

# Učinak povišene temperature na linije uročnjaka *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. s promijenjenom ekspresijom gena DMS3

---

Križić, Iva

Master's thesis / Diplomski rad

2022

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:752195>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-25**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Iva Križić

**Učinak povišene temperature na linije  
uročnjaka *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh s  
promijenjenom ekspresijom gena *DMS3***

Diplomski rad

Zagreb, 2022.

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Biology

Iva Križić

**Effect of high temperature on *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh lines with modified *DMS3* expression**

Master Thesis

Zagreb, 2022.

Ovaj rad izrađen je u Laboratoriju iz fiziologije bilja na Botaničkom zavodu Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod vodstvom prof. dr. sc. Mirte Tkalec. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra struke znanosti o okolišu.

## *Zahvale*

*Iskreno zahvaljujem svojoj mentorici prof. dr. sc. Mirti Tkalec na ukazanom povjerenju, velikom strpljenju, razumijevanju i pomoći prilikom izrade ovoga diplomskog rada.*

*Zahvaljujem asistentici Sandri Vitko na susretljivosti, pomoći i savjetima tijekom eksperimentalnog rada u laboratoriju.*

*Zahvaljujem svojoj obitelji koja mi je pružila mogućnost studiranja te me bodrila i ohrabivala kroz sve godine studija, dajući mi bezuvjetnu ljubav i podršku, stalno me potičući da budem bolja verzija sebe.*

*I na kraju, veliko hvala mojim najboljim prijateljicama i momku koji su uvijek bili uz mene, ohrabivali me, motivirali, tješili, nasmijavali i vjerovali u mene i onda kada ja nisam.*

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

---

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Diplomski rad

## Učinak povišene temperature na linije uročnjaka *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh s promijenjenom ekspresijom gena *DMS3*

Iva Križić

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Toplinski stres uzrokuje poremećaje u rastu i razvoju biljaka, inhibira klijanje te štetno utječe na fotosintetske pigmente i lipidni integritet membrana. U odgovoru na stres biljke sintetiziraju kompatibilne osmolite kao što je prolin i proteine toplinskog šoka te aktiviraju antioksidacijske mehanizme i epigenetske promjene među kojima je metilacija molekule DNA. Protein DMS3 dio je sustava za RNA-posredovanu metilaciju DNA koji sudjeluje u metilaciji DNA *de novo* i uključen je u regulaciju genske ekspresije. Cilj ovoga rada bio je istražiti utjecaj povišenih temperatura (30, 32, 32/24 i 35 °C) na divlji tip uročnjaka *Arabidopsis thaliana*, liniju *dms3-1* s mutiranim genom *DMS3* te transgeničnu liniju *oeDMS3* (nazvana *6TV*) s pojačanom ekspresijom gena *DMS3* kako bi se utvrdilo postoje li među njima razlike u odgovoru na toplinski stres. Od morfoloških parametara mjereni su klijavost, duljina korijena i biomasa, a od biokemijskih sadržaj fotosintetskih pigmenata i prolina, stupanj lipidne peroksidacije (sadržaj malondialdehida) te prisutnost proteina HSP70. Pri povišenim temperaturama vrijednosti morfoloških parametara bile su značajno smanjene kod mutanta *dms3-1* u odnosu na divlji tip i liniju *6TV*. Sadržaj klorofila *a* i *b* te karotenoida bio je značajno snižen pri povišenim temperaturama kod svih linija. Više vrijednosti malondialdehida zabilježene su kod mutanta *dms3-1* na svim temperaturama iznad 30 °C. Sadržaj prolina nije se značajno razlikovao među linijama. Prisutnost proteina HSP70 bila je izraženija kod linija *dms3-1* i *6TV* pri povišenim temperaturama. Rezultati pokazuju da je linija *dms3-1* osjetljivija, a linija *6TV* otpornija na toplinski stres, iz čega se može zaključiti da metilacija DNA posredovana molekulama RNA ima značajnu ulogu u prilagodbi biljaka na toplinski stres.

(68 stranica, 15 slika, 7 tablica, 60 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.

Ključne riječi: toplinski stres, metilacija, klijanje, fotosintetski pigmenti, lipidna peroksidacija, prolin, HSP70

Voditelj: Prof. dr. sc. Mirta Tkalec  
Ocjenitelji: Prof. dr. sc. Mirta Tkalec  
Prof. dr. sc. Sven Jelaska  
Doc. dr. sc. Karmen Fio Firi  
Doc. dr. sc. Mladen Maradin  
Prof. dr. sc. Dražen Balen (zamjena)

Rad prihvaćen: 10. veljače 2022

## BASIC DOCUMENTATION CARD

---

University of Zagreb

Faculty of Science

Department of Biology

Master Thesis

### Effect of high temperature on *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh lines with modified *DMS3* expression

Iva Križić

Rooseveltovej trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Heat stress causes disorders in plant growth and development, inhibits germination, and adversely affects photosynthetic pigments and lipid integrity of membranes. In response to stress, plants synthesize compatible osmolytes such as proline and heat shock proteins, and activate antioxidant mechanisms and epigenetic changes, including DNA methylation. The *DMS3* protein is part of the RNA-directed DNA methylation system involved in *de novo* DNA methylation and is involved in the regulation of gene expression. The aim of this study was to investigate the effect of elevated temperatures (30, 32, 32/24 and 35 °C) on wild type plant *Arabidopsis thaliana*, the *dms3-1* line with the mutated *DMS3* gene and the *oeDMS3* transgenic line (called *6TV*) with overexpression of *DMS3* gene, in order to determine if there are differences in their response to heat stress. Germination, radicle length and biomass were measured as morphological parameters, and content of photosynthetic pigments and proline, degree of lipid peroxidation (content of malondialdehyde) and presence of HSP70 protein as biochemical parameters. At elevated temperatures, the values of morphological parameters were significantly reduced in the *dms3-1* mutant, compared to wild-type and *6TV* line. The content of chlorophyll *a* and *b*, and carotenoids was significantly reduced at elevated temperatures in all lines. Higher values of malondialdehyde were observed in the *dms3-1* mutant at all temperatures above 30 °C. The proline content did not differ significantly between the lines. The presence of HSP70 protein was more pronounced in the *dms3-1* and *6TV* lines at elevated temperatures. The results show that the *dms3-1* line is more sensitive and the *6TV* line is more resistant to heat stress, from which it can be concluded that DNA methylation mediated by RNA molecules plays a significant role in the adaptation of plants to heat stress.

(68 pages, 15 figures, 7 tables, 60 references, original in: Croatian)

Thesis is deposited in Central Biological Library.

Keywords: heat stress, methylation, germination, photosynthetic pigments, lipid peroxidation, proline, HSP70

Supervisor: Prof. Mirta Tkalec  
Reviewers: Prof. Mirta Tkalec  
Prof. Sven Jelaska  
Asst. Prof. Karmen Fio Firi  
Asst. Prof. Mladen Maradin  
Prof. Dražen Balen (Substitute)

Thesis accepted: February 10<sup>th</sup>, 2022.

## **POPIS KRATICA**

**AGO** – engl. *Argonaute*

**ANOVA** – *The Analysis Of Variance*

**APS** – amonij-persulfat

**APX** – askorbat peroksidaza

**ATP** – adenzin-trifosfat

**BCIP/NBT** – 5-bromo-4-kloro-3-indolilfosfat/nitrotetrazolium modriilo

**CAT** – katalaza

**DCL3** – engl. *Dicer-like 3*

**DMS3** – engl. *Defective in Meristem Silencing 3*

**HSE** – engl. *Heat shock cis element*

**HSF** – engl. *Heat shock transcription factors*

**HSP** – proteini toplinskog šoka

**MDA** – malondialdehid

**NADPH** – nikotinamid-adenin-dinukleotidfosfat

**PBS** – fosfatni pufer

**RdDM** – metilacija DNA posredovana molekulama RNA, engl. *RNA-directed DNA methylation*

**ROS** – reaktivni oblici kisika

**SDS** – natrijev dodecil sulfat

**SDS-PAGE** – natrijev dodecil sulfat–poliakrilamid gel elektroforeza

**SOD** – superoksid dismutaza

**TBA** – tiobarbiturična kiselina

**TBARS** – reaktivni spojevi tiobarbiturične kiseline

**TCA** – triklorooctena kiselina

**TEMED** – tetrametiletildiamin

**VIM** – engl. *Variant in methylation*



# SADRŽAJ

<b>1. UVOD .....</b>	<b>1</b>
1.1. Globalno zatopljenje i toplinski stres .....	1
1.2. Učinci povišenih temperatura na biljke .....	2
1.2.1. Morfološki učinci .....	3
1.2.2. Učinci na proces fotosinteze .....	5
1.2.3. Oksidacijski stres .....	10
1.3. Mehanizmi odgovora biljaka na stres .....	12
1.3.1. Osmoliti .....	13
1.3.2. Proteini inducirani toplinom .....	14
1.3.3. Antioksidacijski mehanizmi .....	15
1.3.4. Epigenetske promjene .....	16
1.3.4.1. Metilacija DNA .....	16
1.3.4.2. RdDM mehanizam .....	17
1.4. Vrsta <i>Arabidopsis thaliana</i> kao modelni organizam .....	20
1.5. Cilj istraživanja .....	21
<b>2. MATERIJALI I METODE .....</b>	<b>22</b>
2.1. Materijali .....	22
2.1.1. Biljni materijal .....	22
2.1.2. Hranidbene podloge, kemikalije i puferi .....	22
2.2. Metode .....	28
2.2.1. Priprema hranidbene podloge za uzgoj klijanaca <i>A. thaliana</i> .....	28
2.2.2. Sterilizacija sjemenki <i>A. thaliana</i> i nasađivanje na podlogu .....	28
2.2.3. Izlaganje povišenoj temperaturi .....	29
2.2.4. Praćenje klijavosti i morfoloških promjena klijanaca .....	29
2.2.5. Određivanje količine fotosintetskih pigmenata .....	31
2.2.6. Određivanje stupnja lipidne peroksidacije .....	32
2.2.7. Određivanje količine slobodnog prolina u tkivu .....	33
2.2.8. Dokazivanje proteina toplinskog šoka imunokemijskom metodom .....	34
2.2.8.1. Određivanje koncentracije proteina i priprema uzoraka za elektroforezu .....	34

2.2.8.2. Razdvajanje proteina SDS-PAGE elektroforezom .....	35
2.2.8.3. Prijenos proteina na membranu i imunodetekcija.....	36
2.2.9. Statistička analiza.....	37
<b>3. REZULTATI .....</b>	<b>38</b>
3.1. Morfološki parametri .....	38
3.1.1. Postotak klijavosti .....	40
3.1.2. Duljina korijena .....	41
3.1.3. Biomasa po klijancu.....	42
3.2. Biokemijski parametri .....	43
3.2.1. Sadržaj fotosintetskih pigmenata .....	43
3.2.2. Količina MDA u tkivu .....	47
3.2.3. Količina slobodnog prolina u tkivu.....	48
3.2.4. Proteini toplinskog šoka.....	49
<b>4. RASPRAVA .....</b>	<b>51</b>
<b>5. ZAKLJUČAK.....</b>	<b>61</b>
<b>6. LITERATURA .....</b>	<b>62</b>
<b>7. ŽIVOTOPIS.....</b>	<b>68</b>

# 1.UVOD

## 1.1. Globalno zatopljenje i toplinski stres

Fenomen globalnog zatopljenja jedan je od najaktualnijih problema današnjice, u prvom redu zbog mnogih štetnih posljedica koje uzrokuje u okolišu i posljedično – živom svijetu. Glavna karakteristika globalnog zatopljenja je postupno, ali sigurno zagrijavanje Zemljine površine i najnižih slojeva atmosfere, što rezultira povećanjem prosječne globalne temperature na Zemlji. Zadnjih stotinu godina došlo je do najvećeg zagrijavanja Zemljine površine u posljednjih 1300 godina, pa je prosječna temperatura između 1906. i 2006. godine porasla za 0,6 – 0,9 °C, a prosječna globalna temperatura 2019. godine bila je za 1,1 °C viša nego u predindustrijsko vrijeme ([https://ec.europa.eu/clima/change/causes\\_hr](https://ec.europa.eu/clima/change/causes_hr)). Uzrok globalnog zatopljenja, prema mišljenju većine znanstvenika, značajno je povećanje koncentracije stakleničkih plinova u atmosferi, koji izazivaju „efekt staklenika“, odnosno zadržavanje sunčeve topline i zračenja na Zemlji (Hegerl i sur. 2019). Najzastupljeniji staklenički plinovi su ugljikov dioksid (CO<sub>2</sub>), metan (CH<sub>4</sub>), dušikovi oksidi i halogenirani ugljikovodici, a smatra se da se njihova koncentracija povećava uglavnom zbog ljudske aktivnosti (Lamb i sur. 2021). Primjerice, neki antropogeni procesi koji pridonose povećanju količine tih plinova (posebice CO<sub>2</sub>) su sljedeći: izgaranje fosilnih goriva u industrijskim postrojenjima, masovna sječa šuma za poljoprivredne površine, uzgoj stoke, gdje se oslobađa velika količina metana, proizvodnja umjetnih gnojiva i promet, pri čemu se oslobađa velika količina dušikovih oksida, te procesi proizvodnje polimera i plinova za rashladne uređaje koji emitiraju halogenirane ugljikovodike. Neki prirodni čimbenici kao što su oceanske struje i vulkanska aktivnost također pridonose globalnom zatopljenju, ali u znatno manjoj mjeri. Povišenje temperature na Zemlji može imati velike posljedice za okoliš, među kojima su najvažnije povlačenje ledenjaka, podizanje razine mora, vremenske nepogode te premještanje tropskih uvjeta prema sjeveru, zbog čega bi nestali mnogi ekosustavi, brojne vrste bi izgubile svoja prirodna staništa i bile podložnije bolestima. Nedavno zatopljenje u razdoblju od 2001. do 2008. godine pomaknulo je areale rasprostriranja mnogih vaskularnih biljaka na veće nadmorske visine u europskim planinskim regijama (Liu i sur. 2015).

Biljke kao sesilni organizmi bez mogućnosti promjene staništa, posebno su osjetljive kad nastupe nepovoljni temperaturni uvjeti. Tomu je tako jer uz nemogućnost kretanja i mijenjanja lokacije, za razliku od toplokrvnih životinja i ljudi, nemaju stalnu tjelesnu

temperaturu, već je ona ovisna o okolišu. Većina biljaka može tolerirati određeni raspon temperaturnih fluktuacija u okolišu, međutim, kad je prisutno povišenje temperature za približno 10 – 15 °C iznad njihova praga izdržljivosti, nastupa toplinski stres (Liu i He 2020). Prema nekim istraživanjima rađenim na modelnoj biljci uročnjaku (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh) predložena je klasifikacija topline na: a) tople temperature (raspon 22 – 27 °C), b) visoke temperature (raspon 27 – 30 °C) i c) ekstremno visoke temperature, zvane toplinski stres (raspon 37 – 42 °C), ovisno o biljnom odgovoru na te temperature (Liu i sur. 2015). Međutim, neka istraživanja rađena na pšenici (*Triticum aestivum* L.) pokazuju da je letalni temperaturni maksimum za uzgoj pšenice 47,5 °C, dok je maksimalna temperaturna granica nekih razvojnih procesa poput inicijacije listova 24 °C (Porter i Gawith 1999). Pojedine fenološke faze pšenice također pokazuju temperaturne varijacije, primjerice za indukciju cvatnje pšenice optimalna temperatura iznosi 21 °C, a maksimalna 31 °C, za razliku od faze vernalizacije koja se odvija pri optimalnoj temperaturi od 4,9 °C, dok je maksimalna 15,7 °C (Porter i Gawith 1999). Rod *Opuntia* (kaktus), koji pripada skupini kserofita – biljaka prilagođenih životu u izrazito suhim i nepovoljnim staništima, može preživjeti bez problema na temperaturama do 65 °C, a sjemenke lucerne (*Medicago sativa* L.) mogu izdržati i do 120 °C. Prema tome, toplinski stres je relativan pojam i specifičan je za svaku biljnu vrstu i poljoprivrednu kulturu, a vrijednosti minimalnih, optimalnih i maksimalnih temperatura uvelike ovise i o razvojnom stadiju neke biljke. U protekla tri desetljeća (1980. – 2008.), vrućina je uzrokovala smanjenje od 3,8 i 5,5% u globalnoj proizvodnji kukuruza i pšenice (Liu i sur. 2015). Procjenjuje se da globalni prinosi najšire rasprostranjenih poljoprivrednih kultura (pšenice, riže, kukuruza, soje i ječma) padaju za otprilike 0,6 – 8,9% za svaki 1 °C rasta temperature (Lobell i Field 2007). Trend smanjenja prinosa zbog nekvalitetnih usjeva, kao posljedica povišenih temperatura, uzrokuje velike ekonomske gubitke poljoprivrednih proizvođača te predstavlja prijetnju sigurnosti i opskrbi hranom u budućnosti.

## **1.2. Učinci povišenih temperatura na biljke**

Temperatura je jedan od najvažnijih abiotičkih čimbenika koji utječu na rast, razvoj i prinos biljaka. Temperatura biljaka najvećim dijelom ovisi o vanjskoj temperaturi zraka, iako jak utjecaj imaju i Sunčevo zračenje te strujanje zraka, dok temperatura tla ima manji utjecaj (Vukadinović i sur. 2014). Povišene temperature, za razliku od većine drugih abiotičkih čimbenika, mogu biljkama izazvati stres u samo nekoliko minuta (Wahid i sur. 2007). Učinci

toplinskoga stresa na različite značajke i procese kod biljaka ovise o intenzitetu i trajanju stresa te vrsti i razvojnom stadiju biljke (Prasad i Staggenborg 2008). Stopa razvoja pojedinih organa (npr. listova), kao i stopa razvoja biljke u cjelini, kvantitativno su ovisne o temperaturi (Prasad i Staggenborg 2008). Toplinski stres ne utječe samo na tranziciju iz jednoga razvojnog stadija u drugi već i određuje trajanje određenog stadija. Brojna istraživanja pokazuju kako su usjevi osjetljiviji na toplinski stres u reproduktivnom stadiju života nego u vegetativnom. U ekstremnijim slučajevima, kada su temperature okoliša previsoke (40 – 50 °C), dolazi do denaturacije ili inaktivacije biljnih enzima važnih za preživljavanje, što usporava razvoj, a nerijetko rezultira i smrću biljke (Vukadinović i sur. 2014). Visoke temperature također mogu uzrokovati smanjenje vode u tlu ili povećanu evapotranspiraciju te tako utjecati na vodni status biljke. Toplinski stres može uzrokovati brojna molekularna, biokemijska, fiziološka i morfološka oštećenja biljke, a njegov utjecaj odražava se u preživljavanju biljaka, njihovu rastu i razvoju, produkciji biomase i intenzitetu asimilacijskih procesa (Taiz i Zeiger 2002).

### **1.2.1. Morfološki učinci**

Učinci toplinskog stresa na morfološke značajke biljaka su mnogostruki jer djeluju na širok spektar procesa kao što su klijanje, rast i razvoj listova, stabljike i korijenova sustava, produkcija suhe tvari, iniciranje cvjetanja, formiranje cvatova, oprašivanje, oplodnja, rast i kvaliteta sjemenki i plodova (Prasad i Staggenborg 2008). Klijanje je proces koji ovisi o više okolišnih čimbenika, među kojima je i temperatura (uglavnom površinskog sloja tla) koja mora biti povoljna (Pevalek-Kozlina 2003). Visoke temperature mogu zaustaviti klijanje sjemenki, smanjiti ukupan postotak klijanja ili ugroziti vijabilnost klijanaca. Supraoptimalne temperature smanjuju ukupan postotak klijanja – brzina i kapacitet klijanja smanjuju se linearno s porastom temperature (Essemine i sur. 2010). Međutim, sjemenke nekih vrsta kao npr. lucerne (*Medicago sativa* L.) mogu podnijeti temperature i do 120 °C, a smatra se da je uzrok tomu njihova dehidriranost i latentno stanje u kojem mogu preživjeti mnogo više temperature nego hidrirane vegetativne stanice koje rastu. Toplinski stres skraćuje vrijeme ispune sjemenki nutrijentima, što rezultira manjom konačnom veličinom sjemenki (Prasad i Staggenborg 2008), čime se smanjuje vjerojatnost klijanja u nepovoljnim uvjetima. Klijavost je indikator kakvoće sjemena i u velikoj mjeri utječe na biomasu (Bukvić i sur. 2010), što upućuje na to da povišene temperature neizravno utječu i na ukupnu biomasu i biomasu po klijanču.

Jedna od morfoloških promjena uslijed izlaganja biljke povišenoj temperaturi je kloroza. Kada su biljke izložene toplinskom stresu, smanjuje se sadržaj klorofila, potičući starenje listova ili senescenciju, čiji je najjasniji pokazatelj kloroza (Hu i sur. 2020). Kloroza je bolesno stanje biljke koje karakterizira žuto obojenje listova i drugih zelenih organa, a nastaje kao posljedica gubitka klorofila uslijed manjka ili nedostatka potrebnih mikro i makro elemenata (Pevalek-Kozlina 2003). Jedan od najvažnijih mineralnih elemenata za biljni rast i razvoj je dušik (N), koji se nalazi u aminokiselinama, nukleinskim kiselinama, klorofilu i mnogim drugim spojevima koji sudjeluju u metaboličkim reakcijama (Taiz i Zeiger 2002). Toplinski stres može utjecati na aktivnost enzima koji asimiliraju dušik, smanjujući tako dostupnost dušika za biljku (Prasad i Staggenborg 2008). Osim navedene kloroze, manjak dušika može uzrokovati sušenje listova, nekrozu meristemskog vrška, nakupljanje antocijana uslijed viška ugljikohidrata te općenito slab i kržljiv rast biljaka (Pevalek-Kozlina 2003). Listovi su najtopliji dijelovi biljaka (Vukadinović i sur. 2014), a u slučaju suše biljke zatvaraju puči kako bi sačuvale vodu koja se gubi transpiracijom, pa posljedično tome, zbog smanjene stope hlađenja, temperatura listova može porasti za 4 do 5 °C. Povišene temperature mogu povećati stopu rasta listova i njihov broj (Prasad i Staggenborg 2008), a neka istraživanja na uročnjaku dokazuju pojavu hiponastije, odnosno intenzivan rast donje strane listova i produživanje hipokotila (Liu i sur. 2015). Ubrzani i preuranjeni rast listova povećava njihovu površinu, što rezultira bržom potrošnjom vode te manjom količinom vlage u tlu za kompletiranje životnog ciklusa (Pevalek-Kozlina 2003).

Umjereni stupanj toplinskog stresa smanjuje rast cijele biljke, uključujući i rast stabljike, što utječe na visinu biljke (Wahid i sur. 2007). Rast korijenova sustava ima vrlo uzak raspon optimalnih temperatura, zbog čega se za vrijeme toplinskog stresa često smanjuje broj korijenovih ogranaka te dužina i promjer korijenja (Prasad i Staggenborg 2008). Visoke temperature smanjuju stopu produkcije suhe tvari biljke, a u ekstremnim prilikama mogu je i zaustaviti (Essemine i sur. 2010). Neka istraživanja provedena na uročnjaku pokazala su da povišene ambijentalne temperature mogu ubrzati proces cvjetanja, jer uz to što potiču akumulaciju auksina i giberelina, inhibiraju transkripciju nekih represora cvjetanja (Liu i sur. 2015). S druge strane, u određenim okolnostima povišene temperature mogu odgoditi proces cvjetanja ili inhibirati razvoj razgranatih cvatova (Prasad i Staggenborg 2008). Procesi uključeni u fazu reprodukcije kao što su mikrosporogeneza i megasporogeneza, oprašivanje, vijabilnost peluda i njuške tučka, razvoj peludne cijevi, oplodnja i rani embrionalni razvoj vrlo su osjetljivi na toplinski stres (Feng i sur. 2014). Razvoj polena je posebno osjetljiv na

visoke temperature, koje mogu izazvati njegovu sterilnost, a time i izostanak oplodnje ili nepravilan razvoj sjemenki i plodova (Feng i sur. 2014; Kipp i Boyle 2013). Istraživanja na samooplodnoj rajčici (*Lycopersicon esculentum* Mill.) pokazala su da ako se polen formira na temperaturama višim od 25 °C, formira se tek 10% mase ploda (Vukadinović i sur. 2014). Nedostatak ili poremećaj bilo kojeg od navedenih reproduktivnih procesa smanjuje vjerojatnost oplodnje, povećava vjerojatnost abortusa embrija te dovodi do manjeg broja sjemenki i smanjenja kvalitete, ograničavajući time prinos usjeva i biljnu proizvodnju.

### **1.2.2. Učinci na proces fotosinteze**

Povišene temperature utječu na sve dijelove fotosintetskog aparata i na sve biokemijske reakcije uključene u fotosintezu, pa ću stoga najprije malo detaljnije opisati proces fotosinteze. Fotosinteza je najvažniji biokemijski proces na Zemlji, koji služi kao izvor energije za sve oblike života i životno važne procese. To je jedini proces u kojem se djelovanjem energije apsorbiranog Sunčeva zračenja anorganske tvari iz okoliša pretvaraju u organske spojeve. Tijekom fotosinteze svjetlosna se energija pretvara u kemijsku energiju, pomoću koje se ugljikov dioksid iz atmosfere i voda ugrađuju u organske molekule, odnosno ugljikohidrate, uz oslobađanje kisika. Organizmi koji mogu iskoristavati Sunčevu energiju i fotosintetizirati su autotrofni organizmi – većina biljaka, neke alge i fotosintetske bakterije, za razliku od heterotrofnih organizama u koje se ubraja većina bakterija, gljive, životinje i ljudi, koji su ovisni o organskim spojevima koje su sintetizirali autotrofi. Fotosinteza je vrlo kompleksan skup fizikalno-kemijskih reakcija koji obuhvaća reakcije oksidacije i redukcije, a koje se tradicionalno dijele na reakcije ovisne o svjetlosti i reakcije u tami. Svjetlosne reakcije ili primarne reakcije fotosinteze odvijaju se u specijaliziranim tilakoidnim membranama kloroplasta, dok se reakcije neovisne o svjetlosti ili sekundarne reakcije fotosinteze, koje se često još nazivaju i Calvinovim ciklusom, odvijaju u stromi kloroplasta (Pevalek-Kozlina 2003).

Najaktivnije fotosintetsko tkivo vaskularnih biljaka je mezofil lista zbog toga što sadrži najveći broj kloroplasta – plastida u kojima je smješten najvažniji fotosintetski pigment klorofil (Pevalek-Kozlina 2003). Kloroplasti su stanični organeli ovalnog oblika, duljine oko 4 – 6 µm, obavijeni ovojnicom sačinjenom od vanjske i unutrašnje membrane, između kojih je međumembranski prostor. Unutar ovojnice nalazi se stroma – prostor koji sadrži kružnu molekulu DNA, odnosno plastom, koji može kodirati kloroplastne proteine, što kloroplaste





Svjetlosne reakcije ili primarni procesi fotosinteze odvijaju se u tilakoidnim membranama kloroplasta i osnovna uloga im je pretvaranje Sunčeve energije u kemijsku, koja se pohranjuje u dva spoja – NADPH (nikotinamid-adenin-dinukleotidfosfat), koji je izvor visokoenergiziranih elektrona, i ATP (adenozin-trifosfat), koji služi kao izvor energije za kasnije reakcije. Dijele se na fotofizičke i fotokemijske reakcije (Vukadinović i sur. 2014). Fotofizičke reakcije obuhvaćaju: (1) apsorpciju svjetlosne energije pomoću kompleksa pigment-protein, (2) ekscitaciju (pobuđivanje) i deekscitaciju klorofila te (3) prijenos energije do reakcijskog središta u fotosistemima. Fotokemijske reakcije uključuju: (1) transport elektrona s pobuđenog klorofila u reakcijskom središtu na akceptorsku molekulu pomoću različitih prenositelja, (2) fotolizu vode te (3) pohranjivanje energije u formirane primarne produkte (ATP i NADPH) koji su potrebni za odvijanje reakcija neovisnih o svjetlosti. Prijenos pobuđenih elektrona od klorofila na primarnu akceptorsku molekulu putem redoks-reakcija tijekom kojih se klorofil oksidira, a akceptor elektrona reducira, reakcija je pretvorbe svjetlosne energije u kemijsku. Molekule pigmenata u kompleksu s proteinima unutar fotosintetskih membrana čine svjetlosne sustave ili fotosisteme. Fotosistemi sadrže reakcijsko središte ili jezgru fotosustava, odnosno specifičnu dimernu formu klorofila *a* koja može pokrenuti svjetlosne reakcije tako što će predati svoj ekscitirani elektron molekuli primarnog akceptora, te antena kompleks – klorofila i karotenoide s pripadajućim proteinima koji služe kao antene za hvatanje svjetlosti i prevođenje energije do reakcijskog središta (Vukadinović i sur. 2014; Pevalek-Kozlina 2003). U tilakoidnim membranama kloroplasta postoje dva tipa fotosistema – fotosistem I i fotosistem II. Fotosistem I u svom reakcijskom središtu ima specifičnu molekulu klorofila *a* – P700, koja maksimalno apsorbira svjetlost valne duljine od 700 nm, a u reakcijskom središtu fotosistema II nalazi se molekula klorofila *a* oznake P680 koja maksimalno apsorbira svjetlost valne duljine od 680 nm. Fotosistemi su fizički i kemijski odvojeni, a povezuje ih transportni lanac elektrona. Elektroni pobuđeni svjetlošću se iz reakcijskog središta fotosistema II prenose pomoću kompleksa plastokinona i citokroma te plastocijanina u reakcijsko središte fotosistema I. Fotoaktivirani fotosistem I reducira  $\text{NADP}^+$  do NADPH pomoću feredoksina (Fd) i feredoksin-NADP reduktaze. Transport elektrona dovodi do nastanka protonskoga gradijenta kroz tilakoidnu membranu, a zatim difuzija protona iz tilakoidnog prostora u stromu pokreće ATP sintazu koja sintetizira ATP (Taiz i Zeiger 2002).

Calvinov ciklus ili sekundarni procesi fotosinteze odvijaju se u stromi kloroplasta, a njihova osnovna uloga je redukcija ugljikovog dioksida do ugljikohidrata uz pomoć NADPH i

ATP-a nastalih u svjetlosnim reakcijama. ATP se koristi kao izvor energije, a NADPH kao izvor elektrona nužnih za redukciju. Mehanizam Calvinovog ciklusa, koji se još naziva fotosintetski C<sub>3</sub>- redukcijski ciklus ugljika (jer je prvi produkt šećer koji sadrži 3 C atoma), koriste svi fotosintetski eukarioti. Calvinov ciklus dijeli se na tri faze: (1) karboksilacija akceptora CO<sub>2</sub> i stvaranje 3-fosfoglicerata, (2) redukcija do ugljikohidrata u obliku gliceraldehid-3-fosfata i (3) regeneracija akceptora CO<sub>2</sub> (Pevalek-Kozlina 2003). Ciklus počinje vezanjem molekule CO<sub>2</sub> na molekulu akceptora, odnosno ribuloza-1,5-difosfata, a tu egzergonu reakciju katalizira enzim ribuloza-1,5-difosfat-karboksilaza-oksigenaza. Kao rezultat te karboksilacije nastaje 3-fosfoglicerat, koji je prvi stabilni međuspoj ciklusa, te se fosforilira do 1,3-difosfoglicerata, koji se reducira do gliceraldehid-3-fosfata, iz čijih se molekula kasnije iznova regenerira ribuloza-1,5-difosfat, nužan za konstantnu fiksaciju CO<sub>2</sub> (Vukadinović i sur. 2014; Pevalek-Kozlina 2003). Za sintezu jednog ekvivalenta krajnjeg šećera heksoze potrebna je fiksacija šest molekula CO<sub>2</sub>, uz utrošak 18 molekula ATP-a i 12 molekula NADPH, što znači da se za svaku fiksiranu molekulu CO<sub>2</sub> po ciklusu troše dvije molekule NADPH i tri molekule ATP-a.

Biljke mogu fotosintetizirati u velikom rasponu temperatura, od približno 0 do 50 °C, međutim za većinu biljnih vrsta optimalni raspon temperatura za fotosintezu je između 20 i 30 °C (Wahid i sur. 2007). Proces fotosinteze je osjetljiv na visoke temperature koje mogu smanjiti intenzitet fotosinteze ili ju potpuno inhibirati. Smatra se da umjereni toplinski stres uzrokuje reverzibilne promjene, ali teški stres (koji podrazumijeva uglavnom temperature iznad 40 °C) trajno oštećuje fotosintetski aparat (Salvucci i Crafts-Brandner 2004). Toplinski stres, osobito tijekom reproduktivnog razvoja, potiče prerano starenje biljaka i utječe na ultrastrukturu mezofilnog tkiva, što rezultira reduciranjem fotosintetskih aktivnosti (Feng i sur. 2014). Pod utjecajem visokih temperatura kloroplasti postaju jako osjetljivi, što se očituje u promjeni morfologije i fizioloških funkcija (Hu i sur. 2020). Feng i sur. (2014) svojim su istraživanjima na varijetetima pšenice uočili brojne morfološke modifikacije kloroplasta, poput promjene originalnog ovalnog oblika u nabrekli okrugli, uništenih vanjskih i unutrašnjih membrana, labavo organiziranih grana-tilakoida te pojave gustih globula raspadnutih membranskih lipida. U tom promijenjenom stanju kloroplasti su podložni djelovanju proteolitičkih enzima koji degradiraju kloroplastne proteine i pigmente u kompleksu s njima. Od proteinskih kompleksa tilakoidnih membrana kloroplasta najosjetljiviji na toplinski stres je fotosistem II, koji se smatra najtermolabilnijom komponentom fotosintetskog aparata jer može propadati već pri 30 °C (Hu i sur. 2020;

Salvucci i Crafts-Brandner 2004). Pri povišenim temperaturama, uslijed povećane fluidnosti tilakoidnih membrana, proteinski kompleksi fotosistema II mogu otpasti s tilakoidnih membrana ili izgubiti svoj integritet, što utječe na druge fotosintetske procese kao što su fotokemijske reakcije, transport elektrona i fotofosforilacija, odnosno sinteza ATP-a (Hu i sur. 2020; Prasad i Staggenborg 2008). Smanjena fotokemijska učinkovitost fotosistema II uzrokuje redukciju apsorpcije svjetlosne energije i smanjenu stopu prijenosa i pretvorbe ekscitacijske energije u reakcijskim središtima.

Toplinski stres također utječe na biosintezu i razgradnju klorofila, najvažnijeg pigmenta koji sudjeluje u primarnim reakcijama fotosinteze. U proces biosinteze klorofila uključen je niz enzimatskih reakcija koje mogu biti inhibirane ili usporene pod utjecajem povišenih temperatura, što rezultira smanjenim razinama klorofila u listovima ili njegovim nedostatkom (Li i sur. 2018). Ako su u listovima sintetizirane normalne razine klorofila, one mogu jako varirati uslijed izloženosti biljaka toplinskom stresu, jer može doći do razgradnje klorofila i prevladavanja ksantofila i karotenoida, što se očituje u klorozi, tj. promjeni boje listova iz zelene u žućkastosmeđu. Membransko „prokapavanje“ zbog uništavanja strukture tilakoidnih membrana može potaknuti izlivanje molekula klorofila u stromu, gdje se vjerojatno degradiraju (Kipp i Boyle 2013). Enzim klorofilaza katalizira degradaciju klorofila tako što cijepa fitol iz molekule klorofila i uklanja magnezij iz središta, što dovodi do nastanka intermedijarnog produkta feofitina (Pevalek-Kozlina 2003). Smatra se i da neki oblici peroksidaza sudjeluju u razgradnji klorofila i redukciji njegove količine jer se aktiviraju pri povišenim temperaturama (Hu i sur. 2020). Feng i sur. (2014) su u svojim eksperimentima na kultivarima pšenice zaključili da toplinski stres uzrokuje gubitak pigmenata u listovima jer su izmjerili smanjenje sadržaja klorofila *a* i *b* te karotenoida u oba kultivara. Kipp i Boyle (2013) su u eksperimentima na uročnjaku izmjerili smanjenje koncentracije klorofila za 41.4% kod biljaka tretiranih visokim temperaturama. Pri mjerenju koncentracije klorofila u biljkama mjere se različiti parametri (klorofil *a* i *b*, klorofil *a+b* i klorofil *a/b*), a abnormalnosti u vrijednostima bilo kojega od njih mogu biti indikator toplinskog stresa (Minocha i sur. 2009).

Temperaturne promjene također imaju snažan utjecaj na stopu fiksacije CO<sub>2</sub> i aktivnost enzima Rubisco. Recentna istraživanja pokazala su da je inhibicija fotosinteze u korelaciji sa smanjenjem aktivacijskog stanja i katalitičkog djelovanja enzima Rubisco u C<sub>3</sub> i C<sub>4</sub> biljkama (Salvucci i Crafts-Brandner 2004). Rubisco-aktivaza, ATP-azni protein koji čini aktivno mjesto Rubisca katalitički kompetentnim, izrazito je osjetljiv na povišene temperature

te je sklon denaturaciji i agregaciji u netopljive komplekse čak pri umjerenom toplinskom stresu (Hu i sur. 2020; Salvucci i Crafts-Brandner 2004). Sukladno tome, s porastom temperature opada njegova sposobnost održavanja Rubisca u aktivnoj formi jer je stopa deaktivacije brža. Rubisco nekad može biti deaktiviran zbog termički ubrzanog procesa formiranja konačnih produkata katalizirane reakcije (Feng i sur. 2014). Katalitička aktivnost enzima, pa tako i Rubisca, raste s porastom temperature, međutim, topljivost CO<sub>2</sub> i afinitet Rubisca za CO<sub>2</sub> opadaju, a topljivost i koncentracija kisika u međustaničnim prostorima lista raste, jednako kao i afinitet Rubisca za kisik. Dakle, pri višim temperaturama je oksigenazna aktivnost enzima Rubisco snažnija od karboksilazne, uslijed čega je stimulirana fotorespiracijska aktivnost, a fotosintetska učinkovitost smanjena. Visoke temperature mogu inhibirati i stanično disanje, ali se stopa fotosinteze smanjuje brže od stope disanja (Pevalek-Kozlina 2003).

### 1.2.3. Oksidacijski stres

Brojni okolišni čimbenici, među kojima su povišene temperature, često su popraćeni pojavom oksidacijskog stresa. Oksidacijski stres je kompleksni kemijski i fiziološki fenomen koji prati većinu abiotičkih i biotičkih stresova u višim biljkama, a nastaje kao posljedica pretjerane produkcije i akumulacije reaktivnih kisikovih oblika (ROS-a) (Demidchik 2015). Aerobni organizmi proizvode reaktivne kisikove oblike u kontroliranim količinama u zdravim stanicama, međutim, pri povišenim temperaturama dolazi do neravnoteže između produkcije reaktivnih kisikovih intermedijera i mogućnosti njihove detoksifikacije, odnosno uklanjanja (Kipp i Boyle 2013). Termin ROS označava ponekad izrazito toksične kratkoživuće vrste aktiviranog kisika koje mogu nespecifično reagirati s organskim molekulama i oštećivati sustave staničnih membrana (Demidchik 2015; Mansoor i Nasir Naqvi 2013). Najčešći ROS-i u biološkim sustavima odgovorni za indukciju oksidacijskog stresa su singletni kisik (<sup>1</sup>Δg O<sub>2</sub>), superoksidni radikal (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>), vodikov peroksid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) i hidroksilni radikal (•OH) (Demidchik 2014; Mansoor i Nasir Naqvi 2013).

Kisik je u osnovnom, tripletnom stanju (<sup>3</sup>O<sub>2</sub>), inertna molekula, ali u određenim okolnostima, kao što je npr. „curenje“ elektrona iz biljnih transportnih lanaca elektrona, može primiti elektron, što rezultira stvaranjem mnogo reaktivnijeg superoksidnog radikala. Superoksidni radikal ne može kemijski modificirati biološke makromolekule, ali može reducirati druge ROS, pa se smatra pokretačem oksidacijskog stresa. Iz superoksidnog aniona

enzimskom konverzijom nastaje vodikov peroksid, iz kojeg cijepanjem dvostruke veze između dvaju kisika može nastati hidroksilni radikal. Vodikov peroksid je najstabilnija i najmanje reaktivna ROS molekula, slabi oksidans koji također kemijski ne modificira biološke makromolekule, a smatra se da može deaktivirati neke enzime kao npr. fruktoza bifosfatazu (Demidchik 2015). Ako se tijekom fotosinteze ekscitacijska energija s tripletnog stanja klorofila izravno prenese na kisik, nastaje singletni kisik (Pevalek-Kozlina 2003). Vrlo je reaktivan i nestabilan oblik koji burno reagira s proteinskim kompleksom fotosistema II, oštećuje DNA i RNA molekule te potencijalno ograničava rast i cvjetanje biljaka (Vukadinović i sur. 2014). Hidroksilni radikal tijekom oksidacijskog stresa uzrokuje najviše štete zbog toga što može modificirati biološki važne makromolekule, a može izazvati i staničnu smrt (Demidchik 2015).

Povišene koncentracije ROS u biljkama utječu na sve stanične komponente, od organela do bioloških makromolekula. Oksidacijski stres ponekad može izazvati nepovratnu štetu koja se manifestira denaturacijom proteina i nekih važnih regulatornih enzima poput specifičnih kinaza i fosfataza, mutacijama molekule DNA, modifikacijama ugljikohidrata i lipidnom peroksidacijom (Demidchik 2015; Mansoor i Nasir Naqvi 2013). Kao što je ranije spomenuto, toplinski stres često dovodi i do oksidacijskog stresa. Kipp i Boyle (2013) su ispitali učinke toplinskog stresa na vrstu *A. thaliana* te su utvrdili da kod biljaka koje su bile izložene visokim temperaturama postoji za 68,30% veća koncentracija ROS-ova, posebice onih koji uzrokuju lipidnu peroksidaciju, u odnosu na kontrolnu skupinu. Mansoor i Nasir Naqvi (2013) istraživali su učinke toplinskog stresa na lipidnu peroksidaciju i stvaranje antioksidacijskih enzima kod sjemenki četiriju različitih genotipa zlatnoga graha (*Vigna radiata* L.) koje su bile uzgajane na različitim temperaturama. U svim genotipovima koji su bili izlagani letalnim temperaturama (50 °C) zabilježili su najveće koncentracije terminalnih produkata lipidne peroksidacije i najmanje razine antioksidacijskih enzima, što je rezultiralo oštećenjem membrana i smanjenim rastom sjemenki.

Lipidna peroksidacija je jedna od najistraživanijih posljedica oksidacijskog stresa, prilično toksičan proces koji potiče stvaranje slobodnih radikala u lančanim reakcijama. Često se koristi kao indikator membranskih oštećenja jer negativno utječe na strukture i funkcije staničnih membranskih sustava koji su jako podložni oksidacijskom stresu. Povećava fluidnost membrana, što rezultira membranskim „curenjem“, odnosno propuštanjem biološki i fiziološki aktivnih tvari i gubitkom primarne barijerne funkcije, čime se narušava integritet membrana i integralnih membranskih proteina i enzima te fiziološka funkcija ostalih važnih

molekula i organela (Demidchik 2015; Vukadinović i sur. 2014; Prasad i Staggenborg 2008). Započinje interakcijom hidroksilnog radikala ili singletnog kisika s dvostrukim CH (ugljik-vodik) vezama polinezasićenih masnih kiselina fosfolipidnog dvosloja, koje slabe i gube vodikov kation (Demidchik 2015), nakon čega slijede lančane reakcije u kojima se lipidi pretvaraju u toksične aldehide i ketone. To su relativno agresivne supstance, kao npr. terminalni produkt oksidacije polinezasićenih masnih kiselina – malondialdehid (MDA), koji se koristi kao indeks generalne lipidne peroksidacije (Hodges i sur. 1999). MDA pripada skupini tvari niske molekularne mase koje reagiraju s tiobarbituričnom kiselinom (TBARS), a nastaju kao krajnji produkti dekompozicijom drugih elemenata u procesu lipidne peroksidacije (Kipp i Boyle 2013). Razina oksidacijskog stresa, tj. lipidne peroksidacije je ekvivalentna količini MDA. Smatra se, prema nekim istraživanjima, da MDA može oksidirati neke aminokiseline poput lizina i histidina (Demidchik 2015).

Iako nagli porast reaktivnih kisikovih oblika uzrokuje štetu biljnim stanicama, njihova sinteza je neophodna jer imaju važnu ulogu u razvojnim procesima i staničnoj signalizaciji te u toleranciji biotičkih i abiotičkih stresnih uvjeta. Kao signalne molekule ROS pokreću imunološki sustav biljaka, signalizirajući biljci opasnost aktiviranjem ionskih kanala  $\text{Ca}^{2+}$  i  $\text{Mg}^{2+}$ , što pomaže biljci da se prilagodi na razne abiotičke i biotičke stresove (Vukadinović i sur. 2014). Također, ROS reguliraju aktivnost brojnih proteina uključenih u posttranslacijsku modifikaciju, kao što su primjerice fosfataze, kojom se ostvaruju brzi stanični odgovori, bez potrebe za *de novo* sintezom proteina (Baxter i sur. 2014).

### **1.3. Mehanizmi odgovora biljaka na stres**

Biljke, kao sesilni organizmi vezani uz svoje mjesto rasta i stanište, imaju ograničenu mogućnost izbjegavanja nepovoljnih okolišnih uvjeta u svojoj blizini. Iz tog razloga su tokom evolucije razvile sofisticirane zaštitne mehanizme kako bi preživjele i prilagodile se utjecaju različitih štetnih okolišnih čimbenika poput abiotičkog stresa u obliku povišenih temperatura ili suše. Svrha tih zaštitnih mehanizama je regulacija biljnog rasta, razvoja, reprodukcije i imuniteta kao odgovor biljaka na unutarnje i vanjske stresne signale, čime se stvara tolerancija na stres (Liu i He 2020). Tolerancija na stres biljkama omogućava da izbjegnu ili minimiziraju potencijalnu štetu nastalu uslijed izlaganja nepovoljnim uvjetima. Biljne obrambene strategije su rezultat evolucijskih promjena, prirodne selekcije i nasljednih mutacija (Taiz i Zeiger 2002).

Postoje dva osnovna oblika biljne prilagodbe na abiotске i biotске stresove: aklimatizacija i adaptacija. Aklimatizacija podrazumijeva porast tolerancije na stres, kao rezultat prijašnjeg izlaganja nepovoljnim uvjetima, za razliku od adaptacije koja je genetski određena razina otpornosti na stres, stečena procesom selekcije kroz mnogo generacija (Pevalek-Kozlina 2003; Taiz i Zeiger 2002). U biljaka također postoje dvije vrste tolerancije na toplinski stres – bazalna i stečena termotolerancija. Bazalna termotolerancija je urođena sposobnost biljaka da odgovore i uspješno se prilagode na toplinski stres, dok stečena termotolerancija podrazumijeva sposobnost biljaka da prežive izlaganje letalno visokim temperaturama nakon aklimatizacije na umjereni toplinski stres (Liu i He 2020; Liu i sur. 2015). Biljke se mogu prilagoditi uvjetima toplinskog stresa, takozvanim „otvrdnjivanjem“, odnosno izlaganjem različitim stresnim temperaturama u različitim periodima, i time steći povećan raspon tolerancije i adaptivnih sposobnosti. Istraživanja provedena na rajčici pokazala su da izlaganje sjemenki rajčice temperaturi od 60 °C tijekom jednoga ili dva sata umanjuje štetni utjecaj povišenih temperatura za vrijeme klijanja i rasta (Ibrahim i El-Muqadam 2019). Učinkovitost otvrdnjivanja, odnosno očvršćivanja biljaka, proporcionalna je trajanju izlaganja stresu i intenzitetu temperature. Adaptaciju i aklimatizaciju na okolišni stres čine integrirani događaji na svim razinama biološke organizacije, od anatomskih i morfoloških do staničnih, biokemijskih i molekularnih (Taiz i Zeiger 2002). Neke od najznačajnijih morfoloških prilagodbi na visoke temperature su orijentacija lista, dlačice i voskovi na listovima koji reflektiraju svjetlost, povećana površina lista zbog transpiracijske učinkovitosti, povećana razgranatost i dubina korijenja za lakši dovod vode itd., kojima biljka može izbjeći štetne učinke stresa (Prasad i Staggenborg 2008). Na biokemijskoj razini najvažnije biljne prilagodbe na toplinski stres uključuju osmoregulaciju i sintezu proteina, među kojima su najvažniji proteini toplinskog šoka HSP (*Heat Shock Proteins*), različite antioksidacijske mehanizme, kao i epigenetske promjene.

### **1.3.1. Osmoliti**

Kao jedna od posljedica izlaganja biljaka stresnim uvjetima okoliša javlja se i narušena ravnoteža vodnog potencijala u stanicama, odnosno dehidracija tkiva, najčešće zbog suše koja je često uzrokovana toplinskim stresom. Kao odgovor na osmotski disbalans u organizmu biljke su producirale kompatibilne osmolite – zaštitne tvari čija je primarna uloga održavanje osmotske ravnoteže u svrhu očuvanja staničnog integriteta (Kalsoom i sur. 2016). Biljke mogu primati vodu iz tla samo ako je njihov vodni potencijal negativniji od onoga u

tlu, međutim zbog suše i povećanog saliniteta vodni potencijal tla se dosta smanjuje. Kako bi mogle primiti vodu, biljke moraju smanjiti svoj vodni potencijal pomoću osmotskih prilagodbi, odnosno kompatibilnih osmolita. Osmoliti su različite otopljene tvari, uglavnom organski spojevi, s ponašanjem anorganskih iona koji se nakupljaju u stanici i smanjuju vodni potencijal bez popratnog smanjivanja turgora i volumena stanice te omogućuju biljci lakše primanje i zadržavanje vode u stanicama (Taiz i Zeiger 2002). Osim toga, poznato je da imaju i ulogu u uklanjanju slobodnih radikala, stabilizaciji substaničnih struktura i regulaciji koenzima. Najčešći osmoliti su prolin, kvartarni amini glicin-betain i prolin-betain te šećerni alkoholi manitol i pinitol (Kalsoom i sur. 2016). Prolin je neesencijalna  $\alpha$ -aminokiselina polarne prirode koja ima cikličku strukturu i sekundarnu imino skupinu. Njezina je prekomjerna proizvodnja u biljkama često pokazatelj različitih stresova, posebice osmotskog, a time i pokazatelj fiziološkog statusa biljke i tolerancije na stres (Linić i sur. 2019).

### **1.3.2. Proteini inducirani toplinom**

Proteini, kao temelj građe protoplazme, su vrlo osjetljivi na visoke temperature, pa su zbog toga pri izloženosti biljaka toplinskom stresu lako podložni denaturaciji i agregaciji (Hu i sur. 2020). Toplinski stres uzrokuje razmatanje i pogrešno slaganje mnogih proteina u stanici koji funkcioniraju kao enzimi ili strukturalne komponente, dovodeći time do gubitka njihove ispravne strukture i aktivnosti, što često rezultira njihovom agregacijom i taloženjem te stvaranjem ozbiljnih problema u stanici (Taiz i Zeiger 2002). Kako bi izbjegle takve situacije i očuvale strukturu i vitalne sposobnosti proteina, biljke su razvile više zaštitnih proteina, odnosno proteine toplinskog šoka ili HSP (*Heat Shock Proteins*). Nagli porast temperature (oko 5 – 10 °C), te ponekad osmotski i oksidacijski stres, induciraju njihovu sintezu (Vukadinović i sur. 2014). Transkripcijski faktori toplinskog šoka ili HSF (*Heat shock transcription factors*) reguliraju ekspresiju HSP gena koji kodiraju za proteine toplinskog šoka tako što prepoznaju HSE (*Heat shock cis element*) koji je konzerviran u promotorima HSP gena (Hu i sur. 2020). HSP i HSF su središnji faktori u stečenoj termotoleranciji kod biljaka te igraju ključnu ulogu u signalnoj transdukciji toplinskog stresa (Liu i sur. 2015). Smatra ih se zaštitnim tvarima, a njihovom primarnom ulogom obnova proteina oštećenih visokim temperaturama. Uglavnom djeluju kao šaperoni, uključeni u posttranslacijsko slaganje i sastavljanje proteina, pokušavajući presložiti krive i agregirane proteine te prevenirati razmatanje (Liu i sur. 2015). Mogu biti smješteni u jezgri, mitohondrijima, kloroplastima, endoplazmatskom retikulumu i citosolu. Na temelju molekularne mase



podijeljeni su u pet razreda: HSP100, HSP90, HSP70, HSP60 i mali HSP-ovi molekularne mase između 15 – 30 kDa (Liu i sur. 2015). U posljednje vrijeme intenzivno se proučava uloga HSP70 jer je uočeno da ima važnu ulogu u termotoleranciji te da regulira aktivnost HSF (Lee i Schöffl 1996). Neki od proteina toplinskog šoka, uključujući HSP70, imaju ulogu i u normalnom metabolizmu i prisutni su pri fiziološkim temperaturama, ali se njihova koncentracija povećava nakon temperaturnog šoka, uslijed čega biljke pokazuju pojačanu toleranciju na visoke temperature i toleriraju temperature koje bi prije bile letalne.

### **1.3.3. Antioksidacijski mehanizmi**

Kako bi preživjele uvjete oksidacijskog stresa koji se javlja u uvjetima svakog abiotičkog stresa, pa tako i toplinskog, biljke su s vremenom razvile različite obrambene strategije koje uključuju aktivaciju i *de novo* sintezu enzimatskih i neenzimatskih spojeva čija je svrha izravno uklanjanje reaktivnih kisikovih oblika i slobodnih radikala. Enzimi se vežu za specifične supstrate, odnosno ROS-ove, i neutraliziraju ih, a najvažniji antioksidacijski enzimi su superoksid dismutaza (SOD), katalaza (CAT), askorbat peroksidaza (APX) i gvajakol peroksidaza (G-POD). SOD se nalazi u matriksu kloroplasta i tilakoidnim membranama i smatra se primarnom linijom obrane od ROS-a jer uklanja superoksidni radikal reducirajući ga na O<sub>2</sub> i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Demidchik 2015; Vukadinović i sur. 2014). Različiti tipovi katalaza i peroksidaza reguliraju razinu vodikovog peroksida u stanicama, katalizirajući njegovu redukciju do kisika i vode (Mansoor i Nasir Naqvi 2013). Dosta bitan antioksidacijski enzim je i glutation peroksidaza (GPX), koji sudjeluje u redukciji različitih lipidnih hidroperoksida (Mohi-Ud-Din i sur. 2021). Mehanizam razgradnje hidroksilnog radikala nije još razjašnjen, ali eliminiranjem prethodna dva radikala je inhibiran njegov nastanak. Istraživanja pokazuju povezanost viših koncentracija antioksidacijskih enzima s otpornošću na toplinski stres kod različitih varijeteta pšenice (Mohi-Ud-Din i sur. 2021). U stanicama su prisutni i neenzimatski antioksidansi koji djeluju kao nespecifične, odnosno neselektivne stupice za različite ROS-ove, kao npr. askorbat, glutation, prolin, neki flavonoidi i tokoferoli (Demidchik 2015).

### **1.3.4. Epigenetske promjene**

Brojna recentna istraživanja sve više naglašavaju ulogu epigenetske regulacije u kontroli stresa kod biljaka. Epigenetska regulacija podrazumijeva različite epigenetske mehanizme koji mogu izazvati dugoročne promjene u ekspresiji gena i staničnom fenotipu. Ti mehanizmi su signali iz okoline koji su „iznad gena“, odnosno ne mijenjaju raspored baza u DNA sekvenci, ali mogu uzrokovati modifikacije kromatina i molekule DNA, koje se manifestiraju u promjenama ekspresije i funkcije gena, što dovodi do povećane fleksibilnosti genoma i može se prenositi na slijedeće generacije (Vukadinović i sur. 2014). Odgovori biljaka na različite stresove su često popraćeni epigenetskim promjenama strukture kromatina na različitim osjetljivim mjestima unutar genoma. Količina tih promjena u genomu ovisi o intenzitetu i trajanju stresa te biljnoj vrsti i razvojnom stadiju životnog ciklusa. U nekim slučajevima stresom inducirane modifikacije kromatina mogu se mejotički prenositi i dodijeliti memoriju „stresnog otiska“ bar sljedećoj generaciji potomaka pomoću mehanizama transgeneracijskog epigenetskog nasljeđa (Liu i He 2020).

#### **1.3.4.1. Metilacija DNA**

Metilacija molekule DNA je jedna od najčešćih i najistraživanijih epigenetskih modifikacija. Uključuje prijenos metilne skupine iz S-adenil metionina (SAM) na položaj petog ugljika citozinske baze u sekvenci DNA u obliku 5-metilcitozina (Mbichi i sur. 2020). Relativno je stabilna modifikacija koja se može održati i nakon procesa replikacije DNA i važan posrednik u biljnom odgovoru na abiotičke okolišne podražaje. Promjene u uzorku DNA metilacije u biljnim stanicama su često povezane s transkripcijskom regulacijom gena uključenih u odgovor na stres (Erdmann i Picard 2020). Istraživanjima na uročnjaku je uočena povećana stopa metilacije kod biljaka izloženih toplinskom stresu (Liu i sur. 2015). DNA metilacija u biljkama ima dvije osnovne uloge: zaštita genoma od mobilnih elemenata transpozona i regulacija genske ekspresije (Mbichi i sur. 2020; Chan i sur. 2005). Transpozoni su mobilni elementi koji pripadaju obitelji ponavljajućih gena i koji mogu mijenjati svoju poziciju unutar genoma te inducirati mutacije i kromosomsku nestabilnost. Toplinski stres može potaknuti njihovu aktivaciju i transpoziciju (Erdmann i Picard 2020). U genomskim regijama gdje je reducirana metilacija i prisutna aktivacija transpozona, često se pojavljuju razne vrste mutacija (Chan i sur. 2005). Prema tome, sve ponavljajuće sekvence je potrebno metilirati kako bi se održala stabilnost genoma. Metilacija DNA najčešće u promotorskoj regiji inhibira transkripciju gena regrutiranjem proteina uključenih u represiju gena ili

inhibicijom vezanja transkripcijskog faktora na promotore gena, a indirektno pomoću represivnih modifikacija proteina histona (Zhang i sur. 2018). Za razliku od promotorskih, metilacija kodirajućih regija uglavnom nema učinak na ekspresiju gena. DNA metilacija može poticati ekspresiju gena koji sudjeluju u odgovoru na stres te ima važnu ulogu tijekom rasta i razvoja. Promjene u DNA metilaciji mogu biti globalne (u cijelom genomu) ili samo na pojedinim lokusima (Chan i sur. 2005).

Biljke mogu metilirati citozine u simetričnim sekvencama CG i CHG (gdje je H bilo koji nukleotid) i asimetričnim sekvencama CHH (gdje je H = A, C ili T), a svaka od njih zahtijeva različite molekularne putove uspostavljanja i održavanja metilacije (Chan i sur. 2005). Metilacija CG simetrične sekvence je najčešća modifikacija u biljnom genomu, a uglavnom se pojavljuje u području kompaktnog heterokromatina, blizu centromera, iako može biti prisutna i u području eukromatina koje sadrži repetitivne sekvence (Zhang i sur. 2018; Chan i sur. 2005). Bisulfitnim sekvenciranjem genoma biljke *A. thaliana* otkriven je postotak metiliranosti određenih sekvenci koji potvrđuje dominaciju CG slijedova (24% CG, 6.7% CHG i 1.7% CHH), uglavnom na transpozonima (Liu i He 2020). Metiliranost simetričnih sekvenci molekule DNA u biljkama je uglavnom održavana s dva glavna enzima: DNA metiltransferaza 1 (MET1), za CG slijedove, i kromometilaza 3 (CMT3) za CHG slijedove (Chan i sur. 2005). Metilacija u simetričnim sekvencama može se održavati i nakon replikacije molekule DNA, na temelju metilacijskog uzorka u hemimetiliranom kalupu koji nastaje nakon razdvajanja lanaca, pomoću obitelji proteina VIM (*Variant in methylation*) koji vežu MET1, koja metilira novosintetizirani lanac molekule DNA (Chan i sur. 2005). Međutim, u CHH sekvenci metilacija citozina na hemimetiliranom kalupu nije moguća zbog njezine asimetričnosti, stoga se ona uspostavlja iznova u svakom staničnom ciklusu i naziva se metilacija DNA *de novo*. Budući da u toj metilaciji glavnu ulogu igra molekula RNA, naziva se još i metilacija DNA posredovana molekulama RNA ili RdDM (*RNA-directed DNA methylation*).

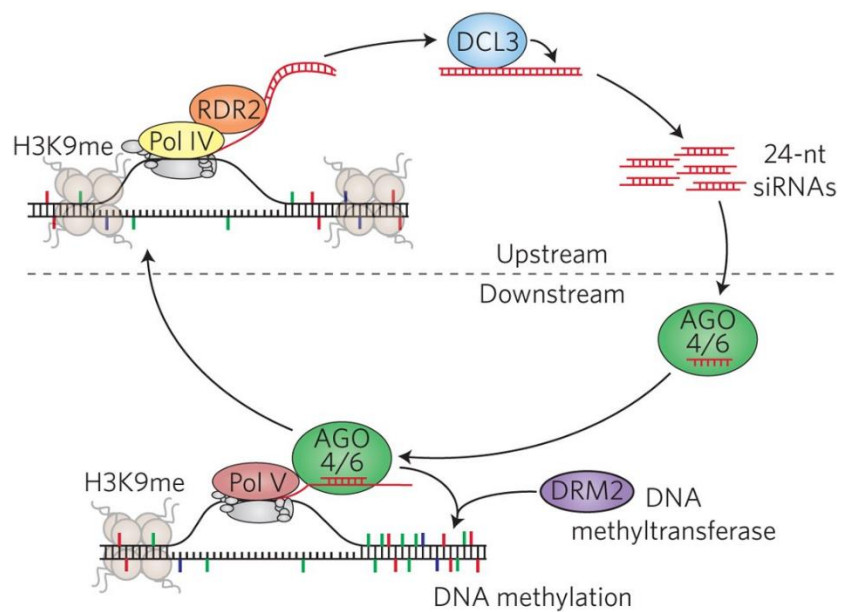
#### **1.3.4.2. RdDM mehanizam**

RdDM je jedini mehanizam u biljkama koji može uspostaviti metilaciju DNA *de novo* na prethodno nemetilirana mjesta u genomu, te jedini mehanizam koji može metilirati citozine neovisno o vrsti sekvence (Erdmann i Picard 2020). To je biološki proces u kojem nekodirajuće RNA molekule usmjeravaju metilaciju DNA na specifične sekvence u DNA

molekuli. RdDM primarno targetira male transpozone i njihove fragmente blizu gena koji su u otvorenim, eukromatinskim regijama genoma gdje se odvija genska ekspresija, pokušavajući ih inaktivirati i uspostaviti represivno heterokromatinsko stanje (Erdmann i Picard 2020). Pri izloženosti biljaka toplinskom stresu mnoge komponente RdDM puta postaju aktivirane, a biljke u kojima je bilo koja komponenta RdDM puta nefunkcionalna imaju smanjenu termotoleranciju, što ukazuje na njegovu bitnu ulogu u obrani od stresa (Erdmann i Picard 2020).

RdDM mehanizam koristi male, približno 18 – 30 nukleotida duge interferirajuće molekule RNA (siRNAs) koje mogu posredovati u posttranskripcijskom utišavanju gena kroz inhibiciju translacije ili u transkripcijskoj regulaciji gena pomoću metilacije (Liu i He 2020; Mbichi i sur. 2020). Kombinacija mnogih proteina i enzima zajedno s malim interferirajućim molekulama RNA čini kompleksan sustav RNA-posredovane metilacije (Slika 2). Male RNA molekule (siRNAs) generirane su pomoću enzima RNA polimeraze IV (Pol IV), koji prepisuje okolnu DNA. Protein RDR2 (RNA polimeraza ovisna o RNA) prepisuje jednolančane transkripte Pol IV u dvolančane molekule RNA (dsRNA). Novosintetizirane dsRNA protein DCL3 (*Dicer 3*) cijepa u 24 nukleotida duge siRNA, koje preuzima protein AGO4 ili AGO6 (*Argonaute*) te ih vodi do enzima polimeraze V (Pol V) i spaja s njegovim transkriptima. Nakon replikacije proteini SUVH2 i SUVH9, histon metiltransferaze koji prepoznaju metiliranu DNA na hemimetiliranom kalupu, dovode Pol V na te lokuse, koje ona transkribira u nove molekule RNA oko kojih se skupljaju ostali dijelovi puta RdDM. Protein AGO4/6 zatim komunicira s DNA metiltransferazom 2 (DRM2), čime je pozicionira na lokus koji je potrebno metilirati *de novo*, odnosno sekvencu DNA koju prepisuje Pol V (Erdmann i Picard 2020; Mbichi i sur. 2020).

Kako bi Pol V došla do svojih ciljnih mjesta u kromatinu za transkripciju, u RdDM sustavu mora biti prisutan kromatin remodelirajući DDR kompleks koji se sastoji od proteina DRD1 (*Defective in RNA-directed DNA methylation1*), proteina DMS3 (*Defective in meristem silencing3*) i proteina RDM1 (*RNA-directed methylation 1*) koji joj to olakšavaju (Erdmann i Picard 2020; Zhang i sur. 2018). U posljednje vrijeme sve se više proučava protein DMS3 kao neizostavna komponenta sustava RdDM i kompleksa DDR. Protein DMS3 sadrži domenu prisutnu u proteinima SMC (*Structural maintenance of chromosomes*) koji su zaduženi za strukturno održavanje i modeliranje kromosoma. Neophodan je u provođenju metilacije DNA *de novo* i uključen u utišavanje transpozona, odgovore na stres, imunost, reprodukciju i međustaničnu komunikaciju (Erdmann i Picard 2020).



Slika 2. Pojednostavljeni prikaz mehanizma metilacije DNA posredovane molekulama RNA (*RNA-directed DNA methylation*) i njegovih komponenti

(Izvor: preuzeto i prilagođeno iz Cuerda-Gil i Slotkin 2016)

## 1.4. Vrsta *Arabidopsis thaliana* kao modelni organizam

*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., odnosno uročnjak, jednogodišnja je zeljasta cvjetnica podrijetlom iz Euroazije i sjeverozapadne Afrike, koja naseljava širok raspon ekoloških i geografskih regija (Meinke i sur. 1998) (Slika 3). Pripada porodici krstašica ili kupusnjača (*Brassicaceae*). Najčešće naraste u visinu do približno 25 cm, a listovi joj se nalaze na cvjetajućoj stabljici te na dnu stabljike u obliku rozeta. Cvjetovi su organizirani u jednostavne cvatove, a plod je silikalni. Nije agronomski i ekonomski značajna vrsta, ali je zbog nekih svojih značajki postala najpoznatiji biljni modelni organizam u području genetike, molekularne biologije i botanike. Za početak, ima dosta kratak životni ciklus (približno 6 – 8 tjedana) te se jednostavno uzgaja i lako održava (Kipp i Boyle 2013). Također, ima relativno mali genom, u potpunosti sekvenciran, veličine 135 Mb (megabaznih parova), koji je organiziran u pet kromosoma i obuhvaća približno 20 000 gena, što ga čini najmanjim biljnim genomom (Taiz i Zeiger 2002). Cvjetovi se prirodno samooprašuju, a može se i vegetativno razmnožavati putem kulture tkiva u kontroliranim uvjetima. Postoje brojni ekotipovi iz prirodnih populacija, a kao referentni genotip koristi se ekotip Columbia (Col) (Meinke i sur. 1998). Navedene značajke omogućuju jednostavnu genetsku manipulaciju biljke, što je rezultiralo provedbom brojnih istraživanja na uročnjaku, koja su značajno doprinijela napretku u razumijevanju različitih procesa kod biljaka.



Slika 3. Odrasla biljka *Arabidopsis thaliana*

(Izvor: <https://www.nsf.gov/about/history/nifty50/arabidopsis.jsp>)

## 1.5. Cilj istraživanja

Cilj ovog rada je istražiti utjecaj povišene temperature na klijanje te morfološke i biokemijske parametre klijanaca uročnjaka s promijenjenom ekspresijom gena *DMS3*. Biljke divljeg tipa, mutanta *dms3-1* i linija s pojačanom ekspresijom *oeDMS3* (nazvana *6 TV*), bit će izložene različitim temperaturama kako bi se utvrdilo postoji li razlika u njihovom odgovoru, odnosno u otpornosti na toplinski stres s obzirom da je protein DMS3 važna komponenta sustava za metilaciju DNA uključenog u regulaciju genske ekspresije. Otpornost na toplinski stres bit će procijenjena mjerenjem količine fotosintetskih pigmenata i prolina te stupnja lipidne peroksidacije, koji su dobri pokazatelji stresa u biljkama, te dokazivanjem prisutnosti proteina HSP70, koji je pokazatelj toplinskog stresa.

## 2. MATERIJALI I METODE

### 2.1. Materijali

#### 2.1.1. Biljni materijal

U eksperimentalnom radu korištene su sjemenke vrste uročnjaka (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.) – ekotip Columbia, divljeg tipa (wt) te dviju linija koje imaju različitu ekspresiju gena *DMS3*. Sjemenke divljeg tipa (wt) poslužile su kao kontrola u kojoj je stopa DNA metilacije *de novo* standardna, u liniji *dms3-1* je gen *DMS3* mutiran, što rezultira sintezom nefunkcionalnog proteina DMS3 te smanjenom metiliranošću molekule DNA (Kanno i sur. 2008), dok je u transgeničnoj liniji *oeDMS3* (nazvana *6 TV*) gen *DMS3* pojačano eksprimiran (neobjavljeno).

#### 2.1.2. Hranidbene podloge, kemikalije i puferi

Za uzgoj klijanaca uročnjaka iz sjemena za podlogu je pripremljen kruti medij MSØ, pH vrijednosti 5,7. Za pripremu 1 L medija bilo je potrebno sljedeće:

- 1) 4,3 g MSØ modificirane hranidbene podloge po Murashige i Skoog (1962) proizvođača *Sigma*, čiji sastav je naveden u Tablici 1;
- 2) 0,568 g kalijeve soli 2-(N-morfolino) etansulfonske kiseline (MES-K) (*Sigma*);
- 3) 19,5 g saharoze (*Lach-Ner*);
- 4) 8,19 g agara (*Sigma*).

Za sterilizaciju sjemenki prije nasađivanja na ploče s hranjivim medijem korišten je 70%-tni etanol i otopina 1%-tnog (w/v) Izosana (*PLIVA sept*) s 0,1%-tnim (w/v) mukazolom, te sterilna dH<sub>2</sub>O (destilirana voda).



Tablica 1. Kemijski sastav hranidbene podloge MSØ za uzgoj klijanaca *Arabidopsis thaliana* (preuzeto i prilagođeno iz Murashige i Skoog 1962)

<b>SASTOJCI</b>	<b>MASENA KONCENTRACIJA (mg/L)</b>
<b>MAKROELEMENTI</b>	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650
KNO <sub>3</sub>	1900
CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	440
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	370
<b>MIKROELEMENTI</b>	
Na <sub>2</sub> EDTA	37,3
FeSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	27,8
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,2
MnSO <sub>4</sub> x 4 H <sub>2</sub> O	22,3
KI	0,83
ZnSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	8,6
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	0,25
CuSO <sub>4</sub> x 5 H <sub>2</sub> O	0,025
CoCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	0,025
<b>ORGANSKI DODACI</b>	
m-inozitol	100
nikotinska kiselina	0,5
tiamin-HCl	0,1
piridoksin-HCl	0,5
glicin	2

Za određivanje koncentracije prolina u biljnom tkivu korišten je kiseli ninhidrin koji je sadržavao 1 g ninhidrina (*Kemika*), 60 mL ledene octene kiseline (*Gram-Mol*), 20 mL 96%-tnog etanola i 20 mL dH<sub>2</sub>O. Za izradu baždarnog pravca korištena je matična otopina prolina (*Sigma*) koncentracije 1 mmol/L.

Za određivanje stupnja lipidne peroksidacije korištena je reakcijska smjesa koja se sastoji od 0,3%-tne (w/v) tiobarbiturične kiseline (TBA, *Sigma-Aldrich*) otopljene u 20%-tnoj (w/v) triklorooctenoj kiselini (TCA, *Acros Organics*).

U svrhu određivanja koncentracije proteina u uzorku korištene su sljedeće kemikalije i puferi (proizvođača *Sigma* i *BioRad* iz SAD-a, *Kemika* iz Hrvatske te *Carlo-Erba* iz Italije):

- 1) Staples-Stahmannov pufer (modificiran prema Staplesu i Stahmannu 1964) koji se sastoji od 1,121 g Tris baze (pH 8,0), 17,1 g saharoze, 0,1 g ditiotreitola i 0,1 g cisteina;
- 2) Bradfordov reagens (modificiran prema Bradfordu 1976) koji sadrži 350 mg boje Coomassie Brilliant Blue G-250, 100 mL 96% -tnog EtOH te 200 mL 88%-tne fosforne kiseline;
- 3) standardna otopina albumina iz komercijalnog goveđeg seruma u koncentraciji 1 mg/mL.

Prilikom dokazivanja proteina HSP70 imunokemijskom metodom pripremljeno je više gelova i otopina različitih komponenti i volumena (proizvođača *Sigma* i *BioRad* iz SAD-a, *Kemika* iz Hrvatske te *Pharmacia Biotech* iz Švedske). Sastav poliakrilamidnih gelova za razdvajanje i sabijanje proteina prikazan je u Tablici 2.

Tablica 2. Kemijski sastav poliakrilamidnih gelova za razdvajanje i sabijanje korištenih prilikom dokazivanja proteina HSP70

	<b>GEL ZA RAZDVAJANJE</b>	<b>GEL ZA SABIJANJE</b>
<b>KOMPONENTA</b>	<b>VOLUMEN (ukupno 10 mL)</b>	
dH <sub>2</sub> O	3,35 mL	3,05 mL
30%-tni (w/v) akrilamid/bisakrilamid	4 mL	0,665 mL
1,5 M Tris-HCl, pH 8,8	2,5 mL	-
0,5 M Tris-HCl, pH 6,8	-	1,25 mL
10%-tni (w/v) natrij dodecil sulfat (SDS)	100 µL	50 µL
10%-tni (w/v) amonij-persulfat (APS)	100 µL	50 µL
tetrametiletilendiamin (TEMED)	10 µL	10 µL

Prije nanošenja na pripremljene gelove uzorci proteina su denaturirani u Laemmli puferu, čiji sastav je prikazan u Tablici 3.

Tablica 3. Kemijski sastav Laemmli pufera za denaturaciju proteina

<b>KOMPONENTA</b>	<b>VOLUMEN (mL)</b>
0,5 M Tris-HCl, pH 6,8	2,5
20%-tni glicerol	2
10%-tni SDS	4
10%-tni 2-merkaptetanol	1
0,5% boje bromfenol-plava	1
dH <sub>2</sub> O	do 10 mL

Za elektroforezu proteina korišten je 1× elektrodni pufer, dok je za prijenos proteina na nitroceluloznu membranu korišten pufer za prijenos (Tablica 4).

Tablica 4. Kemijski sastav 1× elektrodnog pufera i pufera za prijenos

<b>KOMPONENTA</b>	<b>1× elektrodni pufer</b>	<b>pufer za prijenos</b>
Tris	3 g	3,35 g
glicin	14,4 g	14,4 g
metanol	-	100 mL
SDS	1 g	-
dH <sub>2</sub> O	do 1 L	do 1 L

Za bojenje proteina na membrani korištena je 0,05%-tna (w/v) otopina boje Rouge Ponceau S, a za imunodetekciju proteina na membrani 10× fosfatni pufer (PBS) pH vrijednosti 7,5 (tablica 5).

Tablica 5. Kemijski sastav fosfatnog pufera (PBS, pH 7,5) koncentriranog 10×

<b>KOMPONENTA</b>	<b>MASA (g)</b>
NaCl	40
KCl	1
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> × 2 H <sub>2</sub> O	4,698
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1
dH <sub>2</sub> O	do 500 mL

U svrhu imunodetekcije i blokiranja membrane pripravljene su tri otopine (A, B i C). Otopina A, odnosno mlijeko za blokiranje membrane i pripremu antitijela, sastojala se od 5%-tnog mlijeka u prahu otopljenog u puferu 1× PBS s dodatkom 1%-tnog Tweena 20. Otopina B sadržavala je 1%-tni Tween 20 u puferu 1× PBS, dok je sastav otopine C, pH 9,5, prikazan u Tablici 6. Protutijela korištena prilikom imunodetekcije su primarno protutijelo antiHSP iz kunića (*Agrisera*, Švedska), pripravljeno u otopini za blokiranje u omjeru 1:3000 i sekundarno protutijelo Anti Rabbit IgG konjugirano s alkalnom fosfatazom (*Sigma*), pripravljeno u otopini za blokiranje u omjeru 1:10000. Kao supstrat alkalne fosfataze korištena je otopina 5-bromo-4-kloro-3-indolilfosfat/nitrotetrazolium modrila (BCIP/NBT).

Za markere molekularnih masa korištena je otopina proteina Color Burst (*Sigma Aldrich*) u rasponu 8 – 220 kDa.

Tablica 6. Kemijski sastav otopine C

<b>KOMPONENTA</b>	<b>MASA (g)</b>
Tris baza	1,212
NaCl	0,584
MgCl <sub>2</sub> × 6 H <sub>2</sub> O	0,102
dH <sub>2</sub> O	do 100 mL

## 2.2. Metode

### 2.2.1. Priprema hranidbene podloge za uzgoj klijanaca *A. thaliana*

Kako bih pripremila hranidbenu podlogu za isključavanje i uzgoj klijanaca uročnjaka, morala sam skuhati kruti MSØ medij. Prvo sam napravila odvage svih ranije navedenih sastojaka na vagi (*Libra Elektronik*, Njemačka). Nakon odvage, sve sastojke osim agara postupno sam dodavala u veliku staklenu posudu s destiliranom vodom, koju sam prethodno stavila na magnetsku miješalicu Vibromix 204 EV (*Tehtnica*, Slovenija). Kada su se svi sastojci otopili, izmjerila sam pH otopine pH metrom Metrel (*Server Mark*, Hrvatska), koji sam prethodno baždabila otopinama kalibracijskih pufera pH vrijednosti 4,0 i 7,0. Da bi namjestila pH otopine na blago kiselo, odnosno 5,7, dokapavala sam otopine HCl koncentracija 0,1 mol/L i 1 mol/L. Potom sam dodala još malo destilirane vode da volumen otopine bude točno 750 mL, te sam potom taj volumen podijelila na tri dijela i izlila po 250 mL skuhanog medija u svaku od tri jednake boce, u koje sam prethodno stavila 2,1 g agara. Boce s medijem sam sterilizirala u autoklavu Bari na 121 °C tijekom 20 minuta. Nakon autoklaviranja medij sam u laminaru (*Hera guard*, Njemačka) razlila u sterilne plastične Petrijeve zdjelice promjera 90 mm.

### 2.2.2. Sterilizacija sjemenki *A. thaliana* i nasađivanje na podlogu

Kako bih izbjegla potencijalnu kontaminaciju tijekom uzgoja, sjemenke sam prije nasađivanja na hranidbenu podlogu sterilizirala u laminaru. Sjemenke triju linija (*wt*, *dms3-1* i *6 TV*) odvojila sam u tri zasebne Eppendorf epruvete, u koje sam najprije otpipetirala 1 mL 70%-tnog etanola i lagano ih promućkala. Nakon 1-minutne inkubacije sjemenki u etanolu, pažljivo sam pipetom izvukla etanol te dodala 1 mL otopine 1%-tnog Izosana i 0,1%-tnog mukazola te promućkala. Nakon 10 minuta otpipetirala sam sav Izosan i mukazol, te zatim isprala sjemenke pet puta u sterilnoj vodi, blizu plamenika, pazeći da odmah zatvorim epruvete. Nakon zadnjeg ispiranja ostavila sam mali volumen sterilne vode u epruветama radi lakšeg nasađivanja. Nakon što se skuhan medij skrutnuo i ohladio u Petrijevim zdjelicama, markerom sam označila kojoj liniji pripadaju te počela nasađivati sjemenke na podlogu. Mikropipetom sam nasađivala 30 sjemenki po Petrijevoj zdjelici, pravilno raspoređenih u tri reda. Za svaku liniju nasadila sam po osam Petrijevih zdjelica. Nakon nasađivanja pažljivo sam zatvorila Petrijeve zdjelice sa sjemenkama i oblijepila ih ljepljivom trakom te stavila u

hladnjak gdje su bile stratificirane tri dana na temperaturi od +4 °C radi sinkronizacije procesa klijanja.

### **2.2.3. Izlaganje povišenoj temperaturi**

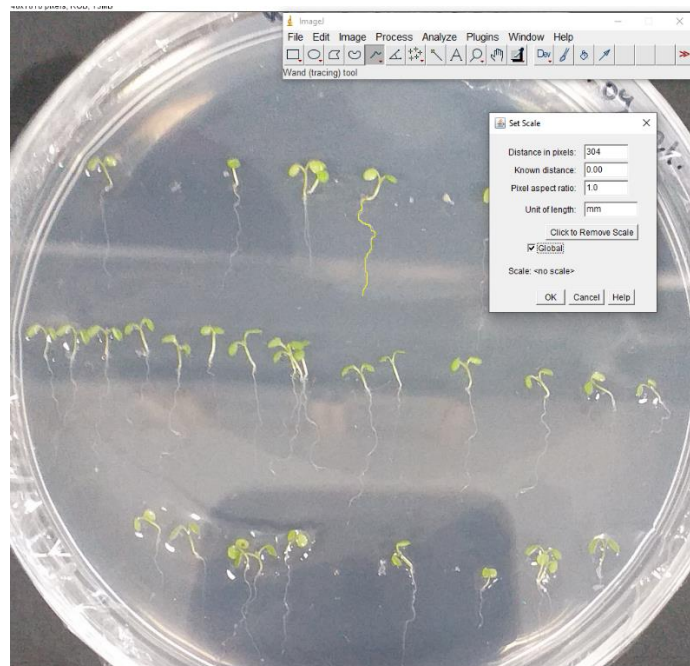
Nakon stratifikacije, 4. dan od nasađivanja, Petrijeve zdjelice sa sjemenkama svih linija stavila sam u dva inkubatora proizvođača *Edmund Bühler* (Austrija). Jedan inkubator bio je namješten na temperaturu od  $24 \pm 1^\circ\text{C}$ , koja je poslužila kao kontrola s normalnim uvjetima, a drugi je bio namješten na različite povišene temperature (30, 32, 32/24 ili 35 °C), ovisno o tretmanu. Temperaturni tretman od 32/24 °C uključivao je izloženost sjemenki temperaturi od 32 °C danju (dan je trajao 16 sati), a 24 °C noću (noć je trajala 8 sati), za razliku od tretmana na 32 °C, gdje je temperatura cijelo vrijeme bila ista. Uvrstila sam ga u eksperiment jer predstavlja uvjete slične onima u prirodi. Od pripremljenih i nasađenih osam zdjelica za svaku liniju po četiri od svake linije stavila sam u inkubator s kontrolnom temperaturom, a četiri od svake linije u inkubator gdje je bila mjerena jedna povišena temperatura. Bilo je ukupno 24 Petrijeve zdjelice po pokusu. Svi temperaturni tretmani nisu mjereni istovremeno, već najprije tretman od 30 °C pa kasnije svi ostali, uvijek jedan u kombinaciji s kontrolom. Petrijeve zdjelice bile su položene ispod lampi, okomito na rešetke inkubatora, kako bi korijenje klijanaca raslo po podlozi prema dolje. Isključivanje sjemenki i rast klijanaca uročnjaka tijekom pet dana tretmana u inkubatorima odvijali su se u uvjetima dugoga dana, odnosno uz fotoperiod od 16 sati svjetlosti i 8 sati tame, pri intenzitetu svjetlosti od  $75 - 85 \mu\text{mol fotona m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Prilikom svakog izlaganja u inkubatore sam stavila i senzor (*Elitech RC-51H*, UK) koji mjeri i bilježi temperaturu i vlagu kako bih imala podatke o točnoj vrijednosti temperature prilikom izlaganja. Klijance koji su bili tretirani temperaturom od 35 °C stavila sam, zbog oštećenja i nerazvijenosti, nakon tog tretmana na oporavak u komoru, na temperaturu od 24 °C. Oporavak je trajao 14 dana jer su tada klijanci morfološki bili na razini kontrolnih biljaka.

### **2.2.4. Praćenje klijavosti i morfoloških promjena klijanaca**

Glavni morfološki parametri koje sam mjerila bili su postotak klijavosti, duljina korijena i biomasa po klijancu. Tijekom perioda od pet dana, dakle od četvrtog do osmog dana od nasađivanja, svakodnevno sam pod lupom pratila klijanje i morfološke promjene

stadija klijanaca svih linija. Stadije sam podijelila u pet kategorija, a svaka kategorija je imala specifičnu oznaku i osnovnu karakteristiku (0 – nema klijanja, 0,2 – ruptura teste, 0,5 – pojava korijena, 0,7 – pojava hipokotila i 0,8 – otvoreni kotiledoni) (modificirano prema Boyes i sur. 2001). Na temelju tih podataka, izračunala sam postotak zastupljenosti određenog stadija po danu. Sjemenke kod kojih se vidjelo probijanje korijena smatrala sam proklijalim, pa sam na temelju toga izračunala postotak klijavosti.

Peti dan fotografirala sam sve klijance u Petrijevim zdjelicama, te nakon toga u programu ImageJ izmjerila ukupnu duljinu korijena svakog pojedinog klijanca (Slika 4). Mjernu skalu koja je bila u pikselima promijenila sam u milimetre, prema milimetarskoj skali koju sam fotografirala zajedno s klijancima. Nakon toga sam klijance ostavila izložene u inkubatorima još dva dana, a sedmi dan od početka izlaganja izvagala sam ukupnu biomasu svih klijanaca unutar svake Petrijeve zdjelice. Prije vaganja uklonila sam svu vodu filter-papirom kako ne bi utjecala na biomasu. Ponegdje sam uzela više uzoraka iz jedne zdjelice kako bi mase bile ujednačenije, te kako bi bilo dovoljno biljnog materijala. Vrijednosti biomase po klijancu izračunala sam tako što sam podijelila iznos ukupne biomase u mg s brojem prisutnih klijanaca u zdjelici. Izvagane uzorke spremila sam u folije s označenom linijom, masom i temperaturom kojoj su bili izlagani te ih stavila na  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  na tjedan dana za potrebe kasnijih mjerenja biokemijskih parametara.



Slika 4. Prikaz mjerenja duljine korijena u programu ImageJ, na jednoj fotografiji, gdje je netom određena mjerna skala u milimetrima



### 2.2.5. Određivanje količine fotosintetskih pigmenta

Za potrebe određivanja količine fotosintetskih pigmenta homogenizirala sam prethodno izvagane klijance, ukupne mase oko 80-100 mg po uzorku, pomoću tučka u hladnom tarioniku u 1 mL hladnog 70%-tnog etanola (Ritchie 2008). Smjesu sam centrifugirala 15 minuta na 15 000 g u Eppendorf centrifugi da bi odstranila kruti stanični materijal i dobila ekstrakte koje sam iskoristila i za sljedeće dvije metode. Nakon centrifugiranja dobiveni sam supernatant izlila u čiste Eppendorf epruvete i stavila na led. Potom sam izmjerila apsorbanciju na tri valne duljine 470, 645 i 663 nm pomoću spektrofotometra Specord 40 (*Analytik Jena*, Njemačka). Najprije sam u staklenoj kiveti izmjerila apsorbanciju referentnog uzorka ili slijepe probe, koji je u ovom slučaju bio 70%-tni etanol koji sam koristila za ekstrakciju, a zatim sam izmjerila apsorbanciju svakog pojedinog uzorka.

Koncentraciju klorofila *a*, klorofila *b* i karotenoida odredila sam pomoću sljedećih formula (Minocha i sur. 2009):

$$\text{koncentracija klorofila } a \text{ (}\mu\text{g/mL): } (13,36 \times A_{663}) - (5,19 \times A_{645}),$$

$$\text{koncentracija klorofila } b \text{ (}\mu\text{g/mL): } (27,43 \times A_{645}) - (8,12 \times A_{663}),$$

$$\text{koncentracija karotenoida (}\mu\text{g/mL): } (100 \times A_{470} - 2,13 \times C_a - 97,64 \times C_b)/209,$$

pri čemu su  $A_{470}$ ,  $A_{645}$  i  $A_{663}$  apsorbancije pri tim valnim duljinama,  $C_a$  je koncentracija klorofila *a*,  $C_b$  je koncentracija klorofila *b*.

Zatim sam izračunala sadržaj pigmenta u tkivu ( $\mu\text{g/g}$ ) tako što sam dobivenu koncentraciju pigmenta pomnožila s volumenom otopine korištenim za ekstrakciju i podijelila s masom tkiva.

### 2.2.6. Određivanje stupnja lipidne peroksidacije

Pri određivanju stupnja lipidne peroksidacije određivala sam zapravo sadržaj malondialdehida (MDA) koji je njezin krajnji produkt. U kiselim uvjetima i na visokoj temperaturi MDA reagira s tiobarbituričnom kiselinom (TBA) i nastaje crveno obojeni kompleks čija se koncentracija može izmjeriti spektrofotometrijski (Hodges i sur. 1999). Najprije sam pripremila 100 mL reakcijske smjese, pri čemu sam 0,3%-tnu TBA otopila u 20%-tnoj triklorooctenoj kiselini (TCA). Pomiješala sam 400  $\mu$ L prethodno pripremljenih etanolnih ekstrakata sa 700  $\mu$ L reakcijske smjese u mikroeprovete s navojem. Potom sam uzorke i slijepu probu (koja se sastojala od reakcijske smjese i 70%-tnog etanola) zagrijavala u termobloku (*Labnet*) na 95 °C tijekom 30 minuta da bi se potaknula kemijska reakcija MDA s TBA. Nakon toga sam mikroeprovete ohladila stavljanjem na led te centrifugirala 10 minuta na 15 000 g. Apsorbanciju supernatanta izmjerila sam spektrofotometrijski na valnim duljinama 532 i 600 nm jer dolazi i do nespecifičnog zamućenja pa se vrijednost izmjerena na 600 nm oduzima od one na 532 nm.

Koncentraciju MDA izračunala sam koristeći Lambert-Beerov zakon prema formuli:

$$\text{MDA (nmol/mL)} = (A_{532} - A_{600}) \times V_{rs} / (V_{uz} \times \varepsilon \times l)$$

gdje je:

A<sub>532</sub> – apsorbancija na 532 nm

A<sub>600</sub> – apsorbancija na 600 nm

V<sub>rs</sub> – volumen reakcijske smjese

V<sub>uz</sub> – volumen uzorka

$\varepsilon$  - molarni ekstinkcijski koeficijent = 0,155 mmol<sup>-1</sup>dm<sup>3</sup> cm<sup>-1</sup>

l – duljina kivete

Na kraju sam sadržaj MDA u tkivu izrazila u jedinicama nmol/g svježe tvari tako što sam dobivenu koncentraciju MDA pomnožila s volumenom otopine korištenom za ekstrakciju i podijelila s masom tkiva.

### 2.2.7. Određivanje količine slobodnog prolina u tkivu

Određivanje slobodnog prolina temelji se na reakciji ninhidrina s imino skupinom prolina, pri čemu u kiselim uvjetima nastaje crveno obojeni produkt (Bates i sur. 1973).

Prilikom određivanja koncentracije aminokiseline prolina u biljnom tkivu, najprije sam pripremila sedam standardnih otopina poznatih koncentracija od 1, 10, 25, 50, 100, 250 i 500  $\mu\text{mol/L}$  u svrhu izrade baždarnog dijagrama. Otopine sam pripremila pipetiranjem različitih volumena (20, 50, 100, 200, 500 i 1000  $\mu\text{L}$ ) 1 mmol/L matične otopine L-prolina te pipetiranjem različitih volumena (1980, 1950, 1900, 1800, 1500 i 1000  $\mu\text{L}$ ) 70%-tnog etanola. Za pripremu 1 mmol/L matične otopine prolina otopila sam 11,5 mg prolina u 100 mL destilirane vode.

Nakon izrade standardnih otopina prolina pripremila sam 100 mL reakcijske smjese, odnosno otopine kiselog ninhidrina, tako što sam 1 g odvagano ninhidrina otopila u 60 mL ledene octene kiseline i 20 mL 96%-tnog etanola i destilirane vode (Linić i sur. 2019), te smjesu miješala na magnetskoj miješalici u digestoru. Otpipetirala sam 1 mL te otopine i dodala 100  $\mu\text{L}$  svake standardne otopine. Isto sam napravila i s prethodno pripremljenim etanolnim uzorcima, dok je slijepa proba bila 1 mL ninhidrina i 100  $\mu\text{L}$  70% EtOH. Sve sam stavila grijati u termoblok na 95 °C 20 minuta. Zatim sam spektrofotometrijski, na valnoj duljini od 520 nm, izmjerila apsorbanciju svih otopina. Pomoću apsorbancija dobivenih sa standardnim otopinama prolina izradila sam baždarni pravac kao ovisnost apsorbancije o koncentraciji te izradila jednadžbu pravca metodom linearne regresije.

Koncentraciju prolina izračunala sam pomoću jednadžbe pravca iz koje je izvedeno:

$$c_{\text{uzorak}} = \frac{(A-b)}{a} \quad \{ \mu\text{mol/L} \},$$

pri čemu je  $A$  izmjerena apsorbancija uzoraka,  $c$  koncentracija prolina koju tražimo,  $a$  je nagib pravca, dok je  $b$  odsječak koji pravac određuje na ordinati.

Količinu slobodnog prolina u tkivu, izraženu u  $\mu\text{mol/mg}$ , dobila sam množenjem koncentracije prolina s volumenom otopine korištenom za ekstrakciju i dijeljenjem s masom tkiva.

## **2.2.8. Dokazivanje proteina toplinskog šoka imunokemijskom metodom**

### ***2.2.8.1. Određivanje koncentracije proteina i priprema uzoraka za elektroforezu***

Za dokazivanje i određivanje količine proteina homogenizirala sam 100 mg tkiva u tarioniku u 1 mL Staples-Stahmannovog pufera koji štiti strukturu proteina i sprječava njihovu razgradnju. Dobivene ekstrakte centrifugirala sam 20 minuta na 20 000 g na 4 °C, te pomiješala 50 µL supernatanta s 1 mL Bradfordovog reagensa i izmjerila apsorbanciju spektrofotometrijski na valnoj duljini od 595 nm. Bradfordov reagens dodaje se otopini proteina jer se boja u njemu veže za proteine elektrostatskim interakcijama, što izaziva plavo obojenje koje se očitava na spektrofotometru (Reigosa Roger 2001). Prethodno sam izmjerila slijepu probu koja je sadržavala 50 µL Staples-Stahmannovog pufera i 1 mL Bradfordovog reagensa. Prije mjerenja apsorbancije supernatanta uzoraka izmjerila sam spektrofotometrijski apsorbancije standardnih otopina albumina poznatih koncentracija (0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7 i 0,8 mg/mL) pripremljenih razrijeđivanjem otopine koncentracije 1 mg/mL. Koncentraciju proteina u uzorcima izračunala sam pomoću izmjerene apsorbancije uzoraka i jednadžbe baždarnog pravca dobivene regresijskom analizom.

Kako bi među ukupnim topivim proteinima dokazala protein određene veličine i molekularne mase, u ovom slučaju protein toplinskog šoka HSP70, morala sam uzorke najprije denaturirati da bi ih oslobodila naboja i sekundarne strukture, po kojima se također mogu odvajati, te tako olakšala kasnije dokazivanje. Zato sam 100 µL ranije pripremljenog supernatanta uzoraka pomiješala s 25 µL Laemmli pufera za denaturaciju (Tablica 3), koji među ostalim sadrži merkaptoetanol koji razara disulfidne mostove, eliminirajući tako različite strukture, te SDS koji se veže na proteine i daje im ujednačeni negativni naboj. Uzorke sam potom zagrijavala tri minute u 95 °C na termobloku, kako bih osigurala denaturaciju. Pomoću ranije izračunatih koncentracija proteina izračunala sam kolike volumene uzoraka moram nanijeti na ranije pripremljene gelove kako bi u svim jažicama bila jednaka količina proteina.

### **2.2.8.2. Razdvajanje proteina SDS-PAGE elektroforezom**

Ukupne topive proteine razdvajala sam vertikalnom diskontinuiranom natrij dodecil sulfat-poliakrilamid gel (SDS-PAGE) elektroforezom (Balen i sur. 2011). To je metoda koja omogućava razdvajanje proteina u električom polju samo na temelju molekularne mase, jer su prethodno obrađeni SDS-om koji ujednačava njihov naboj.

U postupku pripreme poliakrilamidnog gela, najprije sam napravila gel za razdvajanje, sastava prikazanog u Tablici 2, tako što sam dodala sve sastojke osim APS i TEMED, koje sam dodala zadnje, netom prije izlivanja gela pipetom između dva stakalca u aparaturi koju sam sastavila. Nakon toga sam gel pokrila malim slojem destilirane vode kako bi spriječila kontakt sa zrakom i ostavila da se polimerizira 45 minuta. Zatim sam pred kraj polimerizacije pripremila gel za sabijanje sastava prikazanog u Tablici 2, pri čemu sam također na kraju dodala APS i TEMED te pipetom izlila gel između stakalaca na gel za razdvajanje, prethodno izljevajući vodu koja je bila na površini gela za razdvajanje. Između stakalaca sam stavila češljic za pravljenje jažica i ostavila gel da se polimerizira 30 minuta.

Nakon polimerizacije u jažice sam, na gotovi poliakrilamidni gel, mikropipetom nanosila odgovarajuće volumene ranije pripremljenih uzoraka s otprilike istom količinom proteina ( $\approx 8 \mu\text{g}$ ). Putovanje proteina kroz gel i tijekom elektroforeze bili su vizualizirani pomoću 0,5%-tne boje Bromfenol-plava unutar pufera za denaturaciju. U prvu jažicu otpipetirala sam standardnu otopinu proteina poznatih molekularnih masa, koji su poslužili kao markeri (Color Burst, *Sigma Aldrich*). Složila sam ostatak aparature za elektroforezu tako što sam aparaturu s gelom i jažicama uronila u kadicu (*Bio-Rad*) te sam izlila oko 300 mL 1 × elektrodnog pufera (Tablica 4) koji je prekrpio jažice i gel. Aparaturu sam priključila na uređaj za elektroforezu koji sam najprije podesila na 100 V, ali nakon 26 minuta sam povišala napon na 200 V jer je boja za vizualizaciju došla na granicu s gelom za razdvajanje. Elektroforeza je trajala oko 45 minuta.

### **2.2.8.3. Prijenos proteina na membranu i imunodetekcija**

Nakon elektroforeze razdvojene sam proteine na gelu prenijela na nitroceluloznu membranu metodom *Western blotting*. Najprije sam izvadila gel s razdvojenim proteinima iz aparature, maknula jažice te ga isprala u destiliranoj vodi i u puferu za prijenos (Tablica 4). Zatim sam gel stavila u tzv. sendvič – dvije slojevite strukture složila sam od komada plastike na dnu, spužvice i filter-papira te na vrh jedne stavila gel s proteinima, a na vrh druge komad nitrocelulozne membrane iste veličine kao gel. Zatim sam strukture spojila tako da su u središtu sendviča bili gel i membrana, pravilno okrenuti zbog kasnijeg prijenosa. Sendvič sam stavila u aparaturu za prijenos Mini Trans-Blot Cell (*Bio-Rad*), u koju sam ulila i 450 mL pufera za prijenos (Tablica 4) te priključila aparaturu na uređaj za elektroforezu koji sam podesila na 60 V. Prijenos je trajao 60 minuta.

Nakon prijenosa membranu sam nekoliko puta isprala destiliranom vodom te ju obojala 0,05%-tnom otopinom boje Rouge Ponceau S radi provjere uspješnosti prijenosa. Potom sam membranu nekoliko puta isprala 1×PBS puferom dok se nije obezbojila. Prije imunodetekcije membranu s proteinima inkubirala sam sat vremena u 30 mL otopine A kako bi proteini iz mlijeka umjesto antitijela popunili preostala vezna mjesta na membrani. Zatim sam membranu inkubirala preko noći na 4 °C u otopini A s dodatkom primarnog protutitijela – antiHSP u razrijeđenju 1:3000.

Drugi dan sam membranu s proteinima ispirala tri puta po 10 minuta u 15 mL otopine A, nakon čega je sat vremena bila inkubirana u 15 mL otopine A s dodatkom sekundarnog protutitijela protiv kunića, vezanog za alkalnu fosfatazu, u razrijeđenju 1:10000. Poslije inkubacije isprala sam ju još dva puta po 10 minuta u otopinama B i C. Na kraju postupka inkubirala sam membranu u 5 mL otopine C te postupno dodavala po 1 mL otopine BCIP/NBT do pojave obojenja, odnosno vizualizacije proteina. Proces sam zaustavila dodatkom destilirane vode, nakon čega sam membranu posušila između papirnatih ručnika, fotografirala i spremila u hladnjak položenu u veće Petrijeve zdjelice. Nakon toga sam u programu ImageJ izračunala relativni intenzitet proteina koji je bio izražen prema kontrolnoj temperaturi  $24 \pm 1$  °C, za koju je uzeta vrijednost 1. Kako bih uzela u obzir rezultate dviju različitih membrana, intenziteti su najprije normalizirani prema intenzitetu uzorka divljeg tipa na 32 °C, koji se nalazi na obje membrane.

### **2.2.9. Statistička analiza**

Dobivene rezultate svih mjerenih morfoloških i biokemijskih parametara prikazala sam kao srednje vrijednosti pripadajućeg broja replika i na temelju njih izračunala standardnu pogrešku. Svako izlaganje povišenoj, odnosno kontrolnoj temperaturi, ponovljeno je barem jedanput. Razlike između eksperimentalnih grupa testirala sam jednosmjernom analizom varijance – one way ANOVA i post hoc testom za utvrđivanje značajnosti pojedinih razlika u programu STATISTICA 13.3 (TIBCO Software Inc., SAD). Svi grafovi nacrtani su u programu MS Office Excel 2019.

## 3. REZULTATI

### 3.1. Morfološki parametri

Utjecaj toplinskog stresa na klijanje sjemenki te fizičke promjene klijanaca *A. thaliana* praćeni su mjerenjem triju glavnih morfoloških parametara: postotka klijavosti, duljine korijena i biomase po klijanču. Sjemenke divljeg tipa (wt) i dvije linije uročnjaka s promijenjenom ekspresijom gena *DMS3*, linija *dms3-1* kod koje je gen mutiran, odnosno linija *oeDMS3* (nazvana i *6TV*) kod koje je pojačano eksprimiran, bile su pet dana izlagane kontrolnoj temperaturi (24 °C) te različitim povišenim temperaturama (30, 32, 32/24 ili 35 °C).

Prilikom praćenja klijavosti sjemenki uročnjaka na određenim temperaturama praćene su i morfološke promjene, odnosno stadiji klijanaca koji su odražavali stupanj razvijenosti pojedinog klijanca. Iz rezultata prikazanih u Tablici 7 vidljivo je da postotak zastupljenosti pojedinog stadija varira ovisno o promatranoj liniji, temperaturnom tretmanu i danu mjerenja. Tako se na primjer može primijetiti da je početni stadij, koji podrazumijeva rupturu teste, kod svih linija najviše zastupljen drugoga dana, dok je završni stadij, s potpuno razvijenim kotiledonima, u gotovo svim linijama, neovisno o tretmanu, najviše zastupljen četvrtoga dana (osim pri 35 °C). Na kontrolnoj temperaturi (24 °C) primijećeno je slabije klijanje sjemenki linije *dms3-1*, pa četvrtoga dana gotovo 14% sjemenki još nije proklijalo. Kod linije *6TV* uočen je nešto sporiji početni razvoj klijanaca u usporedbi s divljim tipom. Tako se na primjer kod divljeg tipa već drugi dan nazire hipokotil, dok se kod linije *6TV* tek pojavljuje korijenje. Na temperaturama od 30 i 32 °C sjemenke divljeg tipa i linije *dms3-1* sporije kliju na početku, ali se kod već proklijalih sjemenki razvoj ubrzava kod svih linija, pa se tako već drugoga dana kod više klijanaca nazire hipokotil. Kod *dms3-1* sjemenke većim dijelom ne prokliju niti četvrtoga dana. Na tretmanu 32/24 °C divlji tip i linija *6TV* ponašaju se slično kao i na 24 °C, ali kod linije *dms3-1* sjemenke na početku sporije kliju i veći dio ne proklija. Pri najvišoj temperaturi, od 35 °C, kod svih linija je inhibirano klijanje tijekom cijelog perioda praćenja, a dolazi i do usporavanja u razvoju, pa četvrtoga dana prevladava stadij s hipokotilom kod divljeg tipa, a kod linija *dms3-1* i *6TV* podjednako stadij s korijenom i stadij s hipokotilom.



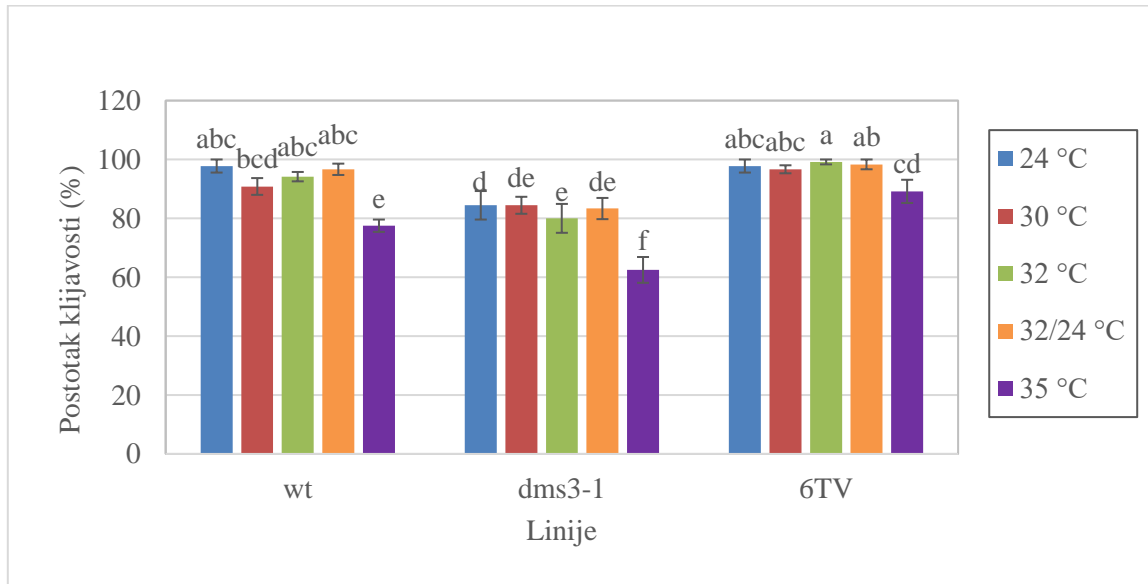
Tablica 7. Postotak zastupljenosti pojedinih morfoloških stadija klijanaca divljeg tipa (wt) te linija s promijenjenom ekspresijom gena *DMS3* (*dms3-1* i *6TV*) biljke *Arabidopsis thaliana* tijekom izloženosti različitim temperaturnim tretmanima (24, 30, 32, 32/24 ili 35 °C)

Temperatura izlaganja	Stadij/linija	Postotak pojedinog stadija (%)								
		2. dan			3. dan			4. dan		
		wt	<i>dms3-1</i>	<i>6TV</i>	wt	<i>dms3-1</i>	<i>6TV</i>	wt	<i>dms3-1</i>	<i>6TV</i>
24 °C	nema klijanja	3,3 ± 1,9	23,3 ± 8,8	6,7 ± 5,1	2,2 ± 2,2	14,4 ± 4,0	2,2 ± 2,2	2,8 ± 2,8	13,9 ± 3,7	1,4 ± 1,4
	ruptura teste	4,4 ± 2,9	27,8 ± 4,0	16,7 ± 3,8	0	6,7 ± 1,9	1,1 ± 1,1	0	2,8 ± 2,8	1,4 ± 1,4
	pojava korijena	44,4 ± 4,8	36,7 ± 5,8	48,9 ± 14,9	0	13,3 ± 0	2,2 ± 1,1	0	4,2 ± 4,2	1,4 ± 1,4
	pojava hipokotila	47,8 ± 4,4	12,2 ± 4,8	11,1 ± 4,8	3,3 ± 0	15,6 ± 2,9	7,8 ± 2,9	0	11,1 ± 1,4	1,4 ± 1,4
	kotiledoni otvoreni	0	0	0	94, ± 2,2	50,0 ± 6,9	86,7 ± 5,1	97,2 ± 2,8	68,1 ± 6,1	94,4 ± 3,7
30 °C	nema klijanja	13,3 ± 2,4	31,7 ± 3,2	5,8 ± 0,8	10,8 ± 2,5	19,2 ± 2,8	4,2 ± 1,6	9,2 ± 2,8	13,3 ± 3,6	3,3 ± 1,4
	ruptura teste	1,7 ± 0,9	6,7 ± 0	4,2 ± 2,1	0	0,8 ± 0,8	0	0	1,7 ± 1,7	0
	pojava korijena	23,3 ± 1,4	40 ± 6,5	40,8 ± 3,7	1,6 ± 0,9	8,3 ± 2,1	3,3 ± 0	0,8 ± 0,8	5,8 ± 1,6	0,8 ± 0,8
	pojava hipokotila	61,7 ± 2,1	20,8 ± 5,5	49,2 ± 2,8	3,3 ± 1,3	48,3 ± 3,5	65,8 ± 2,8	0,8 ± 0,8	18,3 ± 1,7	16,7 ± 3,6
	kotiledoni otvoreni	0	0	0	84,2 ± 2,8	23,3 ± 4,1	26,6 ± 2,3	89,2 ± 2,5	60,8 ± 5,0	79,2 ± 4,2
32°C	nema klijanja	11,7 ± 4,2	33,3 ± 5,6	5,8 ± 0,8	6,7 ± 1,4	23,3 ± 5,3	2,5 ± 0,8	5,8 ± 1,6	18,3 ± 4,0	0,8 ± 0,8
	ruptura teste	0,8 ± 0,8	5,8 ± 1,6	0,8 ± 0,8	0,8 ± 0,8	0,8 ± 0,8	0	0	1,7 ± 1,7	0
	pojava korijena	30,0 ± 3,6	37,5 ± 3,7	29,2 ± 5,0	1,7 ± 1,0	15,0 ± 4,8	3,3 ± 1,4	2,5 ± 0,8	9,2 ± 2,8	0,8 ± 0,8
	pojava hipokotila	57,5 ± 0,8	23,3 ± 1,9	64,2 ± 4,2	12,5 ± 4,2	35,8 ± 4,4	28,3 ± 6,3	0,8 ± 0,8	8,3 ± 3,2	2,5 ± 1,6
	kotiledoni otvoreni	0	0	0	78,3 ± 4,8	25,0 ± 2,9	65,8 ± 5,7	90,8 ± 1,6	62,5 ± 5,7	95,8 ± 1,6
32/24 °C	nema klijanja	5,8 ± 2,1	44,2 ± 3,4	5,0 ± 1,0	3,3 ± 1,9	24,2 ± 1,6	3,3 ± 1,4	3,3 ± 1,9	16,7 ± 3,6	1,7 ± 1,7
	ruptura teste	2,5 ± 1,6	10,0 ± 1,4	2,5 ± 2,5	0,8 ± 0,8	0,8 ± 0,8	0	0	0	0
	pojava korijena	45,8 ± 6,4	36,7 ± 2,7	59,2 ± 5,5	0	21,7 ± 2,9	3,3 ± 1,4	0	15,8 ± 2,8	0,8 ± 0,8
	pojava hipokotila	45,8 ± 7,5	9,2 ± 1,6	33,3 ± 3,0	0,8 ± 0,8	25,0 ± 1,0	16,7 ± 4,9	0,8 ± 0,8	10,0 ± 2,4	2,5 ± 0,8
	kotiledoni otvoreni	0	0	0	95,0 ± 2,2	28,3 ± 1,0	76,7 ± 5,6	95,8 ± 1,6	57,5 ± 1,6	95,0 ± 1,0
35 °C	nema klijanja	28,3 ± 3,2	40,8 ± 5,8	24,2 ± 5,5	23,3 ± 1,4	35,0 ± 5,9	7,5 ± 2,8	22,5 ± 2,1	34,2 ± 3,7	9,2 ± 3,4
	ruptura teste	1,7 ± 1,0	10,00 ± 0	12,5 ± 3,4	0,8 ± 0,8	4,2 ± 0,8	1,7 ± 1,7	0	3,3 ± 1,4	1,7 ± 1,7
	pojava korijena	52,5 ± 5,7	45,0 ± 5,2	61,7 ± 6,9	13,3 ± 1,4	42,5 ± 6,0	61,7 ± 5,2	9,2 ± 1,6	30,8 ± 2,1	45,5 ± 0
	pojava hipokotila	17,5 ± 5,0	4,2 ± 0,8	1,7 ± 1,0	55,0 ± 4,0	18,3 ± 5,5	29,2 ± 4,2	55,0 ± 7,5	31,7 ± 3,2	43,3 ± 5,8
	kotiledoni otvoreni	0	0	0	7,5 ± 4,8	0	0	13,3 ± 7,2	0	0,8 ± 0,8

### 3.1.1. Postotak klijavosti

Učinak različitih povišenih temperatura na klijanje sjemenki uročnjaka praćen je određivanjem postotka klijavosti petoga dana pokusa. Divlji tip pokazuje najveću klijavost pri kontrolnoj temperaturi te temperaturi od 32/24 °C, a vrlo visoki postotak klijavosti pokazuje i pri temperaturi od 32 °C, koji je malo veći u odnosu na klijavost pri 30 °C (Slika 5). Uočene razlike nemaju statističku značajnost. Najmanji postotak klijavosti zabilježen je pri temperaturi od 35 °C, gdje je vidljivo statistički značajno smanjenje ( $p \leq 0,05$ ) u odnosu na ostale temperature. Sličan trend prisutan je i kod sjemenki linije *dms3-1* koje također pokazuju najveću klijavost na kontrolnoj temperaturi te temperaturama od 30 °C i 32/24 °C, a najmanju, značajno smanjenu u odnosu na druge tretmane na 35 °C. Sjemenke linije *6TV* pokazuju visok postotak klijavosti na svim temperaturnim tretmanima, najviši čak na 32 °C, a najmanji na 35 °C, također jedini značajno smanjen u usporedbi s drugim tretmanima.

Usporedbom linija vidljivo je da sjemenke divljeg tipa i linije *6TV* imaju statistički značajno veće ( $p \leq 0,05$ ) postotke klijavosti u odnosu na liniju *dms3-1* pri svim temperaturama. Pri 35 °C postoji i razlika između divljeg tipa i linije *6TV*, pri čemu sjemenke linije *6TV* imaju veću klijavost (Slika 5).

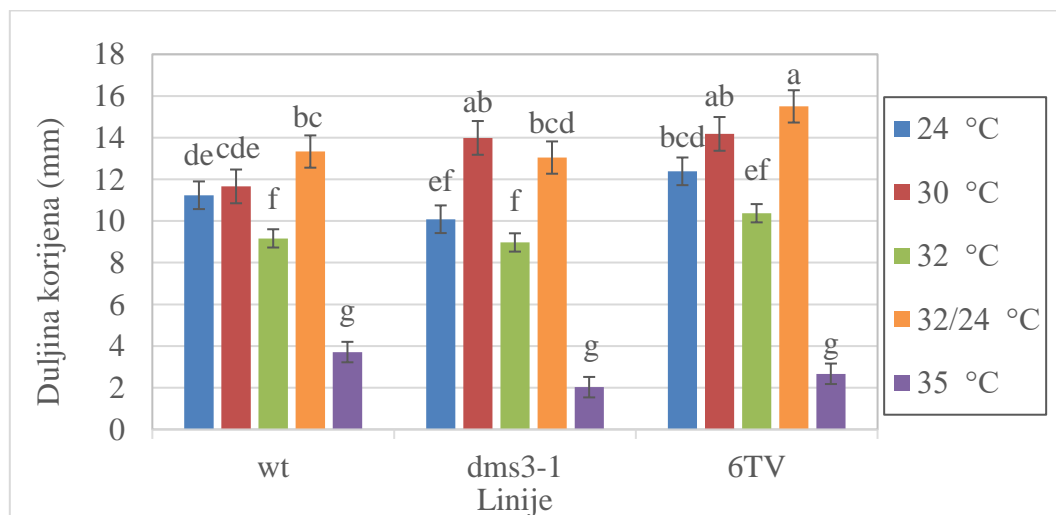


Slika 5. Učinak povišenih temperatura (30, 32, 32/24 i 35 °C) na postotak klijavosti sjemenki divljeg tipa (wt) te linija s promijenjenom ekspresijom gena *DMS3* (*dms3-1* i *6TV*) biljke *Arabidopsis thaliana*. 24 °C je kontrolna temperatura. Temperatura 32/24 °C podrazumijeva izloženost sjemenki temperaturi od 32 °C preko dana, a 24 °C preko noći. Različita slova označavaju statistički značajnu razliku između temperaturnih tretmana ( $p \leq 0,05$ ). Rezultati prikazuju srednju vrijednost ( $n=4$ )  $\pm$  standardna pogreška.

### 3.1.2. Duljina korijena

Najviše vrijednosti duljine korijena izmjerene su kod klijanaca linije 6TV za temperaturu 32/24 °C, te su statistički značajno veće ( $p \leq 0,05$ ) od vrijednosti izmjerenih za klijance navedene linije na kontrolnoj temperaturi te tretmanima od 32 °C (Slika 6). Na tretmanu od 35 °C korijeni su najkraći i značajno se razlikuju ( $p \leq 0,05$ ) od svih ostalih. Korijeni klijanaca linije *dms3-1* imaju najveću duljinu pri 30 °C, koja je statistički značajno veća ( $p \leq 0,05$ ) od vrijednosti pri kontrolnoj temperaturi te temperaturama od 32 i 35 °C. Kao i kod linije 6TV, na 35 °C korijeni su najkraći i značajno se razlikuju ( $p \leq 0,05$ ) od svih ostalih. Divlji tip ima najviše vrijednosti duljine korijena izmjerene na 32/24 °C, koje su također statistički značajno povećane ( $p \leq 0,05$ ) u odnosu na kontrolu te 32 i 35 °C. Na 35 °C korijeni su najkraći i značajno se razlikuju ( $p \leq 0,05$ ) od svih ostalih.

Usporedbom linija vidljivo je da je najviša vrijednost duljine korijena izmjerena kod klijanaca linije 6TV pri temperaturi 32/24 °C te je statistički značajno veća ( $p \leq 0,05$ ) u odnosu na klijance divljeg tipa i linije *dms3-1* (Slika 6). Na 24 °C klijanci linije 6TV također imaju najduže korijene, ali je značajna razlika ( $p \leq 0,05$ ) samo u odnosu na liniju *dms3-1*. Na 30 °C klijanci linija 6TV i *dms3-1* imaju duže korijene od divljeg tipa. Na 32 i 35 °C nema značajne promjene u duljini korijena između linija i sve imaju niže vrijednosti osobito na 35 °C.

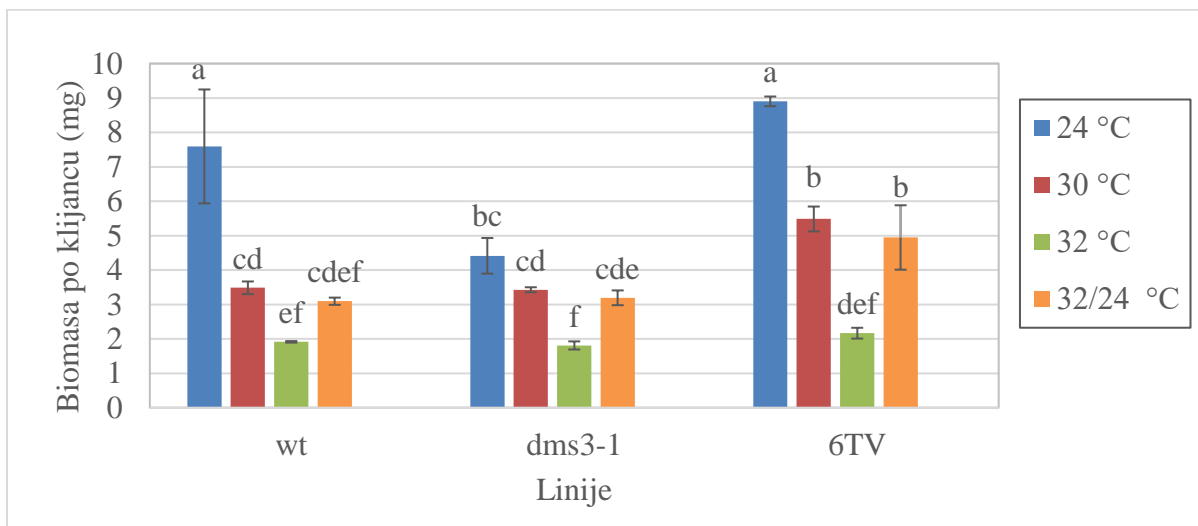


Slika 6. Učinak povišenih temperatura (30, 32, 32/24 i 35 °C) na duljinu korijena klijanaca divljeg tipa (wt) te linija s promijenjenom ekspresijom gena *DMS3* (*dms3-1* i 6TV) biljke *Arabidopsis thaliana*. 24 °C je kontrolna temperatura. Temperatura 32/24 °C podrazumijeva izloženost sjemenki temperaturi od 32 °C preko dana, a 24 °C preko noći. Različita slova označavaju statistički značajnu razliku između temperaturnih tretmana ( $p \leq 0,05$ ). Rezultati prikazuju srednju vrijednost ( $n=4$ )  $\pm$  standardna pogreška.

### 3.1.3. Biomasa po klijancu

Najviše vrijednosti biomase po klijancu izmjerene su kod klijanaca linije *6TV* na kontrolnoj temperaturi te su statistički značajno veće ( $p \leq 0,05$ ) od vrijednosti izmjerenih za klijance navedene linije na tretmanima od 30, 32 i 32/24 °C (Slika 7). Na temperaturi od 32 °C biomasa po klijancu je najmanja i značajno se razlikuje ( $p \leq 0,05$ ) od vrijednosti izmjerenih za ostale tretmane. Vrijednosti biomase po klijancu linije *dms3-1* su najviše pri kontrolnoj temperaturi, ali nisu značajno veće od 30 i 32/24 °C. Na 32 °C vrijednosti biomase po klijancu su najniže i značajno se razlikuju ( $p \leq 0,05$ ) od svih ostalih. Divlji tip ima najviše vrijednosti biomase po klijancu također na kontrolnoj temperaturi, koje su statistički značajno veće ( $p \leq 0,05$ ) od vrijednosti izmjerenih za 30, 32 i 32/24 °C. Kao i kod linija *6TV* i *dms3-1*, vrijednosti biomase po klijancu su najniže na 32 °C te se značajno razlikuju ( $p \leq 0,05$ ) od kontrolne temperature i 30 °C.

Usporedbom linija može se uočiti da je najviša vrijednost biomase po klijancu izmjerena kod linije *6TV* pri kontrolnoj temperaturi te je statistički značajno veća ( $p \leq 0,05$ ) u odnosu na liniju *dms3-1*. Na 30 i 32/24 °C linije *6TV* biomasa po klijancu je značajno veća u odnosu na liniju *dms3-1* i divlji tip, a na 32 °C nema značajne promjene među linijama.



Slika 7. Učinak povišenih temperatura (30, 32 i 32/24 °C) na vrijednosti biomase po klijancu, klijanaca divljeg tipa (wt) te linija s promijenjenom ekspresijom gena *DMS3* (*dms3-1* i *6TV*) biljke *Arabidopsis thaliana*. 24 °C je kontrolna temperatura. Temperatura 32/24 °C podrazumijeva izloženost sjemenki temperaturi od 32 °C preko dana, a 24 °C preko noći. Različita slova označavaju statistički značajnu razliku između temperaturnih tretmana ( $p \leq 0,05$ ). Rezultati prikazuju srednju vrijednost ( $n=4$ )  $\pm$  standardna pogreška.

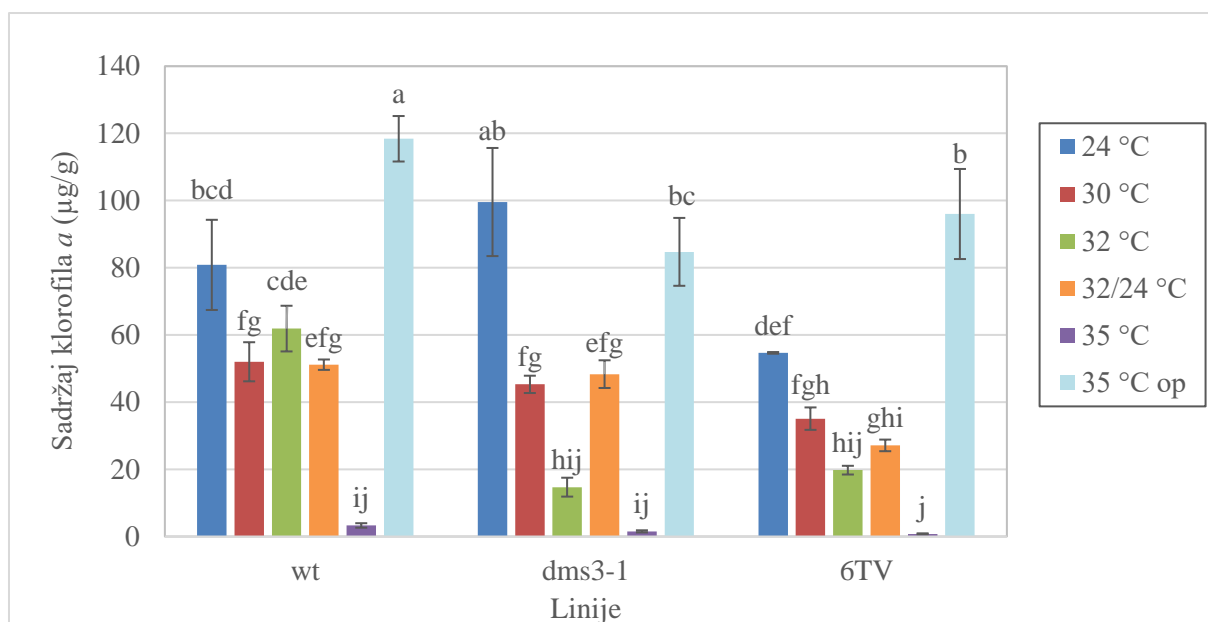
## 3.2. Biokemijski parametri

Budući da su klijanci svih linija nakon temperaturnog tretmana od 35 °C bili oštećeni i slabo razvijeni, stavila sam ih u komoru na 24 °C kako bi se oporavili. Nakon otprilike dva tjedna, kada su prema morfološkim stadijima bili na razini klijanaca tretiranih kontrolnom temperaturom, iskorišteni su za mjerenje različitih biokemijskih parametara i usporedbu s ostalim temperaturama.

### 3.2.1. Sadržaj fotosintetskih pigmenata

Sadržaj klorofila *a* kod klijanaca divljeg tipa na kontrolnoj temperaturi je značajno veći ( $p \leq 0,05$ ) od vrijednosti izmjerenih kod klijanaca na svim istraživanim povišenim temperaturama, osim na 32 °C, gdje razlika nije značajna (Slika 8). Na temperaturi od 35 °C došlo je do izrazitog pada sadržaja klorofila *a* koji je značajno niži u odnosu na ostale temperaturne tretmane. Međutim, vrijednosti mjerene nakon oporavka klijanaca pokazuju povećanje sadržaja čak i u odnosu na 24 °C. Kod linije *dms3-1* najveći sadržaj klorofila *a* je izmjeren u klijancima na kontrolnoj temperaturi te je značajno veći u odnosu na sve temperaturne tretmane. Na temperaturama 32 i 35 °C došlo je do značajnog pada u sadržaju klorofila *a* u odnosu na temperature od 30 i 32/24 °C. Klijanci nakon oporavka pokazuju porast sadržaja. Sadržaj klorofila *a* kod klijanaca linije *6TV* na kontrolnoj temperaturi je značajno veći ( $p \leq 0,05$ ) od vrijednosti izmjerenih na ostalim temperaturnim tretmanima, osim na tretmanu 30 °C, gdje razlika nije značajna. Najniži sadržaj izmjeren je kod klijanaca na 35 °C, ali je on nakon oporavka značajno veći.

Usporedbom rezultata između linija vidljivo je da klijanci linije *6TV* na 24 °C imaju najniži sadržaj klorofila *a* (Slika 8). Na temperaturama 30, 32/24 i 35 °C nisu uočene značajne razlike između linija, dok je na 32 °C i nakon oporavka značajno veća vrijednost klorofila *a* izmjerena u klijancima divljeg tipa.

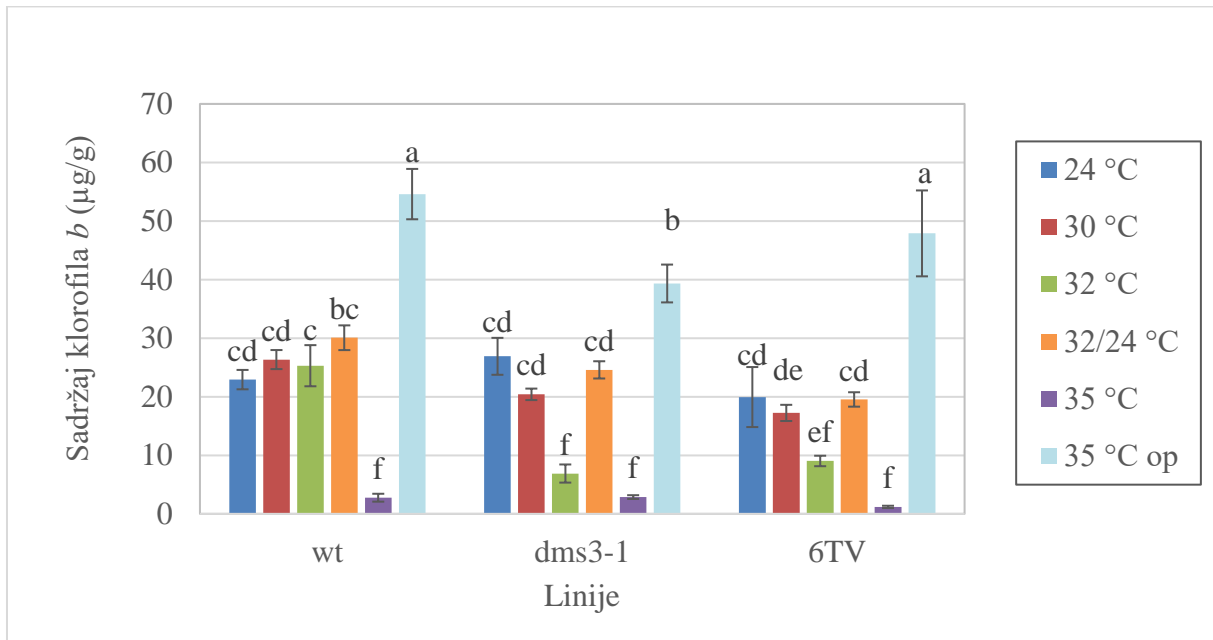


Slika 8. Učinak povišenih temperatura (30, 32, 32/24 i 35 °C) na sadržaj klorofila *a* u tkivu klijanaca divljeg tipa (wt) te linija s promijenjenom ekspresijom gena *DMS3* (*dms3-1* i *6TV*) biljke *Arabidopsis thaliana*. 24 °C je kontrolna temperatura. Temperatura 32/24 °C podrazumijeva izloženost sjemenki temperaturi od 32 °C preko dana, a 24 °C preko noći. Temperatura 35 °C op odnosi se na oporavak klijanaca na 24 °C nakon tog tretmana. Različita slova označavaju statistički značajnu razliku između temperaturnih tretmana ( $p \leq 0,05$ ). Rezultati prikazuju srednju vrijednost ( $n=4$ )  $\pm$  standardna pogreška.

Sadržaj klorofila *b* kod klijanaca divljeg tipa na temperaturi od 32/24 °C je nešto veći od vrijednosti izmjerenih na kontrolnoj temperaturi te 30 i 32 °C, ali bez značajne razlike (Slika 9). Na temperaturi od 35 °C došlo je do izrazitog pada sadržaja klorofila *b*, koji je značajno niži u odnosu na ostale temperaturne tretmane. Međutim, vrijednosti mjerene nakon oporavka klijanaca pokazuju značajno veći sadržaj u odnosu na sve ostale vrijednosti. Kod klijanaca linije *dms3-1* sadržaj klorofila *b* na kontrolnoj temperaturi je malo veći od vrijednosti izmjerenih na 30 i 32/24 °C, ali bez značajne razlike. Na temperaturama od 32 i 35 °C došlo je do značajnog pada u sadržaju klorofila *b* u odnosu na ostale temperaturne tretmane. Klijanci nakon oporavka pokazuju značajno veći sadržaj. Sadržaj klorofila *b* kod klijanaca linije *6TV* je također na kontrolnoj temperaturi malo veći od vrijednosti izmjerenih na 30 i 32/24 °C, ali značajna razlika nije prisutna, za razliku od temperatura na 32 i 35 °C, gdje se vrijednosti sadržaja značajno razlikuju ( $p \leq 0,05$ ) od svih ostalih. Nakon oporavka klijanaca izmjeren je značajno veći sadržaj.

Usporedbom rezultata između linija vidljivo je da klijanci linije *6TV* na kontrolnoj temperaturi imaju najniži sadržaj klorofila *b*, ali bez značajne razlike u odnosu na klijance

linije *dms3-1* i divlji tip (Slika 9). Na temperaturama od 30, 32/24 i 35 °C nisu uočene značajne razlike između linija, dok je na 32 °C značajno veća vrijednost klorofila *b* izmjerena kod klijanaca divljeg tipa. Kod oporavka pri 35 °C klijanci linije *dms3-1* imaju značajno nižu vrijednost sadržaja u odnosu na liniju 6TV i divlji tip.

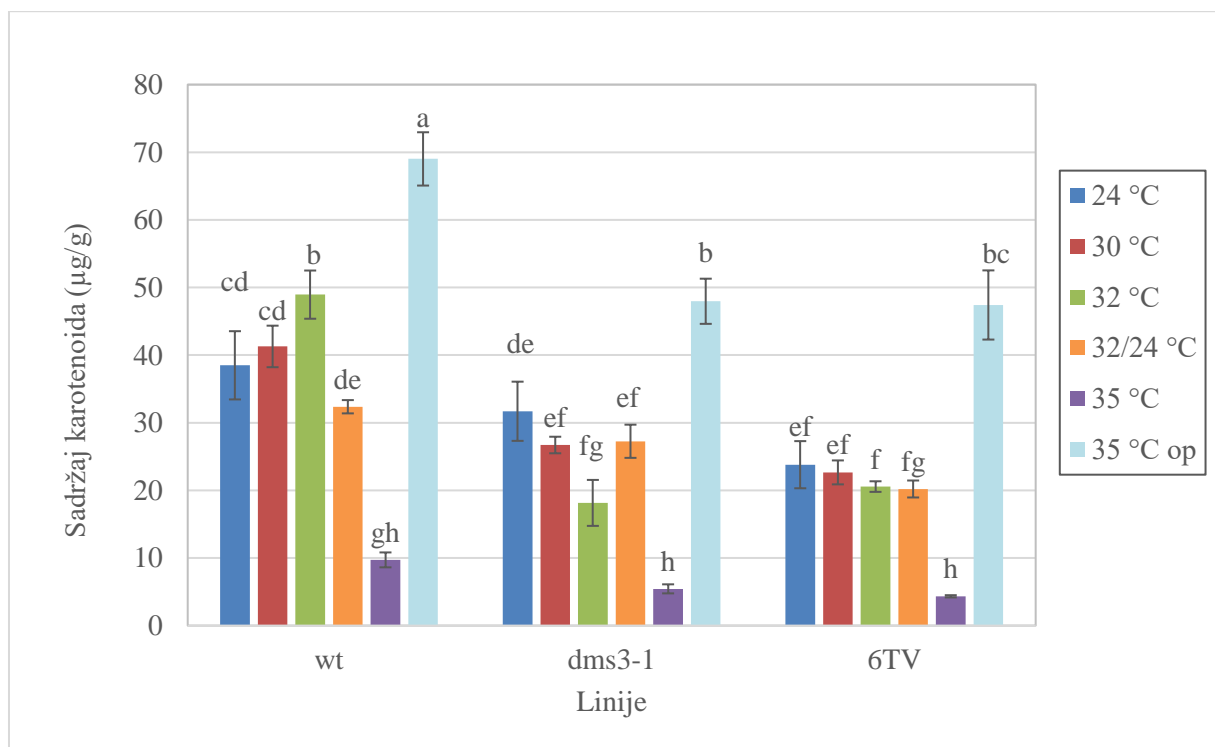


Slika 9. Učinak povišenih temperatura (30, 32, 32/24 i 35 °C) na sadržaj klorofila *b* u tkivu klijanaca divljeg tipa (wt) te linija s promijenjenom ekspresijom gena *DMS3* (*dms3-1* i 6TV) biljke *Arabidopsis thaliana*. 24 °C je kontrolna temperatura. Temperatura 32/24 °C podrazumijeva izloženost sjemenki temperaturi od 32 °C preko dana, a 24 °C preko noći. Temperatura 35 °C op odnosi se na oporavak klijanaca na 24 °C nakon tog tretmana. Različita slova označavaju statistički značajnu razliku između temperaturnih tretmana ( $p \leq 0,05$ ). Rezultati prikazuju srednju vrijednost ( $n=4$ )  $\pm$  standardna pogreška.

Sadržaj karotenoida kod klijanaca divljeg tipa na temperaturi od 32 °C je značajno veći ( $p \leq 0,05$ ) od vrijednosti izmjerenih na kontroli i ostalim temperaturnim tretmanima (Slika 10). Najniži sadržaj izmjeren je kod klijanaca na 35 °C, ali je nakon oporavka izmjeren značajno veći sadržaj. Kod klijanaca linije *dms3-1* sadržaj karotenoida na kontrolnoj temperaturi je malo veći od vrijednosti izmjerenih na 30 i 32/24 °C, ali bez značajne razlike, osim u odnosu na 32 °C. Na temperaturi od 35 °C došlo je do izrazitog pada sadržaja karotenoida, koji je značajno niži u odnosu na ostale temperaturne tretmane. Vrijednosti mjerene nakon oporavka klijanaca pokazuju značajno veći sadržaj. Sadržaj karotenoida kod klijanaca linije 6TV je također na kontrolnoj temperaturi malo veći od vrijednosti izmjerenih na 30, 32 i 32/24 °C, ali značajna razlika nije prisutna. Na 35 °C su vrijednosti sadržaja

najniže i značajno se razlikuju ( $p \leq 0,05$ ) od svih ostalih. Značajno najviša vrijednost uočena je u klijancima nakon oporavka od 35 °C.

Usporedbom linija vidljivo je da klijanci linije 6TV na kontrolnoj temperaturi imaju najniži sadržaj karotenoida, statistički značajno manji ( $p \leq 0,05$ ) od klijanaca divljeg tipa (Slika 10). Na svim temperaturnim tretmanima, osim na 35 °C, divlji tip pokazuje značajno veći sadržaj karotenoida u odnosu na linije *dms3-1* i 6TV, među kojima nisu uočene značajne razlike. Kod oporavka od 35 °C klijanci divljeg tipa imaju značajno višu vrijednost sadržaja od klijanaca drugih dviju linija.



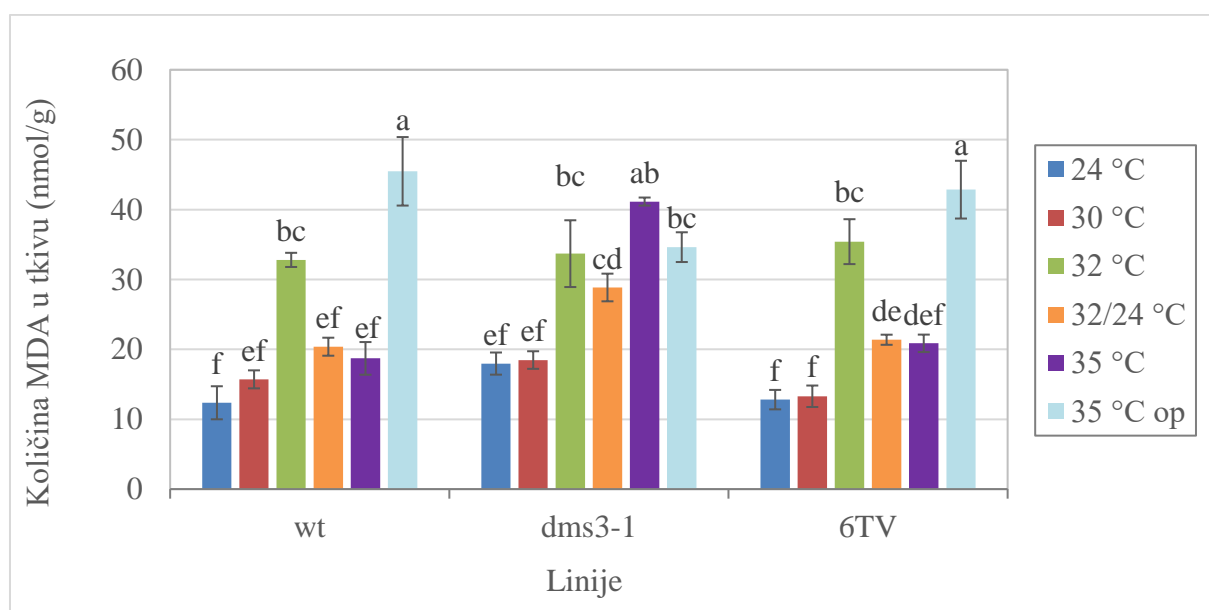
Slika 10. Učinak povišenih temperatura (30, 32, 32/24 i 35 °C) na sadržaj karotenoida u tkivu klijanaca divljeg tipa (wt) te linija s promijenjenom ekspresijom gena *DMS3* (*dms3-1* i 6TV) biljke *Arabidopsis thaliana*. 24 °C je kontrolna temperatura. Temperatura 32/24 °C podrazumijeva izloženost sjemenki temperaturi od 32 °C preko dana, a 24 °C preko noći. Temperatura 35 °C op odnosi se na oporavak klijanaca na 24 °C nakon tog tretmana. Različita slova označavaju statistički značajnu razliku između temperaturnih tretmana ( $p \leq 0,05$ ). Rezultati prikazuju srednju vrijednost ( $n=4$ )  $\pm$  standardna pogreška.



### 3.2.2. Količina MDA u tkivu

U odnosu na kontrolnu temperaturu od 24 °C značajno viša ( $p \leq 0,05$ ) količina malondialdehida (MDA) u tkivu zabilježena je kod klijanaca divljeg tipa i linije 6TV pri tretmanu od 32 °C, dok su ostali temperaturni tretmani imali nešto više vrijednosti, ali razlike nisu bile značajne (Slika 11). Značajno najviša vrijednost uočena je u klijanacima na tretmanu od 35 °C, ali nakon oporavka. Nasuprot tomu, klijanci linije *dms3-1* imaju u odnosu na 24 °C izmjerenu značajno višu količinu MDA na tretmanima od 32, 32/24 i 35 °C, kao i klijanci nakon oporavka od 35 °C. Vrijednost MDA kod tretmana od 35 °C značajno je viša od vrijednosti kod tretmana na 32/24 °C.

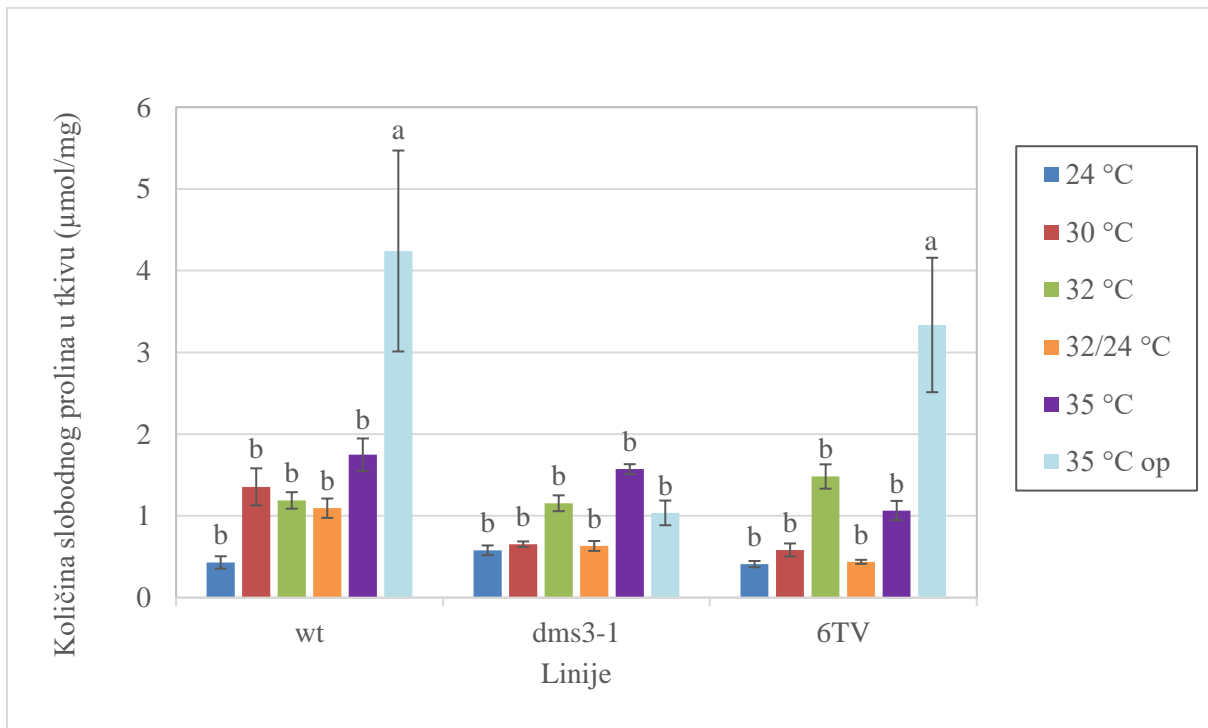
Ako se uspoređuje količina MDA između linija, vidljivo je da na temperaturama 24, 30 i 32 °C sve tri linije imaju slične vrijednosti (Slika 11). Na tretmanu od 32/24 °C klijanci linije *dms3-1* imaju značajno više MDA nego ostale dvije linije, a slično je i na tretmanu od 35 °C. Obratno je kod oporavka od 35 °C, gdje klijanci linije *dms3-1* imaju značajno nižu vrijednost MDA od klijanaca drugih dviju linija.



Slika 11. Učinak povišenih temperatura (30, 32, 32/24 i 35 °C) na količinu malondialdehida (MDA) u tkivu klijanaca divljeg tipa (wt) te linija s promijenjenom ekspresijom gena *DMS3* (*dms3-1* i 6TV) biljke *Arabidopsis thaliana*. 24 °C je kontrolna temperatura. Temperatura 32/24 °C podrazumijeva izloženost sjemenki temperaturi od 32 °C preko dana, a 24 °C preko noći. Temperatura 35 °C op odnosi se na oporavak klijanaca na 24 °C nakon tog tretmana. Različita slova označavaju statistički značajnu razliku između temperaturnih tretmana ( $p \leq 0,05$ ). Rezultati prikazuju srednju vrijednost ( $n=4$ )  $\pm$  standardna pogreška.

### 3.2.3. Količina slobodnog prolina u tkivu

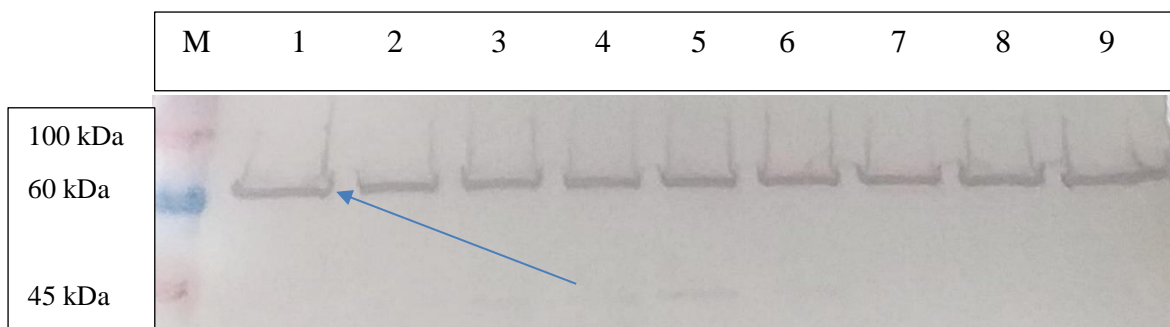
Najniža količina prolina u tkivu izmjerena je u klijancima na 24 °C kod svih triju linija (Slika 12). Gotovo tri puta veća vrijednost izmjerena je na tretmanu od 35 °C kod divljeg tipa i linije *dms3-1*, ali razlika u odnosu na ostale tretmane i kontrolu nije bila statistički značajna. Kod linije *6TV* viša vrijednost u odnosu na ostale tretmane i kontrolu izmjerena je na 32 °C, ali bez statističke značajnosti. S druge strane, klijanci divljeg tipa i linije *6TV* su nakon oporavka od 35 °C imali vrlo visoku razinu prolina u tkivu, značajno veću od svih ostalih izmjerenih kod obaju linija. Također, ta je vrijednost bila značajno viša od one kod klijanaca linije *dms3-1* nakon oporavka od 35 °C.



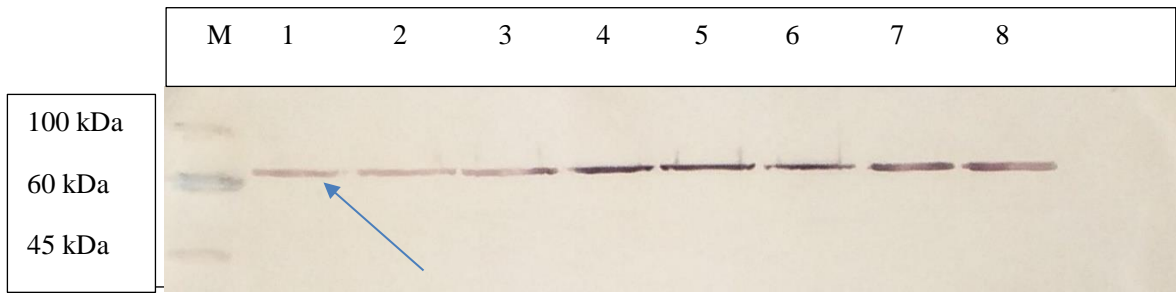
Slika 12. Učinak povišenih temperatura (30, 32, 32/24 i 35 °C) na količinu slobodnog prolina u tkivu klijanaca divljeg tipa (wt) te linija s promijenjenom ekspresijom gena *DMS3* (*dms3-1* i *6TV*) biljke *Arabidopsis thaliana*. 24 °C je kontrolna temperatura. Temperatura 32/24 °C podrazumijeva izloženost sjemenki temperaturi od 32 °C preko dana, a 24 °C preko noći. Temperatura 35 °C op odnosi se na oporavak klijanaca na 24 °C nakon tog tretmana. Različita slova označavaju statistički značajnu razliku između temperaturnih tretmana ( $p \leq 0,05$ ). Rezultati prikazuju srednju vrijednost ( $n=5$ )  $\pm$  standardna pogreška.

### 3.2.4. Proteini toplinskog šoka

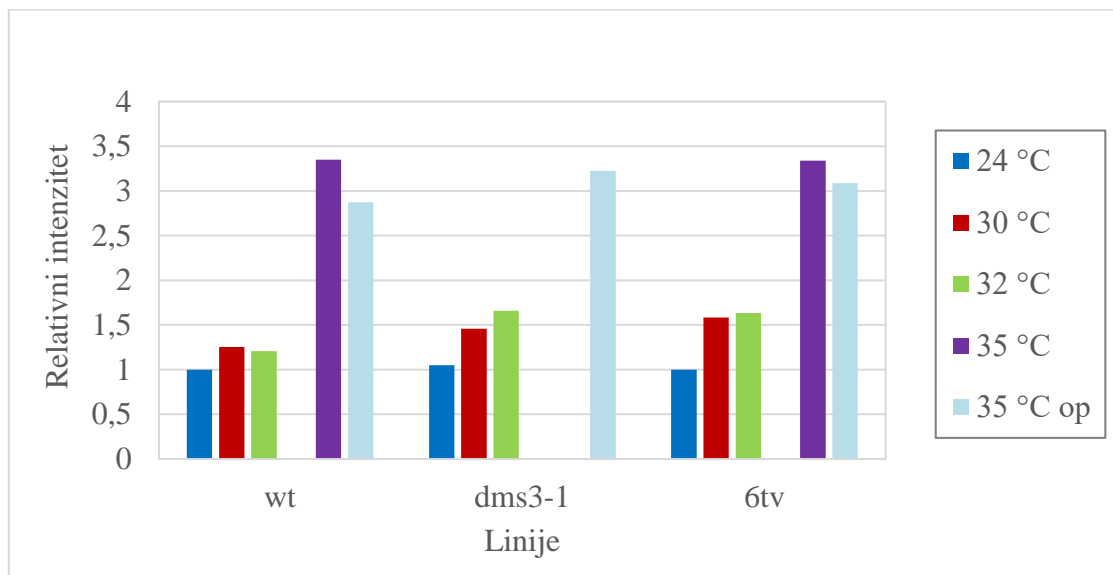
Imunodetekcijom proteina na nitroceluloznoj membrani dokazana je prisutnost izoforme proteina toplinskog šoka HSP70, molekularne mase ~ 70 kDa, na svim istraživanim tretmanima i kontroli (slike 13 i 14). Na temelju intenziteta proteinskih vrpca izračunat je relativni intenzitet prisutne proteinske izoforme za sve linije pri ispitivanim temperaturnim tretmanima (Slika 15). Najniži relativni intenzitet proteina HSP70 zabilježen je pri kontrolnoj temperaturi kod svih linija. Najveći relativni intenzitet proteina HSP70 zabilježen je pri tretmanima od 35 °C kod divljeg tipa i linije *6TV* te kod svih linija nakon oporavka od tretmana na 35 °C. Zbog izrazite inhibicije klijanja sjemenki linije *dms3-1* na temperaturi od 35 °C nije bilo dovoljno biomase za ekstrakciju proteina.



Slika 13. Imunodetekcija proteina HSP70 na nitroceluloznoj membrani uz primjenu specifičnih antitijela. Korišteni su proteinski uzorci klijanaca divljeg tipa (wt) te linija s promijenjenom ekspresijom gena *DMS3* (*dms3-1* i *6TV*) biljke *Arabidopsis thaliana* na kontrolnoj temperaturi od 24 °C, te na 30 i 32 °C. Oznake: 1– wt 24 °C, 2– *dms3-1* 24 °C, 3– *6TV* 24 °C, 4–wt 30 °C, 5– *dms3-1* 30 °C, 6– *6TV* 30 °C, 7– wt 32 °C, 8– *dms3-1* 32 °C, 9– *6TV* 32 °C. M – marker molekularnih masa, strelica – dobivena izoforma od ~ 70 kDa.



Slika 14. Imunodetekcija proteina HSP70 na nitroceluloznoj membrani uz primjenu specifičnih antitijela. Korišteni su proteinski uzorci klijanaca divljeg tipa (wt) te linija s promijenjenom ekspresijom gena *DMS3* (*dms3-1* i *6TV*) biljke *Arabidopsis thaliana* na 32 i 35 °C, te nakon oporavka od tretmana na 35 °C (35 °C op). Oznake: 1– wt 32 °C, 2– *dms3-1* 32 °C, 3– *6TV* 32 °C, 4–wt 35 °C op, 5–*dms3-1* 35 °C op, 6–*6TV* 35 °C op, 7– wt 35 °C, 8– *6TV* 35 °C. M – marker molekularnih masa, strelica – dobivena izoforma od ~ 70 kDa.



Slika 15. Relativni intenzitet proteina HSP70 u tkivu klijanaca divljeg tipa (wt) te linija s promijenjenom ekspresijom gena *DMS3* (*dms3-1* i *6TV*) biljke *Arabidopsis thaliana* na različitim povišenim temperaturama (30, 32 i 35 °C) te nakon oporavka od tretmana na 35 °C. Relativan intenzitet izražen je prema kontrolnoj temperaturi od 24 °C za koju je uzeta vrijednost 1. Kako bismo uzeli u obzir rezultate dviju različitih membrana, intenziteti su najprije normalizirani prema intenzitetu uzorka wt na 32 °C, koji se nalazi na obje membrane.

## 4. RASPRAVA

Toplinski stres predstavlja velik agroekonomski problem u mnogim dijelovima svijeta zbog privremeno i/ili trajno povišenih temperatura koje mogu uzrokovati niz morfoanatomskih, fizioloških, biokemijskih i molekularnih promjena u biljkama te utjecati na njihov rast i razvoj. Međutim, utjecaj koji će toplinski stres imati na neku biljku uvelike ovisi o njegovu intenzitetu te vrsti i razvojnom stadiju te biljke. Budući da su biljne vrste osjetljivije na toplinski stres u reproduktivnoj fazi životnog ciklusa, visoke temperature mogu usporiti ili u potpunosti inhibirati proces klijanja (Prasad i Staggenborg 2008; Wahid i sur. 2007). Klijavost je bitno svojstvo koje odražava kakvoću sjemenki te u velikoj mjeri utječe na biomasu određene vrste te prinos usjeva (Bukvić i sur. 2010).

Postotak klijavosti jedan je od morfoloških parametara koji je određivan kako bih mogla pratiti utjecaj povišenih temperatura na klijanje sjemenki različitih linija uročnjaka. Sjemenke kod kojih je bilo uočeno probijanje korijena su smatrane proklijalim. Dobiveni rezultati jasno pokazuju da divlji tip ima najviši postotak klijavosti na kontrolnoj temperaturi od 24 °C i temperaturnom tretmanu od 32/24 °C, čak preko 97%, a najniži na 35 °C (< 80%). Ti rezultati su u skladu s očekivanjima, s obzirom na to da kontrola predstavlja idealne uvjete, temperatura od 32/24 °C predstavlja uvjete slične onima u prirodi s nižim noćnim temperaturama, a 35 °C, kao najviša temperatura, usporila je proces klijanja i inhibirala klijanje sjemenki. Međutim, temperaturni tretman od 32 °C nije značajno utjecao na klijanje pa su te vrijednosti bile slične kontrolnima, što je bilo neočekivano. Naime, pokazano je da već temperatura od 33,5 °C uzrokuje 50%-tnu inhibiciju klijanja sjemenki (Tokić i sur. 2021). Malabarba i sur. (2021) radili su istraživanje utjecaja toplinskog stresa na različite procese tijekom sazrijevanja sjemenki divljeg tipa vrste *A. thaliana* (ekotip Col), među kojima je i kapacitet klijanja. Utvrdili su da se kapacitet klijanja sjemenki s biljaka koje su bile na temperaturnom tretmanu 10 dana (od 4. do 14. dana nakon fertilizacije) progresivno smanjio pod utjecajem povišenih temperatura, iako je najviša izmjerena temperatura bila 29 °C, ali je smanjila kapacitet klijanja za 45%, desetog dana mjerenja. Temperature od 25 i 27 °C također su smatrane toplinskim tretmanima jer su uspjele smanjiti kapacitet klijanja za čak 20 i 35%, čime je pomaknuta donja granica toplinskog stresa. Temperaturni tretmani od 21 i 23 °C predstavljali su kontrolu te nisu imali utjecaj na klijanje. Silva-Correia i sur. (2014) istraživali su utjecaj dosta viših temperatura na klijanje divljeg tipa uročnjaka. Prvi eksperiment sastojao se od izlaganja sjemenki istoj temperaturi (50 °C) kroz različite vremenske razmake (0 – 300

min), a drugi eksperiment podrazumijevao je izlaganje sjemenki rasponu temperatura (40 – 57 °C) kroz isti vremenski razmak od 60 min. Očekivano, klijavost je bila ugrožena u oba slučaja zbog prilično visokih tretmana, ali su se biljke nakon 12 dana oporavile, dokazujući da ni te temperature ne stvaraju letalni učinak. Nedosljednost rezultata u literaturnim podacima posljedica je različitih protokola kojima se istraživala termotolerancija kod uročnjaka i različitih stadija biljaka, pa je u budućnosti potrebno koristiti se standardiziranim protokolima (Silva Correia i sur. 2014). Istraživanja na drugim biljnim vrstama, poput riže (*Oryza sativa* L.), pokazuju malo drugačije rezultate (Begcy i sur. 2018). Rižine sjemenke bile su izložene temperaturi od 35 °C, koja je predstavljala umjereni toplinski stres, na 24, 48 i 72 sata. Sjemenke koje su 24 i 48 sati bile izložene tretmanu pokazale su višu stopu klijanja od onih koje su bile na kontroli. Smatra se da je uzrok tomu biosinteza nekih hormona, kao što su apscizinska kiselina (ABA) i giberelini, koja je potaknuta umjerenim toplinskim stresom koji utječe na ekspresiju njihovih gena tijekom ranog razvoja sjemenki. Ipak, većina istraživanja potvrđuje da supraoptimalne temperature smanjuju kapacitet i brzinu klijanja linearno s porastom temperature (Essemine i sur. 2010; Prasad i Staggenborg 2008; Wahid i sur. 2007). Kod rajčice (*Lycopersicon esculentum* Mill.) je utvrđena inhibicijska temperatura klijanja također bila 35 °C (Wahid i sur. 2007).

Sljedeći morfološki parametar koji je određivan bila je duljina korijena. Rezultati dobiveni za divlji tip su djelomično očekivani. Naime, najviše vrijednosti duljine korijena kod klijanaca divljeg tipa izmjerene su pri temperaturnom tretmanu od 32/24 °C, što predstavlja uvjete koji bi mogli prevladavati u prirodi budući da su noći hladnije i imaju manju temperaturu, pa nije iznenađujuće da joj se divlji tip dobro prilagodio. Najkraći korijeni izmjereni su na 35 °C, što je u skladu s očekivanjima, s obzirom da povišene temperature mogu utjecati na njihovu duljinu ili odgoditi pojavu emergencije (Wahid i sur. 2007). Poznato je da visoke temperature utječu na fluidnost i propusnost membrana te aktivnost enzima, što može dovesti do neravnoteže u metabolizmu i stvaranja aktivnih vrsta kisika koje uzrokuju oksidativni stres, što dovodi do smanjene fotosinteze, poremećene translokacije asimilata i u konačnici, promijenjenog rasta (Larkindale i sur. 2005). Međutim, neočekivano je da su vrijednosti dobivene na 32 °C bile značajno veće od vrijednosti na kontroli, koje su manje i od vrijednosti izmjerenih na 30 °C. Razlozi tomu mogu biti tehničke prirode, kao npr. temperaturna odstupanja tijekom izlaganja, iako senzor nije pokazivao veće promjene od  $\pm 2$  °C. U istraživanju u kojem su nabubrele sjemenke bile izložene temperaturi od 44,5 °C tijekom 150 min i zatim stavljene na oporavak, uočen je 90%-tni rast korijena u odnosu na

kontrolu (Su i Li 2008), što znači da izložene sjemenke nisu pretrpjele značajna oštećenja. Kad su isti autori izlagali klijance stare sedam dana istoj temperaturi, sve su sjemenke uginule nakon 40-minutnog izlaganja, dok su 30-minutno izlaganje preživjele, što potvrđuje da su sjemenke otpornije na toplinski stres od klijanaca. Podaci iz literature podupiru ideju da biljke trpe različite vrste oštećenja u različitim fazama rasta, pa su tako oštećenja veća u starijim klijancima koji su rasli na svjetlu u usporedbi s mlađim klijancima uzgajanim u tami (Larkindale i sur. 2005). Istraživanje provedeno na rajčici (*Lycopersicon esculentum* Mill.) pokazalo je značajno povećanje duljine radikula nakon izlaganja sjemenki temperaturama od 50 i 60 °C kroz vrijeme od 30 min, jedan sat i dva sata (Ibrahim i El- Muqadam 2019). Međutim, budući da je svrha tog istraživanja bila povećavanje tolerancije biljaka na toplinski stres kroz proces „otvrdnjivanja“, odnosno izlaganja sjemenki visokim temperaturama prije sijanja, može se zaključiti da je taj mehanizam bio uspješan u ublažavanju štetnih učinaka toplinskog stresa jer se korijenje nije smanjilo. Postavlja se pitanje bi li se duljina radikula smanjila da su temperaturna izlaganja u tom eksperimentu bila dulja te učinkovitost procesa izlaganja sjemenki povišenim temperaturama prije sijanja u obrani od toplinskog stresa kod drugih vrsta.

Zadnji morfološki parametar koji je određivan bila je biomasa po klijancu. Vrijednost biomase je izravna posljedica klijanja (Bukvić i sur. 2010) te razvoja ostalih dijelova biljke. Rezultati mjerenja biomase po klijancu dobiveni za divlji tip su u skladu s očekivanjima. Najviša vrijednost izmjerena je na kontrolnoj temperaturi od 24 °C, a vrijednosti su se proporcionalno smanjivale s povećanjem temperature, pa su one najniže zabilježene na 32 °C (< 2 mg). Klijancima koji su bili izloženi tretmanu od 35 °C izmjerena biomasa po klijancu je bila premala, pa te vrijednosti nisu uvrštene u rezultate, već su klijanci stavljeni na oporavak u komoru na 24 °C kako bi se utvrdilo koliko im je vremena potrebno da se oporave od negativnog učinka te temperature te su iskorišteni za kasnija mjerenja biokemijskih parametara. Smanjenje ukupne biomase kao posljedica toplinskog stresa zabilježeno je i kod drugih vrsta kao što su pšenica (*Triticum aestivum* L.), kukuruz (*Zea mays* L.), šećerna trska (*Saccharum officinarum* L.) (Ashraf i Hafeez 2004; Ebrahim i sur. 1998), gdje su se sve temperature iznad 40 °C pokazale štetnima. Biomasa je bila smanjena zbog snižene stope asimilacije i smanjenja mase suhe tvari. Iz svega navedenog mogu zaključiti da je biomasa bila osjetljiviji pokazatelj od duljine korijena. Budući da je biomasi najviše pridonijela masa kotiledona, moguće je da je to posljedica većih oštećenja zelenog tkiva uslijed toplinskog

stresa. Naime, u kotiledonima zbog povišene temperature dolazi do inhibicije fotosinteze, što rezultira povećanom razinom ROS i posljedično većim oštećenjima.

Kako bi se utvrdila uloga metilacije u odgovoru na toplinski stres, koristila sam uz divlji tip i dvije linije uročnjaka s promijenjenom ekspresijom gena za metilaciju *DMS3* – liniju *dms3-1* u kojoj je gen *DMS3* mutiran, te transgeničnu liniju *oeDMS3* (nazvanu *6TV*), u kojoj je gen pojačano eksprimiran. Dosadašnja istraživanja na linijama s promijenjenim genom *DMS3* pokazala su da linija *dms3-1*, koja sintetizira nefunkcionalni protein DMS3 neophodan za provođenje metilacije DNA posredovanom molekulama RNA, ima značajno smanjenu metilaciju (Kanno i sur. 2008). Biljke te linije zaostaju u rastu i kasnije cvjetaju u odnosu na divlji tip, dok se linija koja ima prekomjernu ekspresiju proteina DMS3 (*6TV*) ne razlikuje značajno (Tokić i sur. 2021). Pri mjerenju postotka klijavosti, usporedbom između linija uočeno je da sjemenke divljeg tipa i linije *6TV* imaju statistički značajno veće postotke klijavosti u odnosu na liniju *dms3-1* pri svim temperaturama uključujući i kontrolnu, a pri 35 °C linija *6TV* ima čak i veću klijavost od divljeg tipa. Također, praćenjem stadija razvoja klijanaca uočila sam da je s povišenjem temperature razvoj klijanaca usporen, što je bilo osobito izraženo kod klijanaca linije *dms3-1*. Rezultati istraživanja Tokić i sur. (2021), koje je također provedeno na linijama *dms3-1* i *6TV*, pokazuju da te dvije linije imaju 50%-tnu inhibiciju klijanja pri temperaturi od 33,5 °C, slično kao i divlji tip. Međutim, kada su sedam dana stari klijanci svih linija bili izlagani temperaturi od 45 °C kroz 45 min, klijanci linije *dms3-1* su sedmoga dana oporavka imali samo 5%-tno preživljenje u odnosu na klijance divljeg tipa i linije *6TV*, koji su imali postotak preživljenja 40 i 25%. Rezultati mojeg istraživanja djelomično su u skladu s navedenim, budući da se linija *dms3-1* pokazala osjetljivijom na povišenu temperaturu od divljeg tipa, dok se linija *6TV* pokazala otpornijom. Razlog tomu može biti pojačana ekspresija proteina DMS3 kod linije *6TV*, što dovodi do pojačane metilacije *de novo*, a jedna od uloga metilacije je zaštita genoma i održavanje njegove stabilnosti kroz metiliranje transpozona i ostalih ponavljajućih sekvenci koje se aktiviraju pri stresnim uvjetima. Kod linije *dms3-1* taj protein nije funkcionalan i metilacija je smanjena, što je moglo uzrokovati kašnjenje u razvoju te veću osjetljivost na toplinski stres. Međutim, Lin i sur. (2017) utvrdili su, koristeći mutant *A. thaliana ddc* (*drm1drm2cmt2cmt3*) kojem nedostaju sve DNA metiltransferaze (DRM1, DRM2, CMT2 i CMT3) potrebne za metilaciju izvan CG konteksta, da su se *ddc* sjemenke razvile normalno bez uočljivih morfoloških razlika i s istom razinom klijavosti kao i divlji tip. Stoga su zaključili da metilacija u kontekstu CHG ili CHH ne igra značajnu ulogu u razvoju sjemena



uročnjaka te da njezin nedostatak ne utječe na morfogenezu sjemena, sazrijevanje, mirovanje ili klijanje (Lin i sur. 2017). S obzirom na navedeno istraživanje, moguće je da protein DMS3 ima i neke druge važne uloge. U dosadašnjim istraživanjima utvrđeno je da protein DMS3 ulazi u interakciju s proteinima BPM koji imaju ulogu u degradaciji transkripcijskih faktora (Jagić i sur. 2018; Rendulić 2018), ali su potrebna daljnja istraživanja koja bi razjasnila značenje te interakcije te učinak na procese u biljkama.

Osim morfoloških promjena toplinski stres može izazvati i mnoge biokemijske promjene u biljkama, koje posebno dolaze do izražaja u kasnijem razvojnom stadiju. Jedan od najvažnijih metaboličkih procesa u biljkama je proces fotosinteze, posebno osjetljiv na visoke temperature koje mogu smanjiti njegov intenzitet ili ga potpuno inhibirati (Pevalek-Kozlina 2003). Toplinski stres može utjecati na sve komponente fotosintetskog aparata, među kojima je najvažniji klorofil *a* – pigment koji omogućuje primarne reakcije. U drugom dijelu svog eksperimenta pratila sam utjecaj povišenih temperatura na različite biokemijske parametre, od kojih sam najprije mjerila sadržaj fotosintetskih pigmenata – klorofila *a* i *b* te karotenoida.

Rezultati mjerenja sadržaja klorofila *a* za divlji tip su većinom u skladu s očekivanjima, s obzirom da su svi tretmani povišenom temperaturom doveli do snižene vrijednosti u odnosu na kontrolu. Rezultati dobiveni za sadržaj klorofila *b* divljeg tipa malo odstupaju od očekivanja jer ne dolazi do sniženja, osim kod temperature od 35 °C. Značajan pad vrijednosti sadržaja klorofila *a* i *b* na višim temperaturama vjerojatno je posljedica razgradnje klorofila ili inhibicije njegove sinteze pod utjecajem toplinskog stresa ili oboje. Klorofil *a* pokazao se kao osjetljiviji parametar od klorofila *b* jer su na njega djelovale niže temperature nego na klorofil *b*. Proces biosinteze klorofila uključuje niz enzimatskih reakcija, koje mogu biti inhibirane ili usporene pod utjecajem povišenih temperatura, što rezultira smanjenim razinama klorofila ili njegovim nedostatkom (Li i sur. 2018) koji se najjasnije očituje pojavom kloroze – žućkastog obojenja zbog gubitka zelenog pigmenta. Svi klijanci na 35 °C su bili klorotični. Enzim klorofilaza katalizira razgradnju klorofila jer uništava njegovu strukturu, a smatra se da u degradaciji sudjeluju i neke peroksidaze koje se aktiviraju pri višim temperaturama (Hu i sur. 2020). Međutim, kod klijanaca koji su bili na oporavku izmjerene su najviše vrijednosti fotosintetskih pigmenata, iz čega se može zaključiti da temperatura od 35 °C ne uzrokuje nepovratnu štetu u biljkama, te da je nakon relativno kratkog oporavka u klijancima opet uspostavljena metabolička ravnoteža. Rezultati sadržaja karotenoida su također pomalo neobični, jer kod klijanaca divljeg tipa na temperaturi od 32 °C pokazuju značajno veće vrijednosti od onih izmjerenih na kontroli i ostalim temperaturnim tretmanima.

To bi se moglo pripisati zaštitničkoj ulozi karotenoida koji štite fotosintetski aparat od potencijalnog oksidacijskog stresa uzrokovanog toplinskim stresom, pa im je pri toj temperaturi veći sadržaj. Međutim, sadržaj karotenoida izmjeren na 35 °C je značajno smanjen, što upućuje na to da bi ta temperatura mogla za njih biti inhibicijska. Kipp i Boyle (2013) su također ispitali učinke toplinskog stresa na koncentraciju klorofila divljeg tipa (Col) vrste *Arabidopsis thaliana* te su zabilježili pad koncentracije klorofila za 41,4% kod biljaka koje su bile izložene stresnom tretmanu od 29 °C po danu, za razliku od kontrolne skupine na 23 °C, što je u skladu s rezultatima dobivenim u ovom radu. Feng i sur. (2014) su istraživali utjecaj toplinskog stresa od 30 °C na fotosintetske karakteristike različitih kultivara zimske pšenice te su zabilježili značajno smanjenje u sadržaju klorofila *a* i *b* te karotenoida kod obaju kultivara, čak i onog otpornijeg. Deset dana nakon izlaganja kultivara stopa fotosinteze se smanjila za 69,9 i 59,3%. Mohi-Ud-Din i sur. (2021) također su radili istraživanja na različitim kultivarima pšenice koji su bili izlagani toplinskom stresu od 35 °C te su zabilježili značajno smanjenje koncentracije klorofila *a* i karotenoida kod svih prisutnih kultivara u odnosu na kontrolnu skupinu. Istraživanje koje je pokazalo suprotne rezultate proveli su Ibrahim i El- Muqadam (2019) na rajčici, gdje je pri tretmanu od 60 °C kroz 2 sata dobiveno povećanje klorofila *a* i *b* te karotenoida, međutim razlog tomu je vjerojatno povećavanje tolerancije biljaka na toplinski stres u kasnijoj fazi života jer su sjemenke prije sijanja bile izložene visokim temperaturama do 70 °C.

Ako pogledamo linije s promijenjenom ekspresijom gena za metilaciju *DMS3*, uočava se da je kod linije *dms3-1* također došlo do značajnog pada klorofila *a* s povišenjem temperature, ali je ovdje do izrazitijeg pada došlo već na 32 °C, a slično je i s klorofilom *b*, što bi išlo u prilog tomu da je ova linija osjetljivija na toplinski stres, a što su pokazali i rezultati morfoloških parametara. Međutim, linija *6TV* pri svim temperaturnim tretmanima ima sličnije vrijednosti fotosintetskih pigmenata onima linije *dms3-1*, dakle niže od onih kod divljeg tipa, a čak u kontrolnim uvjetima na 24 °C ima najniže vrijednosti klorofila. U istraživanju Vitko i sur. (neobjavljeni rezultati) na klijancima starim 12 dana izloženim povišenoj temperaturi od 37 °C tijekom šest sati, također je utvrđeno da u kontrolnim uvjetima (24 °C) biljke linije *6TV* imaju manji sadržaj klorofila *a* u usporedbi s biljkama divljeg tipa, dok je kod biljaka linije *dms3-1* sadržaj klorofila *a* sličniji onom kod divljeg tipa. S druge strane, kod linije *dms3-1* sadržaj klorofila *b* je bio veći u odnosu na divlji tip, a sličan onome kod linije *6TV*. Ukupni karotenoidi su kod obje linije bili niži nego kod divljeg tipa. Odmah nakon izlaganja temperaturi od 37 °C nije došlo do značajne promjene fotosintetskih

pigmenata, iako je sadržaj klorofila *a* bio nešto niži. Nakon perioda oporavka od 24 sata na 24 °C došlo je do sniženja sadržaja klorofila *a* i karotenoida kod linije *dms3-1*, dok je klorofil *b* bio snižen kod linije *6TV*. Navedeno istraživanje pokazuje određene sličnosti s mojim, osobito kada je riječ o razlici između linija u kontrolnim uvjetima. Moguće je da metilacija utječe na regulaciju sadržaja fotosintetskih pigmenata. Međutim, u istraživanju uloge metilacije u razvoju kloroplasta nisu nađene razlike u ozelenjavanju niti procesu fotosinteze kod mutanata uročnjaka s promijenjenim RdDM putem (Wang i sur. 2020). Kada je riječ o razlikama u odgovoru na povišenu temperaturu između linija, one su posljedica različitog trajanja tretmana, koje je u istraživanju Vitko i sur. (neobjavljeni rezultati) bilo kraće i na višoj temperaturi, te različite faze razvoja u kojoj su klijanci izlagani. Budući da linija *6TV* pokazuje općenito bolji rast od linije *dms3-1* i divljeg tipa, smanjena količina fotosintetskih pigmenata bila je neočekivana, ali može se objasniti, jer linija *6TV* uglavnom ima značajan porast duljine korijena, a tkivo korijena nije fotosintetski aktivno.

Drugi određivani biokemijski parametar bila je količina MDA u tkivu klijanaca. MDA je terminalni produkt lipidne peroksidacije, odnosno oksidacije polinezasićenih masnih kiselina staničnih membranskih sustava, a razina lipidne peroksidacije i oksidacijskog stresa u stanicama je ekvivalentna njegovoj količini (Demidchik 2015; Hodges i sur. 1999). Rezultati dobiveni za klijance divljeg tipa pokazuju porast količine MDA s porastom temperature, ali je značajan bio samo onaj na 32 °C, što nije bilo očekivano i što se ne slaže s rezultatima ostalih parametara gdje je 35 °C imao najveći negativan učinak, pa se moglo pretpostaviti da će i oštećenja lipida mjerena preko MDA biti najveća. Razlozi tomu mogu biti ranije spomenuta temperaturna odstupanja u inkubatoru tijekom izlaganja, iako mjerenje temperature ne pokazuje tolika odstupanja. S druge strane, možda je došlo do aktivacije određenog molekularnog mehanizma tolerancije na stres pri toj temperaturi, što je rezultiralo manjim oksidativnim oštećenjem. Neka istraživanja navode da reaktivni kisikovi oblici, producirani u stanicama pod utjecajem toplinskog stresa, imaju važnu ulogu u toleranciji biljaka na stresne uvjete zato što mogu djelovati kao signalne molekule koje pokreću zaštitne reakcije (Medina i sur. 2021; Vukadinović i sur. 2014; Wahid i sur. 2007). Kipp i Boyle (2013) proveli su istraživanje na divljem tipu uročnjaka, ispitujući utjecaj toplinskog stresa na produkciju reaktivnih kisikovih oblika i stupanj oksidacijskog stresa. Zabilježili su porast koncentracije TBARS-a, odnosno MDA, za 68,30% pri tretmanu od 29 °C u odnosu na kontrolu, što je dosta jači učinak u odnosu na rezultate ovog rada. Mansoor i Nasir Naqvi (2013) istraživali su učinke toplinskog stresa na lipidnu peroksidaciju i aktivnost antioksidacijskih enzima kod

sjemenki četiriju različitih genotipa zlatnoga graha (*Vigna radiata* L.), koje su bile uzgajane na kontroli i visokim temperaturama. U svim genotipovima koji su bili izlagani letalnim temperaturama (50 °C) zabilježili su najviše koncentracije MDA i najmanje razine antioksidacijskih enzima. Mohi-Ud-Din i sur. (2021) radili su istraživanja na različitim kultivarima pšenice koji su bili izlagani toplinskom stresu od 35 °C, te su zabilježili značajno povećanje sadržaja MDA, čak za 108%, kod sjemenki najosjetljivijeg kultivara u odnosu na kontrolu.

Prilikom mjerenja MDA, linija *dms3-1* pokazala se kao najosjetljivija jer su sve temperature osim 30 °C dovele do porasta MDA, dok je kod linije 6TV, kao i kod divljeg tipa, porast MDA zabilježen jedino pri temperaturi od 32 °C, što je neočekivano, ali se slaže s morfološkim parametrima prema kojima su te dvije linije slične. Do porasta MDA kod svih linija došlo je kasnije, nakon oporavka na 35 °C, a moguće objašnjenje za to je da se biljka jedno vrijeme uspješno bori sa stresnim uvjetima, a oštećenja se manifestiraju tek kasnije. U istraživanju koje su proveli Vitko i sur. (neobjavljeni rezultati) izlaganje klijanaca starih 12 dana temperaturi od 37 °C nije dovelo do promjena u količini MDA odmah nakon stresa, dok je kod linije *dms3-1* uočeno značajno povišenje nakon oporavka, što je u skladu s mojim rezultatima da je linija *dms3-1* osjetljivija na povišenje temperature, kao i da do oštećenja često dolazi tek naknadno. Osjetljivost linije *dms3-1* u ovoj ranoj fazi razvoja je vjerojatno uzrokovana smanjenom ili poremećenom metilacijom *de novo*, što za posljedicu ima veću podložnost stresnim uvjetima, rezultirajući povećanom razinom lipidne peroksidacije.

Posljednji biokemijski parametar koji je određivan bila je količina slobodnog prolina u tkivu. Prolin je neesencijalna aminokiselina koja spada u skupinu kompatibilnih osmolita, a njezina povećana proizvodnja u biljkama je najčešće indikator nekog okolišnog stresa (Linić i sur. 2019; Kalsoom i sur. 2016; Wahid i sur. 2007). Izmjerene vrijednosti količine slobodnog prolina u tkivu za divlji tip su uglavnom očekivane zbog toga što je najniža razina zabilježena na kontrolnoj temperaturi, a gotovo tri puta veća razina na tretmanu od 35 °C, iako nije bilo značajne razlike. Najviša razina izmjerena je kod klijanaca koji su bili na oporavku, što nije u skladu s očekivanjima, ali se može pripisati tome što je akumulacija prolina, kao jedan od ključnih obrambenih mehanizama u biljkama, s vremenom povećana kako bi ta obrana bila učinkovitija, npr. kako bi možda očistila stanice od slobodnih radikala. Autori koji su radili istraživanja na drugim vrstama su također dobili rezultate koji potvrđuju povišenje razine prolina pri povišenim temperaturama. Ranije spomenuti Mohi-Ud-Din i sur. (2021) su na različitim kultivarima pšenice, među ostalim, mjerili i utjecaj toplinskog stresa na količinu

prolina u sjemenkama te su zabilježili značajno povećanje u sjemenkama koje su bile izložene tretmanu od 35 °C u odnosu na kontrolu. Gosavi i sur. (2014) zabilježili su značajno povećanje u razinama prolina kod sjemenki svih genotipova stočnog sirka (*Sorghum bicolor* L.) koje su bile izlagane temperaturi od 40 °C šest sati, čak nakon oporavka od tri dana. Prilikom mjerenja prolina moji rezultati nisu zabilježili značajne razlike među linijama, vjerojatno zbog velike devijacije u rezultatima. Jedina značajna razlika bila je porast prolina uočen kod divljeg tipa i linije 6TV nakon oporavka klijanaca izlaganih temperaturi od 35 °C. Istraživanje koje su proveli Vitko i sur. (neobjavljeni rezultati) na istim linijama pokazalo je značajno smanjenje razine prolina na svim linijama, odmah nakon izlaganja stresnoj temperaturi od 37 °C, a nakon perioda oporavka došlo je do povećanja razine prolina kod klijanaca linije *dms3-1*. Ti rezultati nisu u skladu s mojim istraživanjem, ali potvrđuju pretpostavku da je linija *dms3-1* najosjetljivija. Iako je učinak temperature na razinu prolina bio suprotan u tim dvama istraživanjima, zajedničko je ponašanje linije 6TV koje je sličnije divljem tipu u odnosu na liniju *dms3-1*, što govori o važnoj ulozi metiliranosti na odgovor biljke u stresnim uvjetima. Budući da sam u svojem istraživanju koristila temperature niže od 37 °C te sjemenke koje su tek klijale umjesto već formiranih klijanaca koji su završili svoj postembrionalni razvoj, bilo je za očekivati da rezultati neće biti isti, zato što učinak toplinskog stresa ovisi i o razvojnem stadiju biljke (Prasad i Staggenborg 2008).

U završnom dijelu eksperimenta pokušala sam dokazati prisutnost proteina HSP70, koji je odličan pokazatelj postojanja toplinskog stresa. HSP70 pripada skupini proteina toplinskog šoka (HSP) čija sinteza naglo raste u uvjetima povišenih temperatura. Taj protein se u posljednje vrijeme intenzivno proučava jer je uočena njegova uloga u termotoleranciji biljaka. Obavlja brojne funkcije kako bi zaštitio proteine od agregacije i denaturacije, djelujući poput šaperona (Pevalek-Kozlina 2003). Većina autora bilježi pojavu određene vrste HSP-a kao odgovor na toplinski stres (Medina i sur. 2021; Hu i sur. 2020; Liu i sur. 2015; Vukadinović i sur. 2014; Wahid i sur. 2007). Moji eksperimenti su dokazali prisutnost određene izoforme proteina HSP70 na svim istraživanim temperaturnim tretmanima kod svih linija. Rezultati su u skladu s očekivanjima, budući da je najniži relativni intenzitet proteina HSP70 zabilježen pri kontrolnoj temperaturi kod svih linija, a najviši je zabilježen pri tretmanima od 35 °C kod divljeg tipa i linije 6TV te kod svih linija nakon oporavka od tretmana na 35 °C. Povećani intenzitet u klijanacima nakon oporavka ukazuje na to da je HSP70 vjerojatno sudjelovao u sastavljanju, popravljaju, translokaciji i translaciji proteina oštećenih visokom temperaturom. Nažalost, kod linije *dms3-1* nije bilo biomase za ekstrakciju

proteina pa bi to svakako trebalo napraviti u novom istraživanju. Neka istraživanja na vrsti *A. thaliana* spominju i važnost proteina HSP101 kao ključne komponente u termotoleranciji te vrste (Hu i sur. 2020; Liu i sur. 2015).

Prema mojim saznanjima, nije napravljeno puno istraživanja na linijama *dms3-1* i *6TV* biljke *Arabidopsis thaliana*, tako da je unatoč nekim sličnostima mojih rezultata s drugim istraživanjima, još prerano donositi neke generalne zaključke o odnosu između linija. Iz mojih rezultata nameće se pretpostavka o najvećoj osjetljivosti linije *dms3-1* na toplinski stres zbog mutacije gena za metilaciju i nefunkcionalnog proteina DMS3 koji je uključen u utišavanje transpozona, odgovore na stres, imunost, reprodukciju i međustaničnu komunikaciju. Potrebno je provesti još istraživanja na linijama s promijenjenom ekspresijom gena *DMS3* kako bi se otkrila i utvrdila točna uloga koju taj gen ima u odgovoru na toplinski stres.

## 5. ZAKLJUČAK

Analizom rezultata mjerenja morfoloških i biokemijskih parametara na klijancima uročnjaka divljeg tipa te linija s promijenjenom ekspresijom gena *DMS3*, mutant *dms3-1* u kojem je gen *DMS3* mutiran, te transgeničnom linijom *oeDMS3* (nazvana *6TV*) u kojoj je gen pojačano eksprimiran, primijećene su razlike u odgovoru na toplinski stres.

Rezultati mjerenja svih triju morfoloških parametara pokazuju značajno smanjenje vrijednosti tih parametara kod klijanaca linije *dms3-1* pri povišenim temperaturama u odnosu na divlji tip i liniju *6TV*, koja se pokazala otpornijom, jer pri temperaturama od 32/24 i 35 °C pokazuje značajno više vrijednosti od divljeg tipa.

Najviši sadržaj svih fotosintetskih pigmenata pri kontroli i povišenim temperaturama zabilježen je uglavnom kod divljeg tipa, posebice sadržaj karotenoida, gdje je prisutna značajna razlika u odnosu na linije *dms3-1* i *6TV*. Linija *6TV* pokazuje smanjene vrijednosti pigmenata.

Najviše vrijednosti MDA kao pokazatelja lipidne peroksidacije zabilježene su kod linije *dms3-1* na gotovo svim temperaturama, što je čini osjetljivijom na toplinski stres od divljeg tipa i linije *6TV*.

Kod prolina kao kompatibilnog osmolita nisu uočene značajne razlike među linijama, ali je uočen sličan trend kod divljeg tipa i linije *6TV*.

Metodom imunodetekcije dokazana je prisutnost izoforme proteina HSP70 kod svih linija, s nešto većim intenzitetom kod linija *dms3-1* i *6TV* nakon toplinskog stresa.

Na temelju rezultata većine parametara linija *dms3-1* pokazala se kao osjetljivija, dok je linija *6TV* pokazala veću otpornost, ponegdje i u usporedbi s divljim tipom. Budući da je kod linije *dms3-1* zbog nefunkcionalnog proteina *DMS3* smanjena metiliranost DNA, a kod linije *6TV* povećana zbog overekspresije istog proteina, može se zaključiti da metilacija DNA posredovana molekulama RNA ima značajnu ulogu u prilagodbi biljaka na toplinski stres.

## 6. LITERATURA

- Ashraf M., Hafeez M. (2004): Thermotolerance of pearl millet and maize at early growth stages: growth and nutrient relations. *Biologia Plantarum* 48 (1): 81–86.
- Balen B., Pavoković D., Peharec Štefanić P., Krsnik-Rasol M. (2011): Elektroforetske tehnike istraživanja proteina. Hrvatska Sveučilišna Naklada, Zagreb.
- Bates L. S., Waldren R. P., Teare I. D. (1973): Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil* 39: 205–207.
- Baxter A., Mittler R., Suzuki N. (2014): ROS as key players in plant stress signalling. *Journal of Experimental Botany* 65 (5): 1229–1240.
- Begcy K., Sandhu J., Walia H. (2018): Transient heat stress during early seed development primes germination and seedling establishment in rice. *Frontiers in Plant Science* 9: 1768–1777.
- Boyes C. D., Zayed M. A., Ascenzi R., McCaskill J. A., Hoffman E. N., Davis R. K., Görlach J. (2001): Growth stage-based phenotypic analysis of *Arabidopsis*: a model for high throughput functional genomics in plants. *The Plant Cell* 13: 1499–1510.
- Bradford M. M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248–254.
- Bukvić G., Grljušić S., Stanisavljević A., Varga I., Mrkulji A., Jozić A. (2010): Utjecaj temperature i pH vrijednosti na klijavost sjemena i svojstva klijanaca kultivara crvene djeteline. *Sjemenarstvo* 27: 1–2.
- Chan S. W.-L., Henderson I. R., Jacobsen S. E. (2005): Gardening the genome: DNA methylation in *Arabidopsis thaliana*. *Nature Reviews Genetics* 6: 351–360.
- Cuerda-Gil D., Slotkin R. K. (2016): Non-canonical RNA-directed DNA methylation. *Nature Plants* 2 (11): 161–170.
- Demidchik V. (2015): Mechanisms of oxidative stress in plants: From classical chemistry to cell biology. *Environmental and Experimental Botany* 109: 212–228.



- Ebrahim M.K., Zingsheim O., El-Shourbagy M.N., Moore P.H., Komor E. (1998): Growth and sugar storage in sugarcane grown at temperature below and above optimum. *Journal of Plant Physiology* 153: 593–602.
- Erdmann M. R., Picard L. C. (2020): RNA-directed DNA methylation. *PLOS Genetics* 10: 1–31.
- Essemine J., Ammar S., Bouzid S. (2010): Impact of heat stress on germination and growth in higher plants: physiological, biochemical and molecular repercussions and mechanisms of defence. *Journal of Biological Sciences* 10 (6): 565–572.
- Feng B., Liu P., Li G., Dong S. T., Wang H. F., Kong L. A., Zhang J. W. (2014): Effect of heat stress on the photosynthetic characteristics in flag leaves at the grain-filling stage of different heat-resistant winter wheat varieties. *Journal of Agronomy and Crop Science* 200: 143–155.
- Gosavi G. U., Jadhav A. S., Kale A. A., Gadakh S. R., Pawar B. D., Chimote V. P. (2014): Effect of heat stress on proline, chlorophyll content, heat shock proteins and antioxidant enzyme activity in sorghum (*Sorghum bicolor*) at seedlings stage. *Indian Journal of Biotechnology* 13: 356–363.
- Hegerl G. C., Brönnimann S., Cowan T., Friedman A. R., Hawkins E., Iles C., Müller W., Schurer A., Undorf S. (2019): Causes of climate change over the historical record. *Environmental Research Letters* 14 (12): 123006, 1–25.
- Hodges M. D., DeLong M. J., Forney F. C., Prange K. J. (1999): Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. *Planta* 207: 604–611.
- Hu S., Ding Y., Zhu C. (2020): Sensitivity and responses of chloroplasts to heat stress in plants. *Frontiers in Plant Science* 00375, 1–11.
- Ibrahim S. K., El- Muqadam L. A. (2019): Enhancing thermotolerance of tomato plants (*Lycopersicon esculentum* Mill.) by heat hardening of seeds. *Bulletin of the National Research Centre*, 43 (1), 1–9.
- Jagić M., Škiljaica A., Bauer N., Leljak-Levanić D. (2018): Arabidopsis MATH-BTB proteins are involved in RNA- directed DNA methylation. U: Kružić P., Caput Mihalić K.,

Gottstein S., Pavoković D., Kučinić M. (ur.), Book of Abstracts of the 13th Croatian Biological Congress, Croatian Biological Society, Zagreb.

Kalsoom U., Bennett I. J., Boyce M. C. (2016): A review of extraction and analysis: methods for studying osmoregulants in plants. *Journal of Chromatography Separation Techniques* 7: 1–11.

Kanno T., Bucher E., Daxinger L., Huettel B., Böhmendorfer G., Gregor W., Matzke A. J. (2008): A structural-maintenance-of-chromosomes hinge domain-containing protein is required for RNA-directed DNA methylation. *Nature Genetics* 40 (5): 670–675.

Kipp E., Boyle M. (2013): The effects of heat stress on reactive oxygen species production and chlorophyll concentration in *Arabidopsis thaliana*. *Research in Plant Science* 1: 20–23.

Lamb W. F., Wiedmann T., Pongratz J., Andrew R., Crippa M., Olivier G. J., Wiedenhofer D., Mattioli G., Khourdaije A. A., House J., Pachauri S., Figueroa M., Saheb Y., Slade R., Hubacek K., Sun L., Kahn Ribeiro S., Khennas S., Du Khan S., Chapungu L., Davis S. J., Bashmakov I., Dai H., Dhakal S., Tan X., Geng Y., Gu B., Minx J. (2021): A review of trends and drivers of greenhouse gas emissions by sector from 1990 to 2018. *Environmental Research Letters* 16 073005: 1–31.

Larkindale J., Hall J. D., Knight M.R., Vierling E. (2005): Heat stress phenotypes of *Arabidopsis* mutants implicate multiple signaling pathways in the acquisition of thermotolerance. *Plant Physiology* 138: 882–897.

Lee J.H., Schöffl F. (1996): AnHsp70 antisense gene affects the expression of HSP70/HSC70, the regulation of HSF, and the acquisition of thermotolerance in transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Molecular and General Genetics* 252: 11–19.

Li Y., He N., Hou J., Xu L., Liu C., Zhang J., Wang Q., Zhang X., Wu X. (2018): Factors influencing leaf chlorophyll content in natural forests at the biome scale. *Frontiers in Ecology and Evolution* 6: 1–10.

Lin J. Y., Le B. H., Chen M., Henry K. F., Hur J., Hsieh T. F., Goldberg R. B. (2017): Similarity between soybean and *Arabidopsis* seed methylomes and loss of non-CG methylation does not affect seed development. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114 (45): 9730–9739.

- Linić I., Šamec D., Grúz J., Vujčić Bok V., Strnad M., Salopek-Sondi B. (2019): Involvement of phenolic acids in short-term adaptation to salinity stress is species-specific among Brassicaceae. *Plants* 8 (6): 155.
- Liu J., He Z. (2020): Small DNA methylation, big player in plant abiotic stress responses and memory. *Frontiers in Plant Science* 11: 1–21.
- Liu J., Feng L., He Z. (2015): Genetic and epigenetic control of plant heat responses. *Frontiers in Plant Science* 6: 1–21.
- Lobell D., Field C. (2007): Global scale climate–crop yield relationships and the impacts of recent warming. *Environmental Research Letters* 2: 1–8.
- Malabarba J., Windels D., Xu W., Verdier J. (2021): Regulation of DNA (de)methylation positively impacts seed germination during seed development under heat stress. *Genes* 12: 1–21.
- Mansoor S., Nasir Naqvi F. (2013): Effect of heat stress on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in mung bean (*Vigna radiata* L.) seedlings. *African Journal of Biotechnology* 12 (21): 3196–3203.
- Mbichi W. R., Wang F. Q., Wan T. (2020): RNA directed DNA methylation and seed plant genome evolution. *Plant Cell Reports* 39: 983–996.
- Medina E., Kim S.-H., Yun M., Choi W.-G. (2021): Recapitulation of the function and role of ROS generated in response to heat stress in plants. *Plants* 10: 1–13.
- Meinke D. W., Cherry J. M., Dean C., Rounsley S. D., Koornneef M. (1998): *Arabidopsis thaliana*: A model plant for genome analysis. *Science* 282: 662–682.
- Minocha R., Martinez G., Lyons B., Long S. (2009): Development of a standardized methodology for quantifying total chlorophyll and carotenoids from foliage of hardwood and conifer tree species. *Canadian Journal for Forest Research* 39: 849–861.
- Mohi-Ud-Din M., Siddiqui N., Rohman M., Krishna Jagadish S. V., Ahmed J. U., Hassan M. M., Hossain A., Islam T. (2021): Physiological and biochemical dissection reveals a trade-off between antioxidant capacity and heat tolerance in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Antioxidants* 10: 1–24.

Murashige T., Skoog F. (1962): A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473–479.

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

Porter J. R., Gawith M. (1999): Temperatures and the growth and development of wheat: a review. *European Journal of Agronomy* 10: 23–36.

Prasad P. V. V., Staggenborg S. A. (2008): Impacts of drought and/or heat stress on physiological, developmental, growth, and yield processes of crop plant. *Plant Science and Entomology Research Unit*, 301–355.

Reigosa Roger M. J. (2001): *Handbook of plant ecophysiology techniques*. Kluwer Academic Publishers.

Rendulić T. (2018): Istraživanje interakcija proteina BPM1, DMS3 i RDM1 bimolekulskom fluorescencijskom komplementacijom u stanicama duhana. Diplomski rad. Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb.

Ritchie J. R. (2008): Universal chlorophyll equations for estimating chlorophylls *a*, *b*, *c*, and *d* and total chlorophylls in natural assemblages of photosynthetic organisms using acetone, methanol, or ethanol solvents. *Photosynthetica* 46: 115-126.

Salvucci M. E., Crafts-Brandner S. J. (2004): Inhibition of photosynthesis by heat stress: the activation state of Rubisco as a limiting factor in photosynthesis. *Physiologia Plantarum* 120: 179–186.

Silva-Correia J., Freitas S., Tavares R.M., Lino-Neto T., Azevedo H. (2014): Phenotypic analysis of the *Arabidopsis* heat stress response during germination and early seedling development. *Plant Methods* 10: 1–11.

Staples R. C., Stahmann M. A. (1964): Changes in proteins and several enzymes in susceptible bean leaves after infection by the bean rust fungus. *Phytopathology* 54: 760–764.

Su P. H., Li H. M. (2008). *Arabidopsis* stromal 70-kD heat shock proteins are essential for plant development and important for thermotolerance of germinating seeds. *Plant Physiology* 146 (3): 1231–1241.

Taiz L., Zeiger E. (2002): *Plant Physiology*. Sinauer Associates; 3 izdanje.

Tokić M., Leljak-Levanić D., Bauer N. (2021): Effect of increased temperature on seed germination and DNA methylation in *Arabidopsis thaliana*, *Brassica rapa* and *Solanum lycopersicum*. U: 45th FEBS Congress, Molecules of Life: Towards New Horizons, Ljubljana.

Vukadinović V., Jug I., Đurđević B. (2014): Ekofiziologija bilja. Sveučilišni udžbenik. Neformalna savjetodavna služba, Osijek.

Wahid A., Gelani S., Ashraf M., Foolad M. R. (2007): Heat tolerance in plants: An overview. *Environmental and Experimental Botany* 61: 199–223.

Wang L., Leister D., Kleine T. (2020): Chloroplast development and genomes uncoupled signaling are independent of the RNA-directed DNA methylation pathway. *Scientific Reports* 10 (1): 1–12.

Zhang H., Lang Z., Zhu J.-K. (2018): Dynamics and function of DNA methylation in plants. *Molecular Cell Biology* 19: 489–506.

Internetski izvori:

[https://ec.europa.eu/clima/change/causes\\_hr](https://ec.europa.eu/clima/change/causes_hr) (pristupljeno 26. 8. 2021.)

<https://hr.strephonsays.com/chlorophyll-a-and-vs-b-7818> (pristupljeno 18. 9. 2021.)

<https://www.nsf.gov/about/history/nifty50/arabidopsis.jsp> (pristupljeno 4. 11. 2021.)

## 7. ŽIVOTOPIS

Rođena sam u Zagrebu. Osnovnu školu Retkovec sam završila 2008. godine. Pohađala sam III. Gimnaziju u Zagrebu, koju sam završila 2012. godine, a akademske godine 2012./2013. upisala sam prvu godinu preddiplomskog studija Znanosti o okolišu na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Zvanje prvostupnika struke znanosti o okolišu (univ. bacc. oecol.) stekla sam 2018. godine, te sam iste godine upisala diplomski studij Znanosti o okolišu. Bila sam članicom Udruge za zaštitu okoliša i održivi razvoj Rio Zagreb, u sklopu koje sam 2015. godine sudjelovala u organizaciji međunarodne studentske konferencije na temu zaštite okoliša – ISCES. Odlično se služim engleskim jezikom u govoru i pismu, te osnovama njemačkog i španjolskog jezika. Dobro sam upućena u programske pakete MS Office i poznajem osnove rada u programu ArcMap. U slobodno vrijeme bavim se pjevanjem, a godinama sam bila članicom pjevačkog ansambla Mozartine s kojim sam nastupala na pjevačkim natjecanjima te odrađivala koncerte s domaćim glazbenicima. Bavila sam se i atletikom i jako volim boraviti u prirodi.