biljnog materijala provela sam metodom po Chang-u (Chang i sur. 1993). Tkivo koje sam prethodno uzgojila kako je opisano u 2.2.1. i smrznula na -80°C homogenizirala sam uz dodatak tekućeg dušika te dodala u pufer za ekstrakciju RNA prethodno zagrijan na 65°C (na 1 g tkiva sam dodala 5 mL ekstrakcijskog pufera, sastav definiran u točki 2.1.3.7.2.). Nakon inkubacije (5 minuta) u otopinu sam dodala jednaki volumen otopine kloroform:izoamlni alkohol (24:1, Kemika) radi pročišćavanja RNA. Uzorke sam potom centrifugirala 20 minuta na 8 400 rpm, pri 4°C (Multifuge 3_{S-R}, Heraeus). Postupak pročišćavanja sam ponovila još jednom. U supernatante sam dodala pola volumena 8 M LiCl (Kemika). Otopine sam promiješala i inkubirala preko noći na temperaturi 4°C .

Idućeg dana uzorci su centrifugirani 25 minuta na 8 500 rpm, pri 4°C (Multifuge 3_{S-R}, Heraeus). Taloge dobivene centrifugiranjem otopila sam u 500 μL pufera „*SSTE*“ (sastav prikazan u točki 2.1.3.7.3) te sam u otopine dodala jedan volumen otopine kloroform:izoamilni alkohol. Otopine sam centrifugirala (15 min, 10 000 rpm, 4°C). U supernatantu je ostala izolirana RNA, koju sam istaložila dodatkom dva volumena 96%-tnog etanola (EtOH) (Kemika). Uzorke sam potom centrifugirala 30 minuta na 13 000 rpm, pri 4°C . Talog sam isprala u 70%-tnom EtOH te centrifugirala 10 minuta na 13 000 rpm, pri 4°C . Uzorke sam osušila u eksikatoru. Suhe taloge sam resuspendirala u sterilnoj mqH₂O te sam izmjerila koncentraciju RNA u uzorcima koristeći uređaj „nanodrop“ (Biospecnano, Schimatzu). Uzorci RNA pohranjeni su u zamrzivač na -80°C do daljnjih analiza.

2.2.6.2 UKLANJANJE DNA IZ OTOPINA RNA DJELOVANJEM ENZIMA DNAZE

Kako bi se uklonila mogućnost eventualne kontaminacije uzoraka molekulama DNA, uzorke RNA tretirala sam enzimom DNaza (Dnase I, Rnase free, Roche). Tretman je proveden u reakcijskoj smjesi uz odgovarajući pufer (točke 2.1.3.7.4. i 2.3.7.5). Otopine su inkubirane 20 minuta na 37°C, a reakciju sam zaustavila dodatkom EDTA (konačna koncentracija 8 mM, Sigma) i dodatnom inkubacijom 10 minuta na 75°C.

2.2.6.3 PROVJERA USPJEŠNOSTI IZOLACIJE RNA ELEKTROFOREZOM U AGAROZNOM GELU

Kako bih provjerila uspješnost izolacije molekula RNA iz biljnog tkiva, provela sam postupak elektroforeze u agaroznom gelu (1%). Gel elektroforeza je najčešće korištena elektroforetska tehnika za kvalitativnu i kvantitativnu analizu molekula nukleinskih kiselina. Gel čini trodimenzionalnu umreženu strukturu s veličinom pora definiranih molekularnih dimenzija. Razdjeljivanje molekula u gelu vrši se na osnovu elektroforetske pokretljivosti i veličine molekula (molekularne mase). Molekule putuju kroz gel određenom brzinom definiranom njihovom pokretljivošću prema suprotno nabijenoj elektrodi, pronalazeći put kroz mrežu određenih veličina pora. Kako u tom kretanju nailaze na otpor okolnog medija (gela) s obzirom na svoju veličinu, veće molekule putuju relativno sporije od manjih. Agarozni gelovi koriste se za razdvajanje velikih biomolekula molekularne mase 200000 Da i više, što odgovara veličini pora iznad 10 nm u promjeru. Veličina pora ovih gelova definirana je postotnim udjelom agaroze u vodenoj otopini odgovarajućeg pufera. Najčešće korišteni agarozni gelovi sadrže 0,16-1 % agaroze u svom sastavu što odgovara veličini pora od 150 -500 nm u promjeru.

Za pripremu gela koristila sam 100 mL 1%-tne agaroze (Sigma) u 1X TBE puferu (sastav prikazan u točki 2.1.3.7.6). Prije nanošenja u jažice gela, uzorku RNA (1 µL) dodala sam 1 µL pufera za nanošenje (*loading buffer*, Fermentas) i 4 µL sterilne mqH₂O. Kao kontrolu sam koristila uzorak koji nije tretiran DNazom (uzorak na kojem se očekuje vrpca koja odgovara molekulama DNA). Elektroforezu sam provodila u puferu za elektroforezu (1XTBE) u trajanju 40 minuta pri 100 V koristeći uređaj Embi Tec (*Run One Electrophoresis Cell*).

Gel sam potom bojala u otopini etidijevog bromida (sastav u točki 2.1.3.7.7), 5 minuta, isprala u mqH_2O te analizirala uporabom instrumenta G Box (Syngene).

2.2.6.4 OBRNUTO PREPISIVANJE (REVERZNA TRANSKRIPCIJA)

Reverzna transkripcija je proces u kojem se pomoću RNA-ovisne DNA polimeraze jednolančane molekule RNA prevode u jednolančane DNA, tzv. cDNA. Nakon toga je moguće umnažati molekule DNA lančanom reakcijom polimerazom (PCR, *polymerase chain reaction*). U postupku reverzne transkripcije uzorak RNA (1 μg) dodala sam u otopinu A (ukupnog volumena 12,5 μL) te inkubiran 5 minuta na 70°C (u vodenoj kupelji). Uzorke sam potom premjestila na led te pomiješala s otopinom B (7,5 μL). Sastav otopina A i B opisan je u točki 2.1.3.7.8. Smjesu sam inkubirala 60 minuta na 42°C. Reakciju reverzne transkripcije zaustavila sam zagrijavanjem 15 minuta na 70°C.

2.2.6.5 ANALIZA EKSPRESIJE GENA BRILL2 METODOM „REAL-TIME PCR“

Klasičnom metodom lančane reakcije polimerazom (PCR) nastali produkti umnažanja DNA detektiraju se isključivo u posljednjoj fazi tzv. *end-point* ili "plato" fazi reakcije PCR. Mjerenjem kinetike reakcije kontinuiranom analizom PCR produkata u ranoj eksponencijalnoj fazi, ostvareno je preciznije određivanje količine. Razvojem tehnike lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu (real-time PCR) ili kvantitativni RT-PCR (quantitative RT-PCR, qRT PCR, qPCR), količina nastalih specifičnih mRNA, odnosno cDNA molekula, analizirana je tijekom eksponencijalne faze. Metoda se odlikuje specifičnošću i osjetljivošću reakcije, točnošću i ponovljivošću rezultata pri čemu su dovoljne vrlo male količine početnog materijala. Uspješnost qRT-PCR metode temelji se na praćenju cjelokupnog umnažanja DNA u skladu s detekcijom fluorescencijskog signala u stvarnom vremenu. Intekalirajuće boje, poput SYBR Green, fluoresciraju prilikom vezanja na dvolančanu DNA te se koriste za obilježavanje produkata qRT-PCR reakcije, kako bi se lakše analizirali tijekom nastajanja. Količina nastale fluorescencije proporcionalna je porastu broja kopija DNA. Danas je sve češće u upotrebi metoda TaqMan u analizi ekspresije gena. Metoda se zasniva na korištenju neobilježenih specifičnih početnica (P1 i P2) te specifične obilježene sonde TaqMan (P3), odnosno fluorescencijskog oligonuleotida komplementarnog genu od interesa. Tijekom PCR reakcije, sonda TaqMan, koju čine visokoenergetska molekula

izvjestitelj (reporter) na 5'-kraju sonde obilježena bojom 6-FAM i niskoenergetska molekula nefluorescencijski hvatač (NPQ) na 3'-kraju sonde, pocijepa se 5'-egzonukleaznom aktivnošću polimeraze AmpliTaq Gold DNA. Cijepanjem sonde, izvjestitelj i hvatač se udalje, što rezultira pojačanom fluorescencijom izvjestitelja, pri čemu se nakupljanje PCR produkata detektira upravo promatranjem povećanja fluorescencije izvjestitelja. Detekcija i određivanje količine kopija ciljnih gena provodi se kombinacijom aktivnosti FRET-a (*Förster resonance energy transfer*) i AmpliTaq Gold polimeraze pri čemu uređaj „Sequence Detection Software 7300 Real-time PCR“ zaprima porast signala izvjestitelja proporcionalnog količini umnoženog PCR produkta. Kada se fluorescencijski signal izvjestitelja poveća do prepoznatljive i mjerljive razine, prikazuje se grafički krivuljom umnažanja, kojom je porast fluorescencije prikazan u ovisnosti o broju PCR ciklusa.

Kvantitativna sinteza PCR produkata gena BrILL2 iz cDNA predložka provedena je primjenom otopine Power SYBR[®] Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), koja sadrži sljedeće komponente: boju SYBR[®] Green I, DNA polimerazu AmpliTaq Gold[®], deoksiribonukleotid trifosfate (dNTP), pasivnu referencu za normalizaciju qRT-PCR (ROX) te pufer. Reakcijska smjesa za ekspresiju gena sadržavala je pored otopine „Power SYBR[®] Green PCR Master Mix“, 1 µg cDNA i specifične početnice preuzete od Schuller i Ludwig-Müller (2006) (nukleotidni slijed početnica prikazan je u točki 2.1.3.7.9.). Kao kontrole za ekspresiju gena koristila sam dva gena koji se konstitutivno ekspimiraju (*housekeeping* gena): citokrom oksidazu (COX) označenu fluorescirajućom bojom FAM te 18S rRNA označenu fluorescirajućom bojom VIC (Applied Biosystems). Kvantitativna sinteza PCR produkata endogenih kontrola provedena je primjenom kemije TaqMan; za citokrom oksidazu su upotrijebljene početnice opisane u radu Weeler i sur. 2002, dok su za 18S rRNA opisane u protokolu TaqMan (Eucaryotic 18S rRNA TaqMan endogenous control, Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA). (Nukleotidni slijed početnica prikazan je u točki 2.1.3.7.9)

Razinu ekspresije gena 18S rRNA, COX te BrILL2 provjerila sam u jednom nezavisnom uzorku, u duplikatu, lančanom reakcijom polimerazom. Uzorke sam rasporedila na PCR pločicu kako je prikazano u tablici 2.2.

Tablica 2.2. Raspored uzoraka na PCR pločici.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
B	JA 100X	JA 100X	JA 1000X	JA 1000X	JA 10X	JA 10X	JA 100X	JA 100X	JA 10X	JA 10X	JA 50X	JA 50X
A	K 100X	K 100X	K 1000X	K 1000X	K 10X	K 10X	K 100X	K 100X	K 10X	K 10X	K 50X	K 50X
C	SA 100X	SA 100X	SA 1000X	SA 1000X	SA 10X	SA 10X	SA 100 X	SA 100X	SA 10X	SA 10X	SA 50X	SA 50X
D	ABA 100X	ABA 100X	ABA 1000X	ABA 1000X	ABA 10X	ABA 10X	ABA 100X	ABA 100X	ABA 10X	ABA 10X	ABA 50X	ABA 50X
E	K 10000X	K 10000X	JA 10000X	JA 10000X	SA 10000X	SA 10000X	ABA 10000X	ABA 10000X				
F	ST. 10X	ST. 10X	ST. 100X	ST. 100X	ST. 10X	ST. 10X	ST. 50X	ST. 50X	ST. 10X	ST. 10X	ST. 50X	ST. 50X
G	ST. 1000X	ST. 1000X	ST. 5000X	ST. 5000X	ST. 100X	ST. 100X	ST. 500X	ST. 500X	ST. 100X	ST. 100X	ST. 500X	ST. 500X
H	ST. 10000X	ST. 10000X	NTC	NTC	ST. 1000X	ST. 1000X	NTC	NTC	ST. 1000X	ST. 1000X	NTC	NTC
	18S rRNA				COX				BrILL2			

Uzorke sam dodala u jažice PCR pločica (Applied Biosystems) i kratko centrifugirala. Proces ekspresije gena provodila sam u uređaju 7300 Real-time PCR System, koristeći program *Standard mode thermal cycling conditions* (tablica 2.3). Prethodno sam odredila položaj pojedinih reakcija u uređaju, definirala boje koje se koriste u reakciji, uvjete reakcije i volumen otopine. Na kraju PCR ciklusa, pri 60°C očitavala sam fluorescenciju.

Tablica 2.3. Uvjeti PCR reakcije.

Uvjeti PCR reakcije	Aktivacija	Denaturacija	Sparivanje početnica i produljivanje lanca DNA (40 ciklusa)		Kraj reakcije
Vrijeme	2 minute	10 minuta	15 sekundi	1 minuta	
Temperatura	50°C	95°C	95°C	60°C	4°C

Broj kopija transkripta za auksin amidohidrolazu BrILL2 određen je primjenom matematičkog modela opisanog u Pfaffl i suradnici (2001). Metoda računanja se zasniva na relativnoj kvantifikaciji ciljnog gena (BrILL2) u usporedbi s jednim referentnim genom (endogenom kontrolom). Međutim, kako je radi što preciznijih i vjerodostojnijih izračuna bolja uporaba više referentnih gena, upotrijebljena je modificirana formula opisana u Hellemans i sur. (2007):

$$\text{relativni omjer ekspresije} = \frac{E_{BrILL2}^{\Delta Ct_{BrILL2}}}{\sqrt{E_{COX}^{\Delta Ct_{COX}} \times E_{18S}^{\Delta Ct_{18S}}}}$$

E_{BrILL2} = učinkovitost „real-time PCR“ sinteze transkripta ciljnog gena

E_{COX} = učinkovitost „real-time PCR“ sinteze transkripta endogene kontrole COX

E_{18S} = učinkovitost „real-time PCR“ sinteze transkripta endogene kontrole 18S rRNA

ΔCt_{BrILL2} = granična vrijednost ciklusa za ciljni gen (PCR ciklus u kojem je prvi put primijećena amplifikacija ciljnog gena)

ΔCt_{COX} = granična vrijednost ciklusa za endogenu kontrolu COX

ΔCt_{18S} = granična vrijednost ciklusa za endogenu kontrolu 18S rRNA.

Učinkovitost „real-time PCR“ sinteze ciljnog gena, kao i endogenih kontrola, računa se prema jednadžbi definiranoj u Pfaffl i suradnici (2001) gdje se vrijednost nagiba očitava iz standardne krivulje “real-time PCR”-a:

$$E = 10^{\left[\frac{1}{\text{nagib}} \right]}$$

Standardnu krivulju napravila sam za svaki gen očitanjem graničnih vrijednosti ciklusa za niz serijskih razrjeđenja smjese cDNA svih uzoraka u rasponu od 100 ng - 0,01 ng cDNA.

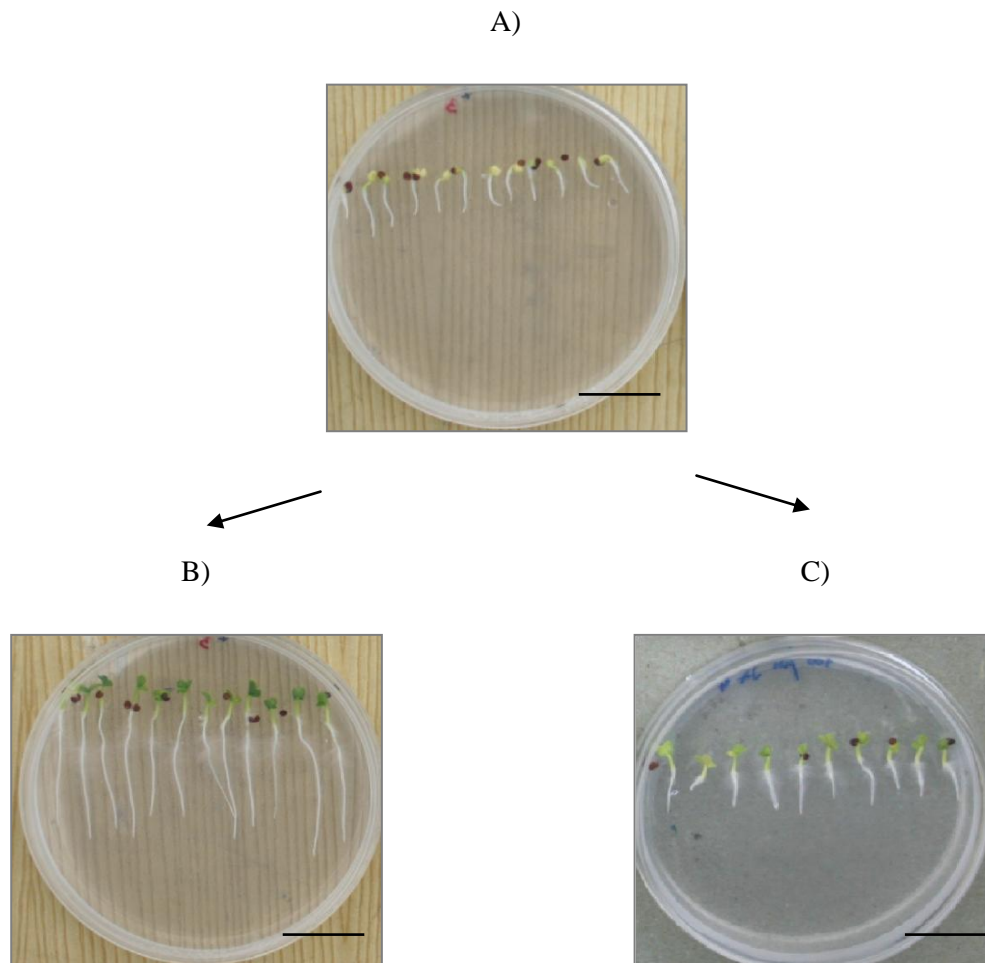
2.2.7 STATISTIČKA OBRADA

Rezultate mjerenja relativnog prirasta korijena prikazala sam kao srednju vrijednost četiri replike \pm standardna pogreška. Specifičnu aktivnost antioksidacijskih enzima katalaze, askorbat peroksidaze i pirogalol peroksidaze, količinu vodikovog peroksida, stopu lipidne peroksidacije te količinu ukupnih fenola izrazila sam kao srednju vrijednost tri replike \pm standardna pogreška. Usporedbu pojedinog tretmana s kontrolom provela sam pomoću PAST programa (Hammer i sur. 2001)

3. REZULTATI

3.1 INHIBICIJA RASTA KORIJENA USLIJED TRETMANA HORMONIMA STRESA

Utjecaj hormona stresa na rast klijanaca kineskog kupusa ispitan je biotestom inhibicije korijena. Klijanci veličine korijena oko 1 cm podvrgnuti su tretmanima u trajanju od 24 h te je očitao prirast korijena (slika 3.1).

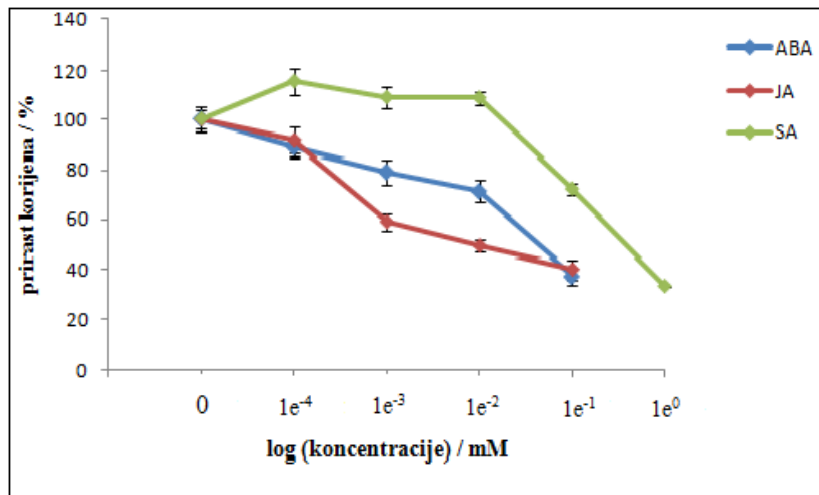


Slika 3.1. Test inhibicije rasta korijena u klijanaca kineskog kupusa: A) klijanci veličine korijena ~1cm prije tretmana; B) kontrolni klijanci nakon 24 h sata inkubacije; C) klijanci tretirani 0,1 mM jasmonskom kiselinom nakon 24 h sata inkubacije. Skala: 2 cm.

Rezultati prirasta korijena uslijed tretmana pokazuju inhibitorni utjecaj hormona stresa na rast korijena klijanaca kineskog kupusa u ovisnosti o koncentraciji, osim u slučaju SA (slika 3.2.). Iz tih razloga, učinak salicilne kiseline je ispitan dodatno i u 1 mM koncentraciji. Tretman salicilnom kiselinom pokazao je različit utjecaj na rast korijena klijanaca, ovisno o

3.REZULTATI

upotrijebljenoj koncentraciji. Tako se pokazalo da niske koncentracije salicilne kiseline (0,0001, 0,001 i 0,01 mM) djeluju stimulirajuće na rast korijena klijanaca, dok visoke koncentracije salicilne kiseline (0,1 i 1 mM) uzrokuju inhibiciju rasta. U tablici 3.1. prikazane su vrijednosti za maksimalne inhibicije rasta korijena (%) uslijed tretmana hormonima stresa. ABA i JA u koncentracijama 0,1 mM izazvale su inhibiciju rasta korijena od 62,8%, odnosno 59,8% u usporedbi s kontrolnim uzorcima. SA pri istoj koncentraciji uzrokuje inhibiciju rasta korijena svega 27,7%, dok je kod više koncentracije (1mM) ta inhibicija iznosila 66,6%.



Slika 3.2. Prirast korijena klijanaca kineskog kupusa uslijed tretmana hormonima stresa (JA, ABA i SA) u rasponu koncentracija 0-0,1 mM (1 mM u slučaju SA). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost (n=30) ± standardna pogreška.

Tablica 3.1. Maksimalna inhibicija rasta korijena klijanaca kineskog kupusa uslijed tretmana hormonima stresa.

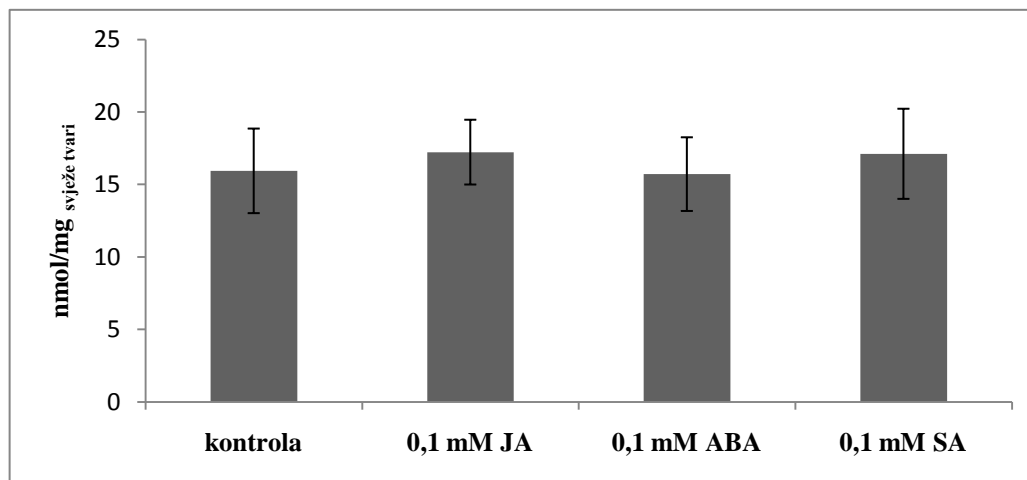
TRETMAN (mM)	INHIBICIJA RASTA (%)
ABA (0,1)	62,8
JA (0,1)	59,8
SA (0,1)	27,7
SA (1,0)	66,6

Daljnja ispitivanja učinaka hormona stresa na biokemijske parametre i ekspresiju gena za auksin amidohidrolazu izvodila sam na klijanacima koji su bili tretirani visokim

koncentracijama hormona stresa (0, 1 i 1 mM), tj. onima kod kojih su bile očite morfološke promjene uslijed tretmana.

3.2 LIPIDNA PEROKSIDACIJA

Stopu lipidne peroksidacije izrazila sam količinom nastalog malondialdehida (MDA) u ekstraktu biljnog tkiva. Statistička obrada rezultata je pokazala da ne postoje značajne razlike u stopi lipidne peroksidacije između kontrolnih biljaka i biljaka tretiranih 0,1 mM jasmonsom, apscizinskom i salicilnom kiselinom.

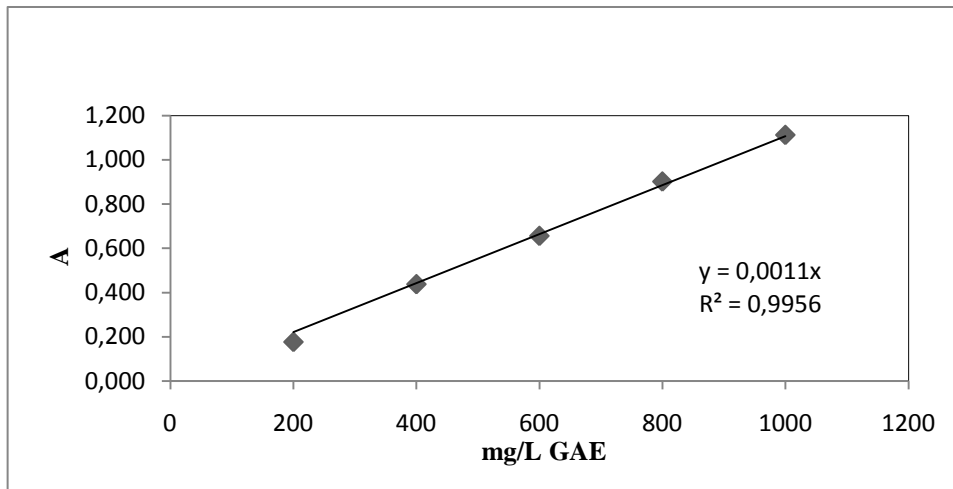


Slika 3.3. Stopa lipidne peroksidacije u klijancima kineskog kupusa tretiranim JA, SA i ABA (0,1 mM) u usporedbi s kontrolom. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti (n=3) ± standardna pogreška.

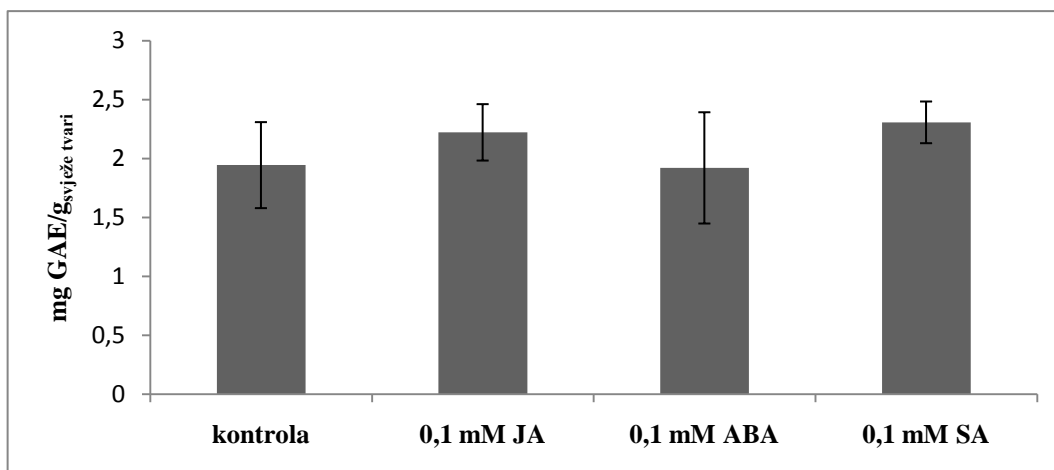
3.3 UKUPNI FENOLI

Količinu ukupnih fenola u klijancima tretiranim s 0,1 mM SA, JA i ABA u odnosu na kontrolu odredila sam Folin-Ciocalteu metodom koristeći prethodno napravljenu baždarnu krivulju za galnu kiselinu (standard, slika 3.3.). Rezultati pokazuju da ne postoje statistički značajne razlike između uzoraka tretiranih hormonima stresa u usporedbi s kontrolnim

uzorcima (slika 3.4.). Iako izvan statistički značajnih okvira, ipak se može primijetiti da je došlo do blagog povišenja količine ukupnih fenola u klijancima tretiranim 0,1 mM JA i SA.



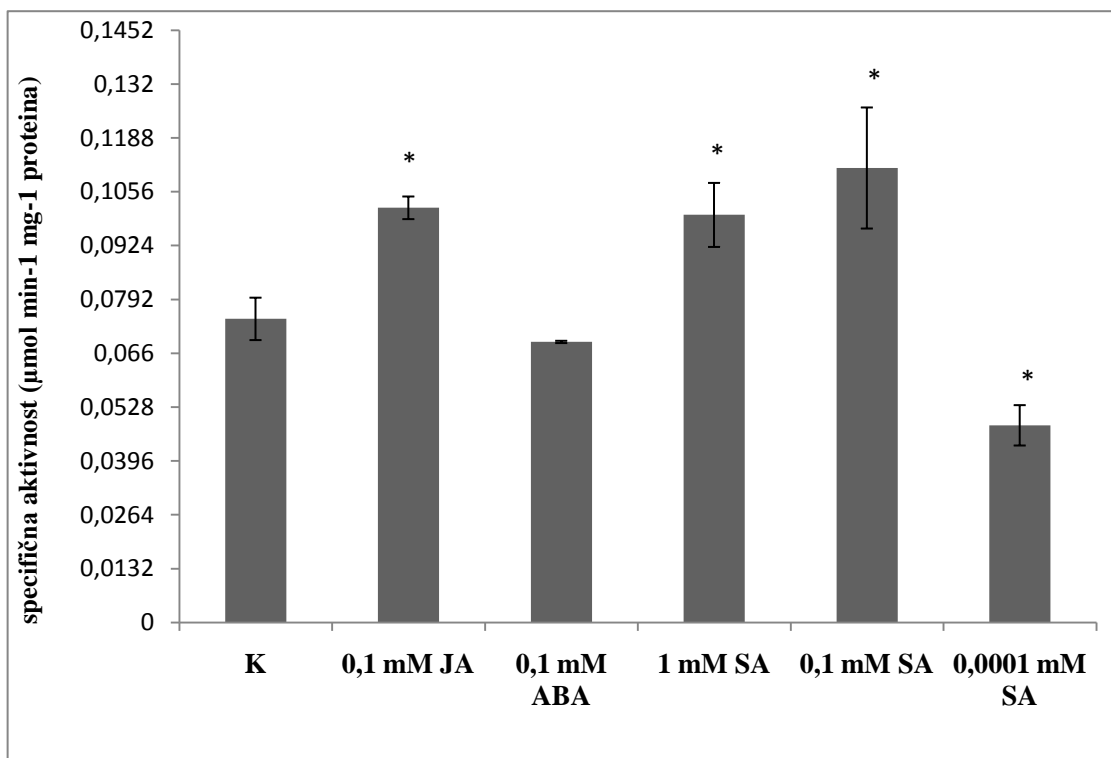
Slika 3.4. Baždarna krivulja konstruirana za standard (galnu kiselinu) u kojoj je prikazana ovisnost koncentracije galne kiseline (mg /L GAE) o apsorbanciji. Na temelju ove krivulje određuje se antioksidacijska aktivnost za nepoznate uzorke i izražava u ekvivalentima galne kiseline.



Slika 3.5. Količina ukupnih fenola u klijancima kineskog kupusa tretiranih sa 0,1 mM JA, SA i ABA u usporedbi s kontrolom. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti ($n=3$) \pm standardna pogreška.

3.4 SPECIFIČNA AKTIVNOST KATALAZE

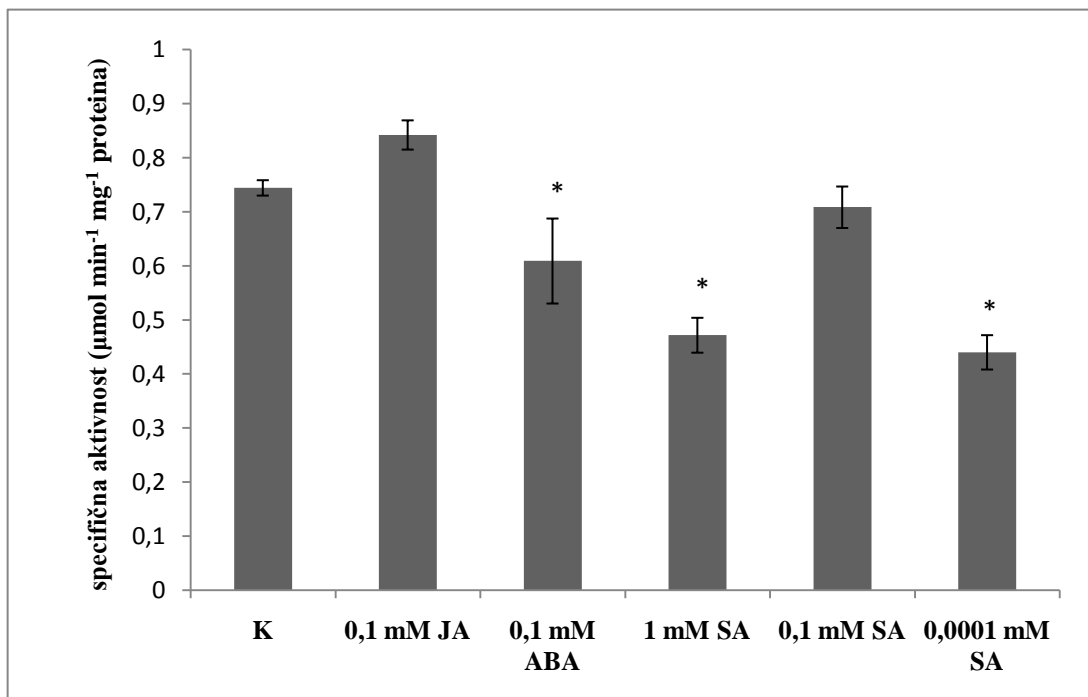
Katalaza je enzim koji uspješno katalizira dismutaciju vodikovog peroksida u vodu i kisik. Aktivnost katalaze odredila sam mjereći smanjenje količine vodikovog peroksida u ekstraktima klijanaca. Rezultati su pokazali da dolazi do statistički značajnog povećanja aktivnosti enzima u klijanaca tretiranih s 0,1 mM jasmonskom kiselinom i 0,1 mM salicilnom kiselinom te 1 mM salicilnom kiselinom (slika 3.5.). Isto tako, zabilježila sam značajno smanjenje aktivnosti katalaze u tretmanu s 0,001 mM salicilnom kiselinom, dok tretman s 0,1 mM apscizinskom kiselinom nije imao veći utjecaj na aktivnost katalaze te je ona ostala u području aktivnosti kakva je zabilježena i u kontrolnim uzorcima.



Slika 3.6. Specifična aktivnost enzima katalaze u klijanaca kineskog kupusa tretiranih 0,1 mM JA, ABA i SA te 0,0001 mM i 1 mM SA. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti (n=3) ± standardna pogreška. Zvezdicom (*) su označeni rezultati statistički značajno različiti od kontrole pri $p \leq 0,05$.

3.5 SPECIFIČNA AKTIVNOST ASKORBAT PEROKSIDAZE

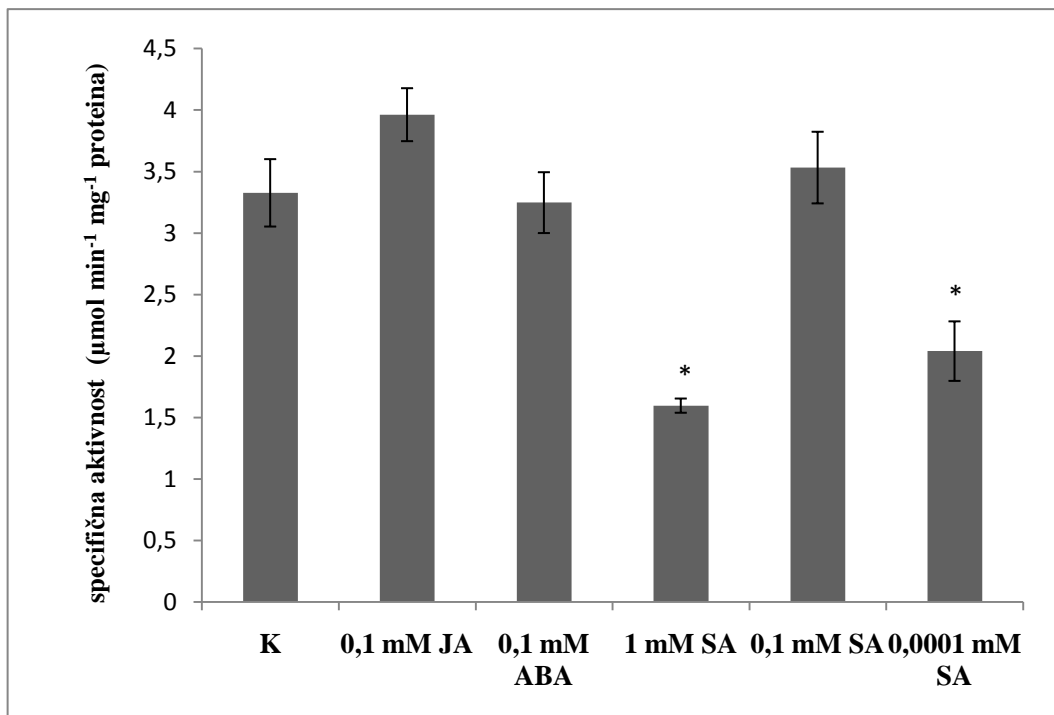
Askorbat peroksidaza (APOX) najvažniji je enzim za uklanjanje viška vodikovog peroksida, organskih hidroperoksida i lipidnih peroksida kako ne bi došlo do nastajanja jako reaktivnih radikala u citosolu te u stromi i tilakoidama kloroplasta. Kako askorbat peroksidaza djeluje tako da reducira molekule vodikovog peroksida pomoću askorbata, aktivnost se određuje spektrofotometrijskim mjerenjem pada apsorbancije kao posljedice smanjenja količine askorbata. Rezultati mjerenja prikazani su na slici 3.6. Uslijed tretmana jasmonsom kiselinom dolazi do blagog povećanja enzimske aktivnosti, koje nije statistički značajno. Suprotno jasmonskoj kiselini, tretman absicizinskom kiselinom dovodi do značajnog smanjenja aktivnosti enzima. Tretman salicilnom kiselinom je djelovao različito na aktivnost askorbat peroksidaze, ovisno o upotrijebljenoj koncentraciji salicilne kiseline: 1 mM SA je izazvala značajno smanjenje enzimske aktivnosti, 0,1 mM SA nije pokazala razlike u usporedbi s kontrolnim uzorkom, dok je tretman vrlo niskom koncentracijom salicilne kiseline (0,0001 mM) rezultirao značajnim smanjenjem specifične aktivnosti askorbat peroksidaze.



Slika 3.7. Specifična aktivnost askorbat peroksidaze u klijancima kineskog kupusa tretiranih s 0,1 mM JA, ABA i SA te 1 mM SA i 0,0001 mM SA. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti ($n=3$) \pm standardna pogreška. Zvezdicom (*) su označeni rezultati statistički značajno različiti od kontrole pri $p \leq 0,05$.

3.6 SPECIFIČNA AKTIVNOST PIROGALOL PEROKSIDAZE

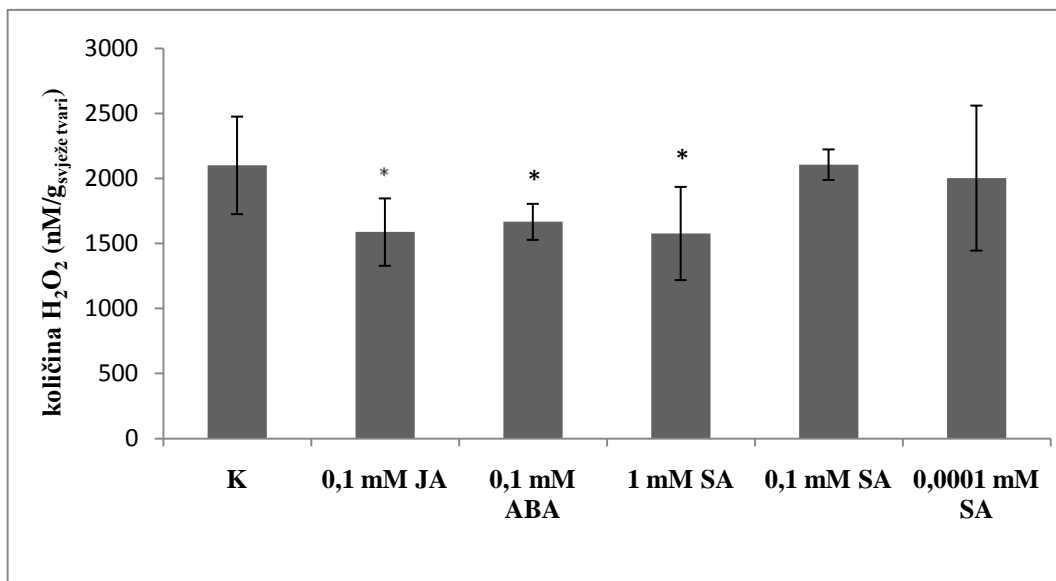
Pirogalol peroksidaza pripada skupini nespecifičnih peroksidaza, kojoj kao donor elektrona služi pirogalol. Oksidacijom pirogalola nastaje purpurogalin, obojeni produkt čiji porast apsorbancije mjerimo spektrofotometrijski. Rezultati su pokazali da uslijed tretmana jasmonskom i apscizinskom kiselinom nije došlo do značajnih promjena u aktivnosti enzima u odnosu na kontrolne uzorke (slika 3.7.). Tretman visokom koncentracijom salicilne kiseline (1 mM) te vrlo niskom koncentracijom salicilne kiseline (0,0001 mM) rezultirao je jakim smanjenjem aktivnosti peroksidaze, dok 0,1 mM SA nije djelovala na aktivnost enzima u odnosu na kontrolu.



Slika 3.8. Specifična aktivnost pirogalol peroksidaze u klijancima kineskog kupusa tretiranih s 0,1 mM JA, ABA i SA te 1 mM SA i 0,0001 mM SA. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti (n=3) ± standardna pogreška. Zvezdicom (*) su označeni rezultati statistički značajno različiti od kontrole pri $p \leq 0,05$.

3.7 KOLIČINA VODIKOVOG PEROKSIDA

Količinu vodikovog peroksida u klijancima tretiranim biljnim hormonima stresa prikazala sam kao $\text{nmol H}_2\text{O}_2/\text{g}_{\text{svježe tvari}}$. Rezultati su pokazali kako postoji statistički značajno smanjenje količine vodikovog peroksida u klijancima tretiranim 0,1 mM JA i ABA te 1 mM SA (slika 3.8). Istovremeno se pokazalo da niže koncentracije salicilne kiseline (0,0001 mM i 0,1 mM) ne dovode do statistički značajnog povećanja količine vodikovog peroksida u usporedbi s kontrolnim uzorcima.

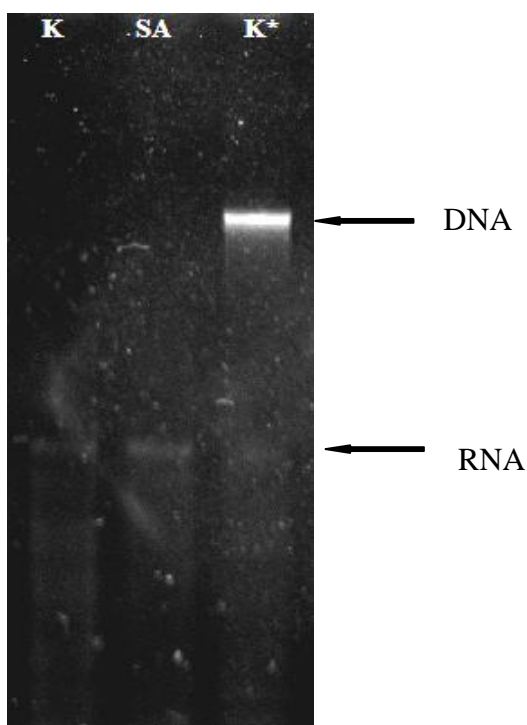


Slika 3.9. Količina vodikovog peroksida u klijancima kineskog kupusa tretiranim 0,1 mM JA, ABA i SA te 1 mM SA i 0,0001 mM SA. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti ($n=3$) \pm standardne pogreške. Zvezdicom (*) su označeni rezultati statistički značajno različiti od kontrole pri $p \leq 0,05$.

3.8 EKSPRESIJA GENA BrILL2

U ovom radu pokušala sam istražiti utjecaj hormona stresa (SA, JA i ABA) na ekspresiju gena za enzim auksin-amidohidrolazu, BrILL2, koji sudjeluje u homeostazi biljnih hormona auksina u kineskom kupusu.

Za promatranje ekspresije gena bitni preduvjet je kvalitetna izolacija RNA. Kako je RNA vrlo osjetljiva na sveprisutne enzime RNaze, izolacija zahtijeva predtretman kompletnog pribora i posuđa s posebno pripremljenim detergentom (poglavlje Materijali i metode, točka 2.1.3.7.1) te vrlo pažljivo rukovanje tijekom procesa izolacije i pročišćavanja. Jedan od koraka pročišćavanja je i uklanjanje eventualno zaostale DNA u uzorku uz djelovanje enzima DNaze. Uspješnost i kvalitetu izolacije RNA iz klijanaca kupusa (kontrolnih i tretiranih hormonima stresa u koncentraciji 0,1 mM) kontrolirala sam elektroforezom RNA u gelu agaroze (1%). Primjer uspješne izolacije RNA prikazan je na slici 3.9.



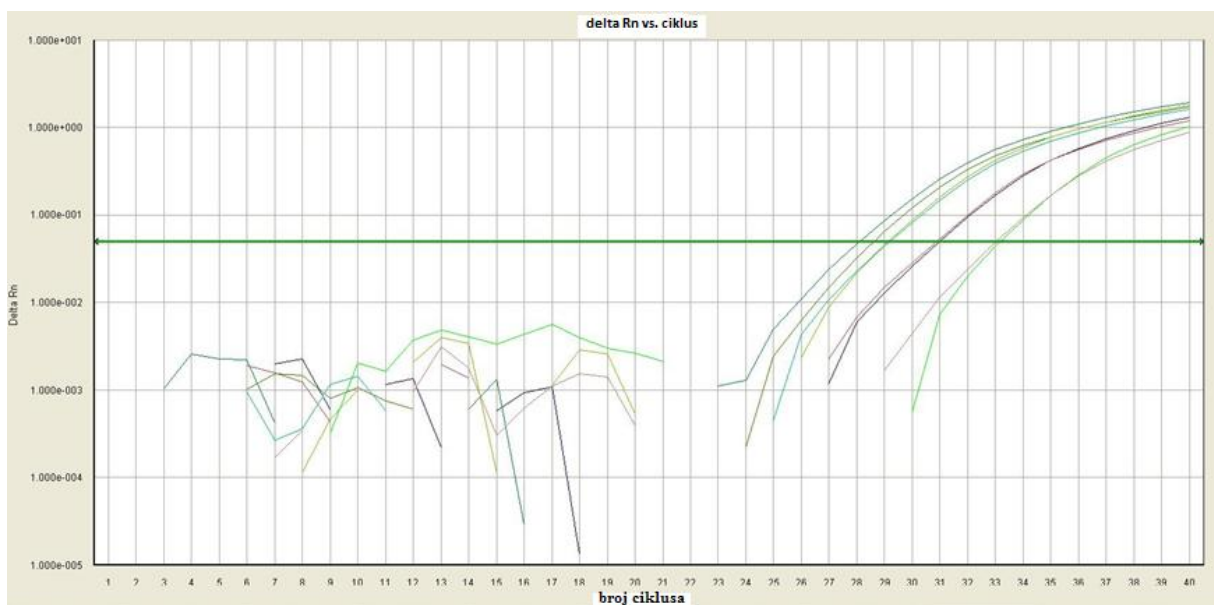
Slika 3.10. Reprezentativni primjer uspješne izolacije RNA. Elektroforeza je provedena u 1% gelu agaroze, pri 100V, 40 min. K-RNA uzorak kontrole nakon djelovanja DNaze; SA-RNA uzorak iz klijanaca tretiranih 0,1mM SA nakon tretmana DNazom; K*- RNA uzorak kontrole prije dodatka DNaze.

Koncentracije RNA u izolatima (izmjerene na uređaju „nanodrop“ Biospec nano, Schimatzu) iznosile su oko 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

Nakon prevođenja uspješno izolirane RNA u cDNA djelovanjem reverzne transkriptaze, pristupili smo analizi ekspresije transkripta metodom lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu. Metodom qRT-PCR analizirana je relativna količina prisutnih transkripata

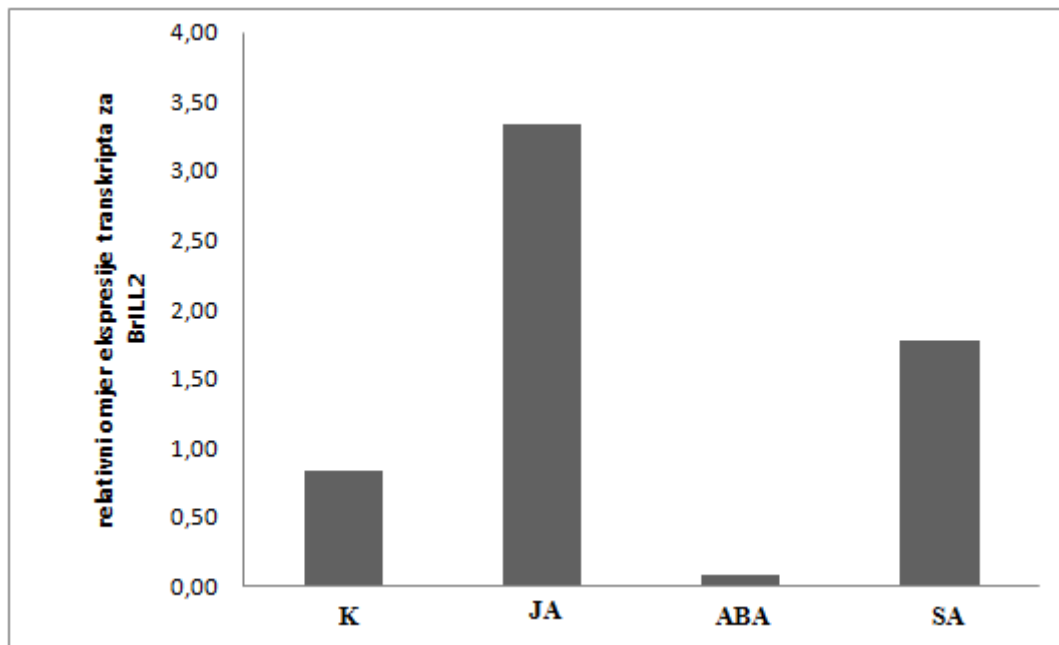
gena BrILL2 u kontrolnim uzorcima te uzorcima tretiranim hormonima stresa. Razina ekspresije analiziranog gena normalizirana je prema ekspresiji endogenih kontrolnih gena COX i 18S rRNA.

Završna faza analize uključuje pregled dobivenih krivulja umnažanja (*amplification plot*) i očitavanja graničnih vrijednosti ciklusa (*cycle threshold*, C_t). Tipične krivulje umnažanja dobivene lančanom reakcijom polimerazom u stvarnom vremenu (slika 3.10) pokazuju povećanje TaqMan fluorescencije s porastom broja PCR ciklusa. Granične vrijednosti ciklusa C_t (*cycle threshold*) su obrnuto proporcionalne količini ciljne nukleinske kiseline u uzorku. Što je veća početna količina prisutne DNA u uzorku, to je prije uočeno nakupljanje produkta umnažanja te je vrijednost C_t niža. Vrijednost normaliziranog izvjestitelja (R_n) predstavlja omjer intenziteta emisije izvjestitelja i intenziteta emisije ROX pasivne reference, kako bi se kompenzirale male varijacije od jažice do jažice. Vrijednost ΔR_n predstavlja vrijednost normalizirane fluorescencije s korekcijom na pozadinu.



Slika 3.11. Prikaz lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu (ΔR_n vs. broj ciklusa). Prikazan je odnos logaritamske promjene u razini fluorescencije u ovisnosti o broju PCR ciklusa za ispitivane gene (BrILL2, COX i 18S rRNA).

Na osnovu vrijednosti dobivenih lančanom reakcijom polimeraze u stvarnom vremenu izračunat je relativni omjer ekspresije transkripta za BrILL2 (slika 3.11.). Rezultati pokazuju da tretman 0,1 mM jasmonskom kiselinom dovodi do vrlo jakog povećanja ekspresije transkripta za BrILL2. Tretman 0,1 mM salicilnom kiselinom također je doveo do značajnog povećanja, međutim, gotovo dva puta manje u odnosu na jasmonsku kiselinu. Suprotno salicilnoj i jamonskoj kiselini, djelovanje apscizinske kiseline na klijance kineskog kupusa rezultiralo je značajnim smanjenjem razine ekspresije transkripta za BrILL2 u odnosu na kontrolni uzorak. Kako su mjerenja u okviru ovog diplomskog rada izvedena samo jednom (zbog skupoće eksperimenta), nije bila moguća statistička obrada rezultata.



Slika 3.12. Razina ekspresije transkripta za auksin-amidohidrolazu (BrILL2) u klijancima kineskog kupusa nakon tretmana hormonima stresa 0,1 mM JA, ABA i SA u odnosu na kontrolu (K).

4. RASPRAVA

Biljni hormoni auksini imaju neophodnu ulogu u regulaciji razvoja svih dijelova biljnog organizma. Oni također imaju važnu ulogu, uz tzv. hormone stresa (JA, SA, ABA), u obrani biljaka u uvjetima abiotičkog i biotičkog stresa, što se obično očituje kroz svojevrsnu inhibiciju rasta i razvitka biljke dok ne nastupe za nju povoljniji uvjeti. Ovaj rad dio je istraživanja uloge biljnih hormona auksina u uvjetima stresa te međudjelovanja auksina i tzv. hormona stresa (JA, SA, ABA).

Poznato je već dugi niz godina da auksini djeluju stimulatивно u (niskim) optimalnim koncentracijama. Inhibicija rasta nastupa, kako uslijed nedostatka slobodnih auksina, tako i u slučaju povišenih koncentracija slobodnih auksina. Djelovanje auksina pri povišenim koncentracijama očituje se, između ostalog, kroz inhibiciju produžnog rasta korijena što je osnova biotestova koji se uobičajeno koriste u istraživanjima auksina. Tako su istraživanja na klijancima kineskog kupusa (*Brassica rapa ssp. pekinensis*) pokazala da tretman klijanaca slobodnim auksinima u koncentraciji 0,1 mM dovodi do značajne inhibicije rasta korijena u odnosu na kontrolne uzorke (91%) (Savić i sur. 2009). Osim toga, pokazalo se kako i tretman konjugatima auksina i aminokiselina, poput IAA-Ala, IPA-Ala i IBA-Ala, također izaziva inhibiciju rasta korijena, no u manjem postotku u odnosu na slobodne auksine. Kako se zna da u homeostazi auksina ključnu ulogu imaju procesi njihove konjugacije, sve više se istražuje aktivnost auksin amidohidrolaza, enzima koji hidroliziraju auksinske konjugate, oslobađajući slobodne forme auksina (IAA, IPA, IB

A). Poznato je da su konjugati s aminokiselinom Ala (IPA-Ala i IBA-Ala) dobri supstrati za auksin amidohidrolaze izolirane iz kineskog kupusa, BrILL2 i BrIAR3 te se pretpostavlja da je inhibicija rasta korijena uslijed tretmana tim konjugatima barem djelomično posljedica njihove hidrolize i otpuštanja slobodnih auksina (Savić i sur. 2009). Konjugati auksina nastaju djelovanjem enzima auksin-konjugat sintetaza (GH3 enzimi) i UDP-glukoza transferaza (UGT enzimi). Prekomjerna ekspresija sintetaza (GH3 i UGT) obično rezultira zakočenim rastom. Mutante uročnjaka koje imaju prekomjernu ekspresiju *GH3-2* i *GH3-6* gena razvijaju vrlo kratke hipokotile, dok biljke s mutiranim *GH3-9* proteinom razvijaju puno kraće korijenje u usporedbi s divljim tipom (Ludwig Müller 2011).

Za sada još malobrojni rezultati ukazuju da konjugati auksina mogu biti uključeni u toleranciju biljaka na čimbenike abiotičkog stresa. Mutante uročnjaka s prekomjernom ekspresijom auksin amidohidrolaze iz topole pokazali su povećanu toleranciju na solni stres (Junghans i sur. 2006). GH3 geni (npr. *WESI* gen) su također direktno uključeni u odgovore biljaka na čimbenike stresa. Prilikom izlaganja biljaka različitim stresnim uvjetima, kao i prilikom izlaganja hormonima stresa (salicilnoj i apscizinskoj kiselini) dolazi do povišene ekspresije *WESI* gena (Ludwig Müller 2011), što ima za posljedicu zakočenje rasta. U klijanaca kineskog kupusa tretmani apscizinskom kiselinom, kao i visokom koncentracijom salicilne kiseline (0,1 mM i 1 mM) dovode do inhibicije rasta korijena (slika 3.2). Nadalje, rezultati su pokazali i inhibitorni učinak jasmonske kiseline, što je u skladu s literaturnim podacima. Naime, prvi fiziološki proces koji je opisan nakon tretmana biljaka jasmonsom kiselinom je inhibicija rasta korijena. Dathe i suradnici su 1981. godine došli do zaključka da jasmonska kiselina, kao i metilni ester jasmonske kiseline, pokazuju jaku aktivnost i pri pikomolarnim koncentracijama. Jedan od mehanizama koji je uključen u regulaciju ovog procesa je aktivacija enzima uključenih u obrambene mehanizme (Wasternsk 2007). Staswick i suradnici su pokazali da tretman uročnjaka vrlo niskim koncentracijama jasmonske kiseline (0,1 μ M) već može izazvati inhibiciju rasta korijena. Presudnu ulogu u ovom procesu imaju geni iz porodice GH3 (*JAR1* gen). Mutante za gen *JAR1* pokazuju zakočeni rast. Činjenica da je *JAR1* protein iz GH3 obitelji govori u prilog o međusobnoj povezanosti signalnih puteva biljnih hormona auksina i hormona stresa (JA, SA, i ABA).

SA je važna komponenta čitave signalne mreže hormona koja ima važnu ulogu u ravnoteži redoks stanja biljke. Može imati pro- i anti-oksidativne uloge ovisno o endogenoj koncentraciji, ali i interakciji s drugim molekulama (ROS, jasmonska kiselina itd.) ovisno o

vrsti, ali i specifičnim razvojnim i okolišnim uvjetima (Yang i sur. 2004). Salicilna kiselina je ključna endogena signalna molekula uključena u obrambene procese biljaka. Istraživanja provedena na duhanu, bundevi i uročnjaku pokazala su da nakon infekcije patogenima dolazi do značajnog povećanja razine endogene salicilne kiseline i njenih konjugata. Egzogenom aplikacijom salicilne kiseline može se aktivirati sistemska stečena imunost kod brojnih biljnih vrsta čime se povećava njihova otpornost na stvarne patogene (Yang i sur. 2004). Pretpostavlja se, stoga, da je tretman niskim koncentracijama salicilne kiseline korišten u ovom radu (0,0001-0.001mM SA) moguće aktivirao mehanizme koji dovode do pojačane otpornosti na različite štetne utjecaje iz okoline što se morfološki očituje kroz pojačani produžni rast korijena u odnosu na kontrole (slika 3.2).

Analizom razine transkripta auksin amidohidrolaze BrILL2 može se pretpostaviti do kojih homeostatskih promjena u profilu auksina dolazi uslijed tretmana hormonima stresa. Rezultati su pokazali povećanje broja kopija transkripta BrILL2 četiri puta u odnosu na kontrolu uslijed tretmana 0,1 mM jasmonskom kiselinom, što indicira da jasmonska kiselina nizvodno potiče signalne puteve kojima je regulirana auksinska homeostaza. Salicilna kiselina (0,1 mM) je izazvala povećanje razine transkripta dva puta u odnosu na kontrolu, što indicira da povišene razine transkripta za BrILL2 mogu objasniti inhibitorno djelovanje salicilne kiseline u ovim koncentracijama na rast korijena klijanca kineskog kupusa. Međutim, tretman 0,1 mM abscizinskom kiselinom izazvao je značajno smanjenje razine transkripta za BrILL2. Ovaj rezultat može upućivati na neke dodatne posttranskripcijske regulacije ekspresije BrILL2. Za sada se vrlo malo zna o regulaciji transkripcije auksin amidohidrolaza. U uročnjaka postoji 6 gena za auksin amidohidrolaze koji pokazuju tkivno i vremenski specifičnu ekspresiju tijekom normalnog razvoja biljaka (Rampey i sur. 2004). Junghans i sur. (2006) su identificirali povećanu razinu transkripta za auksin amidohidrolazu u tkivu topole uslijed solnog stresa, te pokazali da je mutant uročnjaka s prekomjerno eksprimiranim genom iz topole (PcILL3) otporniji na solni stres.

Osim što se djelovanje hormona stresa na biljke manifestira kroz morfološke promjene, one se očituju i na biokemijskoj razini. Kako prvenstveno djeluju kao signali stresa, u biljkama izazivaju aktivaciju obrambenih mehanizama, a neki od hormona stresa mogu djelovati i na aktivaciju antioksidacijskog sustava.

Specifična aktivnost antioksidacijskih enzima katalaze, askorbat peroksidaze te pirogalol peroksidaze u klijancima kineskog kupusa prati sličan trend: jasmonska kiselina

izaziva lagani porast aktivnosti antioksidacijskih enzima, dok apscizinska kiselina izaziva relativno slabo smanjenje njihove aktivnosti. Međutim, kako oba tretmana ne djeluju značajno na specifičnu aktivnost antioksidacijskih enzima, može se pretpostaviti da u klijancima ne dolazi do značajnog oksidacijskog stresa uslijed tretmana jasmonskom i apscizinskom kiselinom.

Djelovanje salicilne kiseline je pokazalo, kako je i ranije opisano, ovisnost o upotrijebljenoj koncentraciji. Značajno smanjenje enzimske aktivnosti prilikom djelovanja vrlo niske koncentracije salicilne kiseline pripisuje se njezinom stimulirajućem djelovanju na obrambene mehanizme. Značajno povišenje aktivnosti prilikom izlaganja 0,1 mM salicilnoj kiselini je nastalo uslijed oksidacijskog stresa kojega salicilna kiselina izaziva. Značajno smanjenje aktivnosti enzima uslijed tretmana 1 mM salicilom kiselinom je posljedica prevelikog oksidacijskog stresa na biljku, koji stanice najvjerojatnije vodi u apoptozu (Juan i Lin 2008).

Budući da se po aktivnosti antioksidacijskih enzima zamjećuje da klijanci generalno uslijed tretmana hormonima stresa (posebice jasmonskom i apscizinskom kiselinom) nisu izloženi značajnom oksidacijskom stresu, za očekivati je i da će parametri oksidacijskog stresa biti približnih vrijednosti kao i kod kontrolnih klijanaca. Tako stopa lipidne peroksidacije izmjerena u klijancima tretiranim jasmonskom, apscizinskom i salicilnom kiselinom u koncentraciji 0,1mM ne pokazuje značajno odstupanje vrijednosti u odnosu na kontrolne uzorke. Isto tako, količina ukupnih fenola ispitana kod klijanaca uslijed tretmana ne odstupa značajno od vrijednosti zabilježene za kontrolne uzorke. Osim lipidne peroksidacije i ukupnih fenola, kao pokazatelj oksidacijskog stresa u klijanaca izmjerena je i količina vodikovog peroksida uslijed tretmana hormonima stresa.

Tretman nižim koncentracijama salicilne kiseline nije bitno djelovao na količinu vodikovog peroksida u klijancima kupusa, dok su u klijancima tretiranim visokom koncentracijom salicilne kiseline, kao i jasmonskom i apscizinskom kiselinom izmjerene statistički značajno manje količine vodikovog peroksida u odnosu na kontrolne klijance (slika 3.8). Istraživanja na mutanti riže koja je konstruirana tako da ne može sintetizirati salicilnu kiselinu pokazuju znatno povećanu koncentraciju vodikovog peroksida u odnosu na divlji tip (Yang i sur. 2004), što ukazuje na to da je salicilna kiselina kao sekundarni signal važna obrambena molekula u biljnom organizmu. Osim što ima ulogu u obrambenom odgovoru biljaka na stresne uvjete, Yang i suradnici utvrdili su da salicilna kiselina u biljnom

organizmu ima i jaku antioksidativnu ulogu u zaštiti biljaka od oksidativnog stresa. Kompleks salicilat-željezo posjeduje aktivnosti nalik superoksid dismutazi (katalizira dismutaciju superoksidnih radikala) (Yang i sur. 2004). Nadalje, salicilna kiselina štiti biljne i animalne katalaze od vodikovog peroksida *in vitro*, što indicira da i *in vivo* potencijalno smanjuje količine vodikovog peroksida (Yang i sur. 2004).

Rezultati ovog diplomskog rada ukazuju na činjenicu da hormoni stresa u ispitivanim koncentracijama mogu djelovati preventivno i inhibirati nastajanje vodikovog peroksida, jednog od reaktivnih kisikovih spojeva koji se razvijaju u povećanim količinama uslijed stresa i djeluju pogubno na biljni organizam. Inhibicija rasta korijena uslijed tretmana moguće je posljedica promjena u homeostazi auksina što se može pretpostaviti iz rezultata ekspresije transkripta za auksin amidohidrolazu uslijed tretmana. Detaljna istraživanja uloge auksina te međudjelovanja auksina i hormona stresa u odgovoru kupusa na nepovoljne okolišne uvjete svakako će doprinjeti saznanjima koja dugoročno mogu biti od koristi u domaćoj biotehnologiji, agronomiji i poljoprivredi.

5. ZAKLJUČCI

1. Biljni hormoni stresa izazivaju inhibiciju rasta korijena klijanaca kineskog kupusa u ovisnosti o upotrijebljenoj koncentraciji.

2. Tretman biljnim hormonima stresa izaziva promijenjen profil ekspresije transkripta za askin amidohidrolazu BrILL2 u klijanacima kineskog kupusa, ovisno o hormonu: jasmonska i salicilna kiselina izazivaju povećanje relativne ekspresije, dok apscizinska kiselina izaziva smanjenje relativne ekspresije transkripta u odnosu na kontrolne klijance.

3. Hormoni stresa ne utječu značajno na oksidacijsko stanje klijanaca kineskog kupusa; stopa lipidne peroksidacije, kao i količina ukupnih fenola ne mijenja se značajno uslijed tretmana u odnosu na kontrolne uzorke.

4. Jasmonska kiselina izaziva lagano povećanje aktivnosti antioksidacijskih enzima katalaze, askorbat peroksidaze te pirogalol peroksidaze. Apocizinska kiselina izaziva lagano smanjenje njihove aktivnosti. Salicilna kiselina pokazuje različit utjecaj na aktivnost antioksidacijskih enzima, ovisno o upotrijebljenoj koncentraciji: u vrlo visokim (1mM), kao i vrlo niskim koncentracijama (0,0001mM) djeluje inhibitorno na aktivnost spomenutih enzima, dok u 0,1 mM koncentraciji potiče aktivnost antioksidacijskih enzima u klijanacima.

5. Tretman jasmonskom, apocizinskom i visokim koncentracijama salicilne kiseline izaziva značajno smanjenje količine vodikovog peroksida u klijanacima kineskog kupusa. Niske koncentracije salicilne kiseline ne djeluju na količinu vodikovog peroksida.

6. Salicilna kiselina je biljni hormon stresa koji ima dvojaku ulogu u biljkama. Ovisno o koncentraciji u biljnom tkivu ima nepovoljne ili zaštitne uloge. Zaključujem da je tretman vrlo niskom koncentracijom salicilne kiseline na klijance kineskog kupusa pokazao njezino zaštitno djelovanje, dok su vrlo visoke koncentracije salicilne kiseline djelovale nepovoljno na metabolizam klijanaca kineskog kupusa.

6. LITERATURA

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

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

Bajguz, A., Piotrowska, A. (2007): Conjugates of auxin and cytokinin. *Phytochemistry* 70: 957-969.

Bitto, E., Bingman, C. A., Bittova, L., Houston, N. L., Boston, R. S., Boston, B. G., Phillips, G. N. (2009): X-ray Structure of ILL2, an auxine-conjugate amidohydrolase from *Arabidopsis thaliana*. *Proteins* 64: 61-71.

Brcko, A., Penčik, A., Magnus, V., Prebeg, T., Mlinarić, S., Antunović, J., Lepeduš, H., Cesar, V., Strnad, M., Rolčik, J., Salopek-Sondi, B. (2012): Endogenous auxin profile in the Christmas rose (*Helleborus niger* L.) flower and fruit: Free and amide conjugated IAA, *Journal of Plant Growth Regulation* (DOI 10.1007/s00344-011-9220-1), (in press).

Burdon, J. J. i Thrall, P. H. (2003): The fitness costs to plants of resistance to pathogens. *Genome Biology* 4: 227.1-227.3.

Campanella, J. J., Olajide, A. F., Magnus, V., Ludwig-Müller, J. (2004): A Novel Auxin Conjugate Hydrolase from Wheat with substrate Specificity for longer Side-Chain Auxin Amide Conjugates. *Plant Physiology* 135: 2230-2240.

Campanella, J. J., Stephanie M. Smith, S. M., Leib, D., Wexler, S., Ludwig-Müller, J. (2008): The auxin conjugate hydrolase family of *Medicago truncatula* and their expression during the interaction with two symbionts. *Journal of Plant Growth Regulation* 27:26–38.

Chance, B., Maehly, A. C. (1955): Assay of catalases and peroxidases. U: *Methods in Enzymology*, ur. S. P. ur. S. P. Colowick, N. O. Kaplan, New York: *Academic Press* 2: 764-775.

Chang, S., Puryear, J., Cairney, J. (1993): A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant Molecular Biology Reporter* 11: 113-116.

- Eucaryotic 18S rRNA TaqMan endogenous control, *Applied Biosystems*, Carlsbad, CA, USA.
- Hammer, Ø., Harper, D. A. T., Ryan, P. D. (2001): PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontologia Electronica* 4: 9pp.
- Heath, R. L., Packer, L. (1968): Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I – Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 125: 189-198.
- Juan, S. i Lin, H. H. (2008): Role of salicylic acid in plant abiotic stress. *Verlag der Zeitschrift für Naturforschung* 63c: 313-320.
- Junghans, U., Polle, A., Düchting, P., Weiler, E., Kuhlmann, B., Gruber, F., Teichmann, T. (2006): Adaptation to high salinity in poplar involves changes in xylem anatomy and auxin physiology. *Plant and Cell Environment* 29:1519-1531.
- LeClere, S., Tellez, R., Rampey, R. A., Matsuda, S. P. T. (2002): Characterisation of a Family of IAA-Amino Acid Conjugate Hydrolases from *Arabidopsis*. *The Journal of Biological Chemistry* 23: 20446-20452.
- Liu, J. i Wang, X. J. (2006): An Integrative Analyses of the Effect of Auxin on Jasmonic Acid Biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Integrative Plant Biology* 48: 99-103.
- Ludwig-Müller, J. (2007): Indole-3-butyric acid synthesis in ecotypes and mutants of *Arabidopsis thaliana* under different growth conditions. *Journal of Plant Physiology* 164: 47-59.
- Ludwig-Müller, J. (2011): Auxin conjugates: their role for plant development and in the evolution of land plants. *Journal of Experimental Botany*. 1-17.
- Ludwig-Müller, J. i Cohen, J. D. (2002): Identification and quantification of three active auxins in different tissues of *Tropaeolum majus*. *Physiologia Plantarum* 115: 320-329.

Ludwig-Müller, J., Epstein, E., Hilgenberg, W. (1996): Auxin-conjugate hydrolysis in Chinese cabbage: characterization of an amidohydrolase and its role during infection with clubroot disease. *Physiologia Plantarum* 97: 627-634.

Magnus, V., Bandurski, R. S., Schulze, A. (1980): Synthesis of 4,5,6,7 and 2,4,5,6,7 deuterium-labeled indole-3-acetic acid for use in mass spectrometric assays. *Plant Physiology* 66: 775-781.

Mukherjee, S. P., Choudhuri, M. A. (1983): Implication of water stress-induced changes in the levels of endogenous ascorbic acid and hydrogen peroxide in *Vigna* seedlings. *Physiology of Plants* 58: 166-170.

Nakagami, H., Soukupová, H., Schikora, A., Žárský, V., Hirt, H. (2006): A mitogen-activated protein kinase kinase kinase mediates reactive oxygen species homeostasis in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry* 281: 38697-38704.

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

Norman, C., Howell, K. A., Millar, A. H., Whelan, J. M., Day, D. A. (2004): Salicylic acid is an uncoupler and inhibitor of mitochondrial electron transport. *Plant Physiology* 134: 492-501.

Normanly, J. (2010): Approaching cellular and molecular resolution of auxin biosynthesis and metabolism. *Cold Spring Harb Prespect Biol* 2: a001594.

Park, J., Park, J., Kim, J., Staswick, P. E., Jeon, J., Yun, J., Kim, S., Kim, J., Lee, Y., Park, C. (2007): GH3-mediated Auxin Homeostasis Links Growth Regulation with Stress Adaptation Response in *Arabidopsis*. *The Journal of Biological Chemistry* 13: 10036-10046.

Pasternak, T., Potters, G., Caubergs, R., Jansen, M. A. K. (2005): Complementary interactions between oxidative stress and auxin control plant growth responses at plant, organ, and cellular level. *Journal of Experimental Botany* 56: 1991-2001.

Pevalek-Kozlina, B. (2003): Fiziologija bilja, Zagreb: Profil International.

Popko, J., Hänsch, R., Mendel, R-R., Polle, A., Teichmann, T. (2010): The role of abscisic acid and auxin in the response of poplar to abiotic stress. *Plant Biology* 12: 242-258.

Potters, G., Pasternak, T. P., Guisez, Y., Palme, K. J., Jansen, M. A. K. (2007): Stress-induced morphogenic responses: Growing out of trouble? *Trends in Plant Science* 12: 98-105.

Quittendenn, L. J., Davies, N. W., Smith, J. A., Molesworth, P. P., Tivendale, N., D., Ross, J. J. (2009): Auxin biosynthesis in *Pisum sativum*: Characterisation of the tryptamine pathway. *Plant Physiology* 151: 1130-1138.

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

Savić, B., Tomić, S., Magnus, V., Gruden, K., Barle, K., Grenković, R., Ludwig-Müller, J., Salopek-Sondi, B. (2009): Auxin Amidohydrolase from *Brassica rapa* Cleave the Alanine Conjugate of Indolepropionic Acid as a Preferable Substrate: Biochemical and Modeling Approach. *Plant Cell Physiology* 50: 1587-1599.

Schuller, A., Ludwig-Müller, J. (2006): A family of auxin conjugate hydrolases from *Brassica rapa*: characterization and expression during clubroot disease. *New Phytology* 171: 1-3.

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

Southerton, S. G., Marshall, H., Mouradov, A., Teasdale, R. D. (1998): Eucalypt MADS-Box genes expressed in developing flowers. *Plant Physiology* 118: 365-372.

Staswick, P. E., Tiryaki, I., Rowe, M. L. (2002): Jasmonate response locus JAR1 and several related *Arabidopsis* genes encode enzymes of the firefly luciferase superfamily that show

activity on jasmonic, salicylic, and indole-3-acetic acids in an assay for adenylation. *Plant Cell* 14: 1405-1415.

Sugawara, S., Hishiyama, S., Jikumaru, Y., Hanada, A., Nishimura, T., Koshiba, T., Zhao, Y., Kamiya, Y., Kasahara, H. (2009): Biochemical analyses of indole-3-acetaldoxime-dependent auxin biosynthesis in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106: 5430-5435.

Tognetti, V. B., Van Aken, O., Morreel, K., Vandenbroucke, K., van de Cotte, B., De Clercq, I., Chiwocha, S., Fenske, R., Prinsen, E., Boerjan, W., Genty, B., Stubbs, K. A., Inzé, D., Van Breusegema, F. (2010): Perturbation of Indole-3-Butyric Acid Homeostasis by the UDP-Glucosyltransferase UGT74E2 Modulates *Arabidopsis* Architecture and Water Stress Tolerance. *The Plant cell* 22: 2260-2679.

Wang, D., Pajerowska-Mukhtar, K., Hendrickson Culler, A., Dong, X. (2007): Salicylic Acid Inhibits Pathogen Growth in Plants through Repression of the Auxin Signaling Pathway. *Current Biology* 17: 1784-1790.

Wasternack, C. (2007): Jasmonates: An Update on Biosynthesis, Signal Transduction, and Action in Plant Stress Response, Growth and Development. *Annals of Botany* 100: 681-697.

Weller, S. A., Elphinstone, J. G., Smith, N. C., Boonham, N., Stead, D. E. (2000): Detection of *Ralstonia solanacearum* strains with a quantitative, multiplex, real-time, fluorogenic PCR (TaqMan) assay. *Applied Environmental Microbiology* 66: 2853–2858.

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

Yang, Y., Qi, M., Mei, C. (2004): Endogenous salicylic acid protects rice plants from oxidative damage caused by ageing as well as biotic and abiotic stress. *The Plant Journal* 40: 909-919.

Zhu J. K. (2002): Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annual Review of Plant Biology* 53: 247-273.