

# Odgovor uročnjaka (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.) s promijenjenom ekspresijom gena BPM i DMS3 na toplinski stres

---

Vitko, Sandra

Doctoral thesis / Doktorski rad

2024

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:217:666656>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-06-26**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
BIOLOŠKI ODSJEK

Sandra Vitko

**Odgovor uročnjaka  
(*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.) s  
promijenjenom ekspresijom gena *BPM* i  
*DMS3* na toplinski stres**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2024.



University of Zagreb

FACULTY OF SCIENCE  
DEPARTMENT OF BIOLOGY

Sandra Vitko

**Response of *Arabidopsis thaliana* (L.)  
Heynh. with modified *BPM* and *DMS3*  
gene expression to heat stress**

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2024

Ovaj je doktorski rad izrađen u Botaničkom zavodu Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod vodstvom prof. dr. sc. Željke Vidaković-Cifrek, u sklopu Sveučilišnog poslijediplomskog doktorskog studija Biologije pri Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Doktorski rad izrađen je u sklopu znanstveno-istraživačkog projekta Hrvatske zaklade za znanost „MATH-BTB proteini kao regulatori transkripcije i RNA posredovane metilacije DNA u biljnom razvitku“ (IP-2016-06-6229) voditeljice prof. dr. sc. Dunje Leljak-Levanić te znanstveno-istraživačkog projekta EPPN (European Plant Phenotyping Network) „PhenoArHeat – Phenotyping of BPM1-mediated heat stress response in *Arabidopsis thaliana*“ voditeljice prof. dr. sc. Željke Vidaković-Cifrek.



## INFORMACIJE O MENTORICI

Prof. dr. sc. Željka Vidaković-Cifrek završila je 1990. godine studij biologije, smjer molekularna biologija, na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Od iste godine zaposlena je u Botaničkom zavodu Biološkog odsjeka PMF-a. Magistarski rad obranila je 1993. godine, a doktorirala 1999. godine u području prirodnih znanosti, polje biologija. U znanstveno-nastavno zvanje docentice izabrana je 2004. godine, u zvanje izvanredne profesorice 2013. godine, a od 2021. godine u zvanju je redovite profesorice na istoj ustanovi. Nositeljica je obaveznog kolegija Fiziologija bilja i sunositeljica izbornih kolegija Metabolizam biljaka u stresnim uvjetima i Biotestovi na prijediplomskom studiju, izbornih kolegija Regulacijski mehanizmi u fotosintezi i Fiziologija stresa i obrambeni mehanizmi biljaka na diplomskom studiju, izbornog kolegija Pokusi iz fiziologije bilja u nastavi na Integriranom prijediplomskom i diplomskom studiju Biologija i kemija, dok je na doktorskom studiju sunositeljica kolegija Mehanizmi odgovora biljaka na stres i Interakcije biljaka i okoliša. Bila je voditeljica jedne doktorske disertacije, jednog magistarskog rada, ukupno 36 diplomskih i završnih radova te četiri studentska rada nagrađena Rektorovom nagradom. U okviru znanstvenog rada bavi se istraživanjima u području fiziologije stresa u biljaka te biljnih biotestova za procjenu učinaka okolišnih uvjeta i onečišćenja na biljke. U cilju znanstvenog usavršavanja boravila je na znanstvenim institucijama u Njemačkoj i Austriji. Sudjelovala je na osam znanstvenih projekata financiranih od HRZZ i MZOS te dva međunarodna projekta. Objavila je 36 znanstvenih radova, dva poglavlja u knjigama, a na domaćim i inozemnim znanstvenim skupovima sudjelovala je s 50 znanstvenih priloga. Recenzirala je više od 40 znanstvenih radova za 20-ak međunarodnih znanstvenih časopisa. Članica je Uredničkog odbora časopisa *Acta Botanica Croatica* i nekoliko strukovnih udruga. U razdoblju od 2007. do 2009. godine bila je predsjednica Hrvatskog društva za biljnu biologiju. Aktivna je i u području popularizacije znanosti. Sudjelovala je u organizaciji i provedbi nekoliko manifestacija za popularizaciju znanosti, održala brojna javna predavanja i objavila nekoliko popularizacijskih članaka.

## ZAHVALE

*Veliku zahvalnost dugujem svojoj mentorici, prof. dr. sc. Željki Vidaković-Cifrek, koja mi je pružila priliku za izradu ovog doktorata te se iskazala ne samo kao mentorica, već i kao osoba puna podrške i razumijevanja. Vjerojatno nije niti svjesna koliko je time olakšala ovo putovanje.*

*Nikako ne smijem zaboraviti istaknuti prof. dr. sc. Mirtu Tkalec koja me je uvijek spremno čekala s konstruktivnim kritikama, ali i prijateljskim savjetima. Zbog toga sam uvelike stasala kao znanstvenica.*

*Želim zahvaliti i drugim članovima Laboratorija za fiziologiju bilja – prof. dr. sc. Sandri Radić-Brkanac, dr. sc. Mariji Babić te Martini Galeković. Svaka od njih je na poseban način doprinijela izradi ovog rada.*

*Veliko hvala dugujem i članovima Laboratorija za kulturu biljnog tkiva. Hvala prof. dr. sc. Dunji Leljak-Levanić i prof. dr. sc. Nataši Bauer na suradnji, ali i svim savjetima. Pokazale su veliko razumijevanje za jednog „ne-molekularca“. Također, želim zahvaliti i svojim uredskim cimericama, Mateji Jagić i Mirti Tokić, koje su uvijek bile spremne pomoći, ali i podijeliti muku teških dana. Veliko hvala na svemu Ana-Mariji Boljkovac, Luciji Markulin, Andreji Škiljaica i Tamari Vuk.*

*Hvala od srca svim (sadašnjim i bivšim) članovima Zavoda za molekularnu biologiju koji su me od prvog dana prihvatili kao svog člana i time uveliko olakšali izradu ove disertacije.*

*Naposljetku, izrada ovog doktorata ne bi bila moguća bez podrške mojih bližnjih. Hvala Saši Kovačiću i Božidaru Vitku koji su moje ideje pretočili u stvarne sustave i time omogućili da svoje pokuse odradim baš kako sam i zamislila. Šećer na kraju, veliko hvala Sanji Vitko, koja mi je tu i tamo skuhalo ručak, ali je zato uvijek spremno prolazila kroz moje dobre i loše dane.*

**Odgovor uročnjaka (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.) s promijenjenom ekspresijom gena *BPM* i *DMS3* na toplinski stres**

SANDRA VITKO

Botanički zavod, Biološki odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet,  
Horvatovac 102a, 10000 Zagreb

Proteini BPM i DMS3 sudjeluju u regulaciji rasta i razvoja te prilagodbi biljaka na okolišne uvjete. Učinak toplinskog tretmana istražen je u biljaka uročnjaka s prekomjernom (*oeBPM1* i *oeDMS3*) i smanjenom (*amiR-bpm* i *dms3-1*) ekspresijom tih proteina te biljaka divljeg tipa. Fenotipizacijom je dokazan smanjeni rast linija *oeBPM1* i *dms3-1* u kontrolnim uvjetima, a toplinski tretman uzrokovao je inhibiciju rasta u divljeg tipa te linija *oeDMS3*, *oeBPM1* i *amiR-bpm*. U liniji *dms3-1* tretiranoj u kasnijem razvojnem stadiju zabilježena je povećana stopa rasta. Sve linije tretirane u stadiju klijanaca akumulirale su protein HSP90, no indukcija HSP70 ovisila je o genskoj pozadini biljaka. U linijama *oeBPM1* i *amiR-bpm* primijećeni su oprečni odgovori na stres – u prvoj liniji je zabilježena smanjena fotosintetska učinkovitost, a u drugoj povišena aktivnost antioksidacijskih enzima. U liniji *oeDMS3* izmjerena je povišena aktivnost peroksidaza, a linija *dms3-1* pokazala je veću osjetljivost fotosinteze unatoč povećanju sadržaja prolina i aktivnosti katalaze. Dobiveni rezultati ukazuju da promijenjena ekspresija gena *BPM* nema jednoznačnu ulogu u termotoleranciji, ali da je za otpornost u stadiju klijanaca potrebna prisutnost funkcionalnog proteina DMS3.

(187 stranica, 47 slika, 12 tablica, 271 literaturni navod, jezik izvornika: hrvatski)

Ključne riječi: MATH-BTB, RdDM, fenotipizacija, JIP-test, antioksidacijski sustav

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

Ocjenjivači: prof. dr. sc. Mirta Tkalec  
prof. dr. sc. Nataša Bauer  
prof. dr. sc. Tatjana Prebeg

**Response of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. with modified *BPM* and *DMS3* gene expression to heat stress**

SANDRA VITKO

Division of Botany, Department of Biology, Faculty of Science,  
Horvatovac 102a, 10000 Zagreb

Proteins BPM and DMS3 participate in the regulation of growth and development, and adaptation of plants to environmental conditions. The effects of heat treatment were studied in *Arabidopsis thaliana* plants with overexpression (*oeBPM1* and *oeDMS3*) and downregulation (*amiR-bpm* and *dms3-1*) of these proteins, as well as in wild-type plants. Phenotyping of plants showed reduced growth of *oeBPM1* and *dms3-1* lines under control conditions, while heat treatment caused growth inhibition of wild type and *oeDMS3*, *oeBPM1* and *amiR-bpm* lines. The *dms3-1* line treated at a later developmental stage showed an increased growth rate. All lines treated at the seedling stage accumulated HSP90 protein, but the induction of HSP70 depended on the genetic background of the plants. In *oeBPM1* and *amiR-bpm* lines, opposite responses to stress were observed – reduced photosynthetic efficiency in the former and increased antioxidant enzyme activity in the latter. Increased peroxidase activity was measured in *oeDMS3* line, while *dms3-1* line showed photosynthetic sensitivity despite higher proline content and catalase activity. The results suggest that the altered expression of *BPM* genes does not have a straightforward role in thermotolerance, but the presence of a functional DMS3 protein is essential for tolerance in the seedling stage.

(187 pages, 47 figures, 12 tables, 271 references, original in: Croatian)

Keywords: MATH-BTB, RdDM, plant phenotyping, JIP-test, antioxidant system

Supervisor: Professor Željka Vidaković-Cifrek, PhD

Reviewers: Professor Mirta Tkalec, PhD  
Professor Nataša Bauer, PhD  
Professor Tatjana Prebeg, PhD

## Popis kratica

·OH	Hidroksilni radikal
<sup>1</sup> O <sub>2</sub>	Singletni kisik
<i>amiR-bpm</i>	Linija uročnjaka sa smanjenom ekspresijom gena <i>BPM1</i> , 4, 5 i 6
APX	Askorbat peroksidaza
<i>BPM</i>	Geni koji kodiraju proteine iz porodice BTB/POZ-MATH (BPM)
Cars	Karotenoidi
CAT	Katalaza
Chl <i>a</i>	Klorofil <i>a</i>
Chl <i>b</i>	Klorofil <i>b</i>
CO <sub>2</sub>	Ugljikov dioksid
<i>DMS3</i>	Gen koji kodira protein DMS3 (engl. <i>defective in meristem silencing 3</i> )
<i>dms3-1</i>	Linija uročnjaka s mutiranim genom <i>DMS3</i>
<i>DREB2A</i>	Gen koji kodira protein DREB2A (engl. <i>dehydration-responsive element-binding protein 2A</i> )
F <sub>v</sub> /F <sub>m</sub>	Maksimalni kvantni prinos fotosustava II
G-POD	Gvajakol peroksidaza
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Vodikov peroksid
HSP	Proteini toplinskog šoka (engl. <i>heat shock proteins</i> )
MDA	Malondialdehid
O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	Superoksidni radikal
<i>oeBPM1</i>	Linija uročnjaka s prekomjernom ekspresijom gena <i>BPM1</i>
<i>oeDMS3</i>	Linija uročnjaka s prekomjernom ekspresijom gena <i>DMS3</i>
PCA	Analiza glavnih komponenti (engl. <i>principal component analysis</i> )
PCR	Lančana reakcija polimerazom (engl. <i>polymerase chain reaction</i> )
PI <sub>ABS</sub>	Indeks fotosintetske učinkovitosti
Pol	Polimeraza
PSI	Fotosustav I
PSII	Fotosustav II
<i>rbcL</i>	Velika podjedinica proteina RuBisCO
RC	Reakcijski centar
RdDM	Metilacija DNA posredovana malim molekulama RNA (engl. <i>RNA-directed de novo DNA methylation</i> )
ROS	Reaktivni kisikovi oblici
RuBisCO	Ribuloza-1,5-disfosfat karboksilaza/oksigenaza
SOD	Superoksid dismutaza
wt	Divlji tip (engl. <i>wild type</i> )

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2. LITERATURNI PREGLED</b> .....	<b>4</b>
<b>2.1. Toplinski stres</b> .....	<b>4</b>
<b>2.2. Učinak toplinskog stresa na biljke</b> .....	<b>6</b>
2.2.1. Učinak na morfološka i fiziološka svojstva .....	6
2.2.2. Učinak na fotosintezu .....	7
2.2.3. Oksidacijski stres.....	12
2.2.4. Oksidacijsko oštećenje membrana.....	14
<b>2.3. Mehanizmi odgovora biljaka na toplinski stres</b> .....	<b>15</b>
2.3.1. Proteini toplinskog šoka.....	17
2.3.2. Antioksidacijski sustav.....	18
2.3.3. Ubikvitin-proteasomalni put .....	23
2.3.4. Metilacija DNA posredovana malim molekulama RNA .....	26
<b>3. MATERIJALI I METODE</b> .....	<b>31</b>
<b>3.1. Biljni materijal</b> .....	<b>31</b>
<b>3.2. Dugotrajni učinak toplinskog stresa od stadija klijanaca do stadija sjemenki</b> .....	<b>32</b>
3.2.1. Fenotipizacija biljaka .....	34
3.2.1.1. Određivanje morfoloških parametara .....	36
3.2.1.2. Mjerenje fluorescencije klorofila <i>a</i> .....	36
3.2.1.3. Određivanje biomase biljaka i sjemenki.....	37
3.2.1.4. Test klijavosti sjemenki .....	37
<b>3.3. Učinak toplinskog stresa na biljke u stadiju klijanaca</b> .....	<b>38</b>
3.3.1. Određivanje fizioloških parametara .....	40
3.3.1.1. Mjerenje polifaznog rasta fluorescencije klorofila <i>a</i> JIP-testom .....	40
3.3.1.2. Određivanje sadržaja fotosintetskih pigmenata.....	41
3.3.2. Određivanje biokemijskih i molekularnih parametara .....	43
3.3.2.1. Određivanje sadržaja vodikovog peroksida .....	43
3.3.2.2. Određivanje stupnja lipidne peroksidacije.....	43
3.3.2.3. Određivanje sadržaja prolina .....	45
3.3.2.4. Ekstrakcija proteina .....	46
3.3.2.5. Mjerenje koncentracije ukupnih topivih proteina .....	46
3.3.2.6. Mjerenje aktivnosti antioksidacijskih enzima .....	47
Mjerenje aktivnosti <i>G-POD</i> .....	47
Mjerenje aktivnosti <i>APX</i> .....	48
Mjerenje aktivnosti <i>CAT</i> .....	48
Mjerenje aktivnosti <i>SOD</i> .....	49
3.3.2.7. Imunodetekcija proteina HSP70, HSP90 i RuBisCO.....	50
Razdvajanje proteina poliakrilamid-gel elektroforezom pri denaturirajućim uvjetima .....	50
Western analiza proteina .....	51
3.3.2.8. Analiza ekspresije gena metodom qPCR.....	53
Izolacija ukupne RNA.....	53
Reverzna transkripcija ukupne RNA .....	55
Provjera čistoće cDNA .....	55
Kvantifikacija ekspresije gena metodom qPCR.....	56
Obrada podataka dobivenih metodom qPCR .....	58
<b>3.4. Obrada i statistička analiza podataka</b> .....	<b>59</b>

<b>4. REZULTATI .....</b>	<b>62</b>
4.1. Fenotipizacija biljaka od stadija klijanaca do stadija sjemenki.....	62
4.1.1. Morfološki parametri.....	62
<i>Divlji tip</i> .....	63
<i>Linije s promijenjenom ekspresijom gena BPM</i> .....	65
<i>Linije s promijenjenom ekspresijom gena DMS3</i> .....	73
4.1.2. Fluorescencija klorofila <i>a</i> .....	80
4.1.3. Biomasa biljaka .....	85
4.1.4. Biomasa i klijavost sjemenki .....	88
4.2. Fiziološke, biokemijske i molekularne promjene u stadiju klijanaca.....	93
4.2.1. Fluorescencija klorofila <i>a</i> .....	93
4.2.2. Sadržaj fotosintetskih pigmenata .....	103
4.2.3. Sadržaj vodikovog peroksida .....	107
4.2.4. Stupanj lipidne peroksidacije .....	109
4.2.5. Sadržaj prolina .....	111
4.2.6. Aktivnost antioksidacijskih enzima .....	113
4.2.7. Ekspresija proteina HSP70, HSP90 i RuBisCO.....	119
4.2.8. Ekspresija gena <i>BPM</i> .....	125
4.2.9. Multivarijatna analiza parametara mjerenih u stadiju klijanaca.....	127
<b>5. RASPRAVA.....</b>	<b>132</b>
5.1. Učinak toplinskog stresa na rast i razvoj biljaka .....	132
5.1.1. Morfološke promjene .....	133
5.1.2. Fotosintetska učinkovitost .....	136
5.1.3. Klijavost sjemenki .....	140
5.2. Učinak toplinskog stresa na klijance uzgajane <i>in vitro</i> .....	142
5.2.1. Fotosintetska učinkovitost klijanaca .....	142
5.2.2. Oksidacijski stres i antioksidacijski odgovor .....	147
5.2.3. Proteini toplinskog šoka.....	155
<b>6. ZAKLJUČAK .....</b>	<b>157</b>
<b>7. LITERATURA .....</b>	<b>158</b>
<b>8. PRILOZI.....</b>	<b>179</b>
<b>9. ŽIVOTOPIS .....</b>	<b>188</b>

# 1. UVOD

Kao sesilni organizmi, biljke su gotovo svakodnevno izložene izazovnim uvjetima okoliša koji nepovoljno utječu na njihov rast, razvoj i razmnožavanje. Najčešći okolišni čimbenici koji uzrokuju poremećaje metabolizma, rasta i razvoja biljaka su povećani intenzitet svjetlosti, hipoksija i anoksija u području korijena zbog poplava, povišeni salinitet, odstupanja od optimalne temperature rasta te ograničena dostupnost mineralnih tvari (Mareri i sur. 2021). U svjetlu globalnih klimatskih promjena, povišena temperatura postala je jedan od najvažnijih okolišnih čimbenika koji negativno utječe na sve žive organizme, uključujući i biljke (Mittler i sur. 2012). Prema definiciji, toplinskim stresom smatra se porast temperature od 10 do 15 °C iznad optimalne, a posljedice ovise prvenstveno o jačini i trajanju stresa, sinergijskom učinku drugih stresnih čimbenika te razvojnom stadiju biljke (Jagadish i sur. 2021). Toplinski stres remeti metaboličku ravnotežu u biljci i dovodi do promjena na morfološkoj, fiziološkoj i staničnoj razini, uključujući smanjenje površine listova, inhibiciju rasta izdanaka i korijena, smanjenje stope fotosinteze, promjene u strukturi citoskeletnih elemenata, poremećaj strukture i fluidnosti membrana te denaturaciju i agregaciju staničnih proteina (Kumar i Wani 2020). Poremećaji metaboličke ravnoteže uzrokovani nepovoljnim temperaturama dovode do pojačane stope sinteze reaktivnih kisikovih oblika (ROS) koji mogu na biljke djelovati na dva načina (Kumar i Wani 2020). Kao signalne molekule, ROS-ovi tijekom toplinskog stresa dovode do aktivacije transkripcijskih faktora iz porodice HSF (engl. *heat shock factors*) čime se regulira ekspresija različitih gena uključenih u odgovor biljke na toplinski stres te potiče otpornost biljke na djelovanje povišene temperature (Mittler i sur. 2012). Međutim, zbog svoje reaktivnosti, ROS-ovi također mogu oštetiti važne biološke molekule, poput nukleinskih kiselina, proteina i lipida (Møller i sur. 2007). Kako bi se ponovno uspostavila redoks-ravnoteža, odnosno neutralizirala suvišna količina ROS-ova, u stanicama dolazi do stimulacije aktivnosti antioksidacijskog sustava koji uključuje različite enzimske i ne-enzimske molekule (Mittler 2002). U uvjetima toplinskog stresa, osim aktivnosti antioksidacijskog sustava, u biljaka se može povećati sinteza aminokiseline prolin, ali i proteina toplinskog šoka (HSP, engl. *heat shock proteins*). Prolin ima višestruku ulogu u odgovoru na stres koja uključuje održavanje osmotske ravnoteže, zaštitu strukture proteina i enzima, održavanje stabilnosti membrana i neutralizaciju ROS-ova (Lv i sur. 2011). Proteini HSP induciraju se tijekom djelovanja nepovoljnih okolišnih uvjeta i sudjeluju u održavanju stanične ravnoteže tako što sprečavaju agregaciju proteina, stabiliziraju stanične proteine i sprečavaju njihovo ireverzibilno oštećenje,



olakšavaju maturaciju signalnih molekula te sudjeluju u prijenosu signala i aktivaciji transkripcijskih faktora (Wang i sur. 2004).

U nekoliko istraživanja (Morimoto i sur. 2017, Kim i sur. 2019, Xu i Xue 2019) dokazano je da odgovor biljaka na toplinski stres uključuje ubikvitin-proteasomalni put, regulatorni mehanizam koji omogućuje selektivnu razgradnju proteina u stanici. Dio ovog mehanizma su proteini koji sadrže domenu BTB (engl. *broad complex, tramtrack and bric-à-brac*), također poznatu kao domena POZ (engl. *pox virus and zinc finger*), te domenu MATH (engl. *meprin and TRAF homology*). Proteini iz porodice MATH-BTB/POZ (BPM) koriste domenu BTB/POZ za interakciju s kompleksom proteina ligaze E3 temeljene na kulinu 3, dok domena MATH služi za prepoznavanje specifičnih proteinskih supstrata. Spomenute interakcije omogućuju obilježavanje supstrata vezanjem ubikvitina što naposljetku dovodi do degradacije supstrata putem proteasoma 26S (Weber i Hellmann 2009, Zhou i sur. 2014). U genomu modelne biljke uročnjak (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.) postoji šest gena *BPM* koji, zbog mehanizma alternativnog prekraranja, kodiraju najmanje 16 različitih izoformi proteina BPM (Škiljaica i sur. 2020). Do danas je funkcionalno okarakterizirano samo nekoliko proteina BPM. Istraživanja su pokazala da proteini BPM ne samo da reguliraju različite razvojne procese, već također imaju važnu ulogu u fenotipskoj i fiziološkoj prilagodljivosti te sposobnosti preživljavanja biljaka u promjenjivom okolišu. Naime, utvrđeno je da proteini BPM ulaze u interakciju s transkripcijskim faktorima uključenim u signalne puteve biljnih hormona etilena i apscizinske kiseline, kao i s transkripcijskim faktorima uključenim u metabolizam masnih kiselina (Weber i Hellman 2009, Lechner i sur. 2011, Chen i sur. 2013). Nadalje, Morimoto i sur. (2017) otkrili su važnu ulogu proteina BPM u odgovoru biljke na toplinski stres dokazavši da protein BPM2 negativno regulira protein DREB2A (engl. *dehydration-responsive element-binding protein 2A*). Protein DREB2A značajan je transkripcijski faktor koji regulira biljni odgovor na toplinski stres i sušu aktivacijom niza gena ključnih za mehanizme otpornosti biljke na te stresne uvjete. To otkriće izrazito je zanimljivo s obzirom na istraživanje Škiljaica i sur. (2020), koje je pokazalo da se protein BPM1 inducira i ne degradira na povišenim temperaturama, posebno na 37 °C. Na temelju istraživanja Jagić i sur. (2022) predložena je nova uloga proteina BPM1 koja se ostvaruje izvan ubikvitin-proteasomalnog puta. Navedeno istraživanje pokazalo je kako protein BPM1 ulazi u izravnu interakciju s proteinima DMS3 (engl. *defective in meristem silencing 3*) i RDM1 (engl. *RNA-directed DNA methylation 1*), poznatim dijelovima mehanizma metilacije DNA posredovane malim molekulama RNA (RdDM, engl. *RNA-directed de novo DNA methylation*). Naime, kao dio ubikvitin-

proteasomalnog puta, protein BPM1 mogao bi funkcionirati kao specifični adapter za proteine iz mehanizma RdDM, usmjeravajući ih na proteasomalnu razgradnju i dovodeći do prekida metilacije DNA mehanizmom RdDM. Međutim, Jagić i sur. (2022) pokazali su da interakcija proteina DMS3 i RDM1 s proteinima iz porodice BPM ne služi za njihovo obilježavanje i degradaciju putem proteasoma 26S. Alternativno, predloženo je da protein BPM1 ima ulogu navođenja metilacijskog mehanizma na specifična mjesta u genomu (Jagić i sur. 2022). Oba mehanizma, ubikvitin-proteasomalni put i RdDM, dovode do promjena u transkripciji. Prema preglednom radu Erdmann i Picard (2020), metilacija DNA regulirana mehanizmom RdDM može biti važna za brzo reprogramiranje transkripcije gena tijekom prilagodbe biljke promjenjivim okolišnim uvjetima. Uistinu, još 2018. godine Liu i sur. (2018) pokazali su da se metilacijski profil vrste *Brassica rapa* dinamički mijenja tijekom toplinskog stresa. Drugim riječima, ovi rezultati sugeriraju da regulacija metilacije DNA igra važnu ulogu u preživljavanju, ali i u prilagodbi rasta i razvoja biljaka u nepovoljnim temperaturnim uvjetima.

Na temelju dosadašnjih spoznaja o ulozi proteina BPM i DMS3 u mehanizmima važnim za prilagodbu biljaka na promjenjive okolišne uvjete, glavni cilj ovog rada bio je istražiti kako promijenjena ekspresija gena *BPM* i *DMS3* utječe na odgovor modelne biljke *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. na toplinski stres. Također, s obzirom da su dosadašnja istraživanja pokazala da proteini BPM i DMS3 imaju ulogu u rastu i razvoju biljaka, cilj ovog rada bio je istražiti i učinak različite genske pozadine na rast biljaka s promijenjenom ekspresijom gena *BPM* i *DMS3*. Istraživanje je provedeno na morfološkoj, fiziološkoj, biokemijskoj i molekularnoj razini, pri čemu su učinci toplinskog stresa i genske pozadine na rast i razvoj biljaka praćeni od stadija klijanaca do stadija sjemenki. Morfološke promjene predstavljaju vidljive znakove učinka nepovoljnih uvjeta na biljku te služe kao smjernica za daljnje istraživanje učinaka na fiziološkoj, biokemijskoj i molekularnoj razini. Specifični mehanizmi odgovora na toplinski stres te učinka genske pozadine detaljnije su istraženi na biljkama u stadiju klijanaca. U okviru disertacije postavljena je temeljna pretpostavka istraživanja – geni *BPM* i *DMS3* te njihovi proteinski produkti dio su složene signalne mreže uključene u regulaciju rasta, razvoja te odgovora na stresne uvjete. Pretpostavka je da će ranije spomenute linije pokazati promjene fenotipa u odnosu na divlji tip, te će linije sa smanjenom ekspresijom gena ili funkcijom proteina BPM i DMS3 biti osjetljivije na povišenu temperaturu.

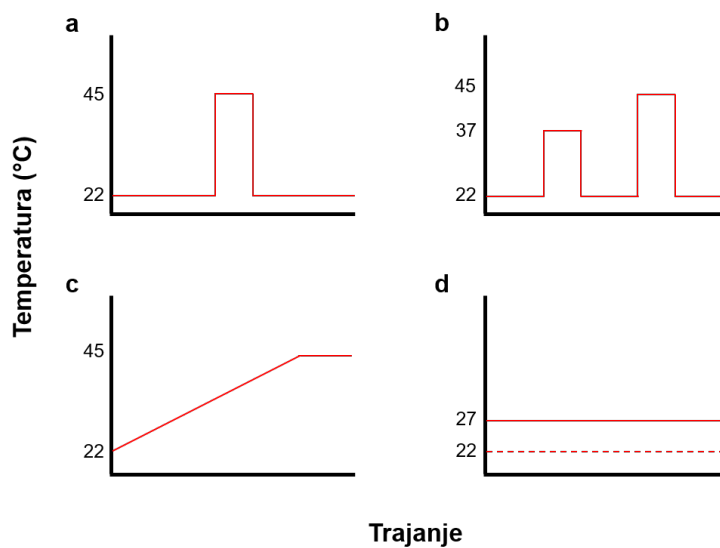
## 2. LITERATURNI PREGLED

### 2.1. Toplinski stres

Toplinski stres često se opisuje kao porast temperature tijekom određenog vremenskog razdoblja koje je dovoljno dugo da uzrokuje promjene u rastu i razvoju organizma. Drugim riječima, privremeni porast temperature, najčešće za 10 do 15 °C iznad optimalnih vrijednosti, definira se kao toplinski stres (Wahid i sur. 2007). U odgovoru na velike i relativno brze temperaturne promjene, biljke kao sesilni organizmi moraju razviti nove strategije aklimatizacije i adaptacije. Izostanak prilagodbe novonastalim uvjetima može dovesti do nepovoljnog učinka na vitalnost, rast, razvoj te reproduktivnost biljaka. Gledajući širi kontekst, to može dovesti do smanjenog prinosa i loše kvalitete usjeva, ali i do gubitka biološke raznolikosti i čak, izumiranja biljnih vrsta. Prema izvještaju Međuvladinog povjerenstva za klimatske promjene (IPCC, engl. *Intergovernmental Panel on Climate Change*) iz 2022. godine (Pörtner i sur. 2022), od 1961. godine do danas produktivnost usjeva u Africi pala je za trećinu zbog vremenskih nepogoda uzrokovanih klimatskim promjenama. Također, suša i toplinski valovi koji su pogodili područje Europe tijekom 2003. godine uzrokovali su smanjenje poljoprivredne proizvodnje za čak 30% (Ciais i sur. 2005).

Toplinski stres ima širok raspon učinaka na fiziologiju i ukupnu produktivnost biljaka, budući da se razlikuje jačinom i trajanjem, ali i učestalošću pojavljivanja. Stoga se za proučavanje odgovora biljaka na toplinski stres koriste različiti pristupi (Slika 1), pri čemu su neki istraživači više usredotočeni na pokuse koji uključuju izlaganje biljaka kratkoročnim i ekstremnim oblicima toplinskog šoka, dok su drugi usmjereni na ekološke reakcije biljaka na dugoročno zagrijavanje (Jagadish i sur. 2021).

Primjerice, izlaganje uročnjaka ekstremno povišenoj i kratkotrajnoj temperaturi (engl. *heat shock*), uključuje uzgoj biljaka u kontroliranim uvjetima, obično pri temperaturi od  $22 \pm 2$  °C, te iznenadno izlaganje temperaturama od 42 do 45 °C u trajanju od 30 do 60 minuta (Slika 1a) (Mittler i sur. 2012). Mogućnost odgovora biljaka na ovaj oblik toplinskog stresa i uspješne prilagodbe na novonastale uvjete smatra se bazalnom termotolerancijom. Takav oblik tretmana čest je u istraživanju promjena na molekularnoj i biokemijskoj razini te se ne smatra ekološki relevantnim. Međutim, upravo ovakva istraživanja omogućila su uvid u mehanizme odgovora biljaka na povišene temperature (Bokszczanin i sur. 2013).



**Slika 1.** Prikaz različitih pristupa u istraživanju odgovora biljaka na toplinski stres: (a) kratkotrajne i ekstremne promjene temperature (engl. *heat shock*), (b) postepene promjene temperature (engl. *stepwise priming*), (c) kontinuirane promjene temperature (engl. *gradual priming*), i (d) dugotrajno zagrijavanje na temperaturi nekoliko stupnjeva iznad optimalne (engl. *warming*). Prilagođeno prema Mittler i sur. (2012) te Jagadish i sur. (2021).

Drugi oblik tretmana uključuje izlaganje biljaka umjerenoj temperaturi, dopuštajući im zatim oporavak od nekoliko sati do nekoliko dana te ponovno, iznenadno izlaganje ekstremno povišenim temperaturama (engl. *stepwise priming*). Za uročnjak, ovaj oblik tretmana uključuje izlaganje biljaka uzgajanih pri 22 °C umjereno povišenim temperaturama od 36 do 38 °C u periodu od nekoliko sati, nakon čega slijedi oporavak na temperaturi uzgoja te naknadno izlaganje temperaturama od 42 do 45 °C (Slika 1b) (Mittler i sur. 2012). Sposobnost biljaka da prežive takav način tretiranja naziva se stečenom termotolerancijom. Također, takav oblik termotolerancije može biti stečen izlaganjem biljaka sporom i kontinuiranom porastu temperatura (engl. *gradual priming*), odnosno porastom temperature koji najbliže oponaša uvjete u okolišu (Slika 1c) (Mittler i sur. 2012). Naposljetku treba spomenuti oblik tretmana koji uključuje dugotrajno izlaganje biljaka, tjednima pa čak i godinama, temperaturama koje su više za 2 do 6 °C od optimalne temperature uzgoja (engl. *warming*). Primjerice, takav tretman uključivao bi uzgoj uročnjaka pri temperaturi od 27 °C, odnosno pri temperaturi koja je nešto viša od optimalne temperature za rast ove vrste (Slika 1d). Takav oblik pokusa uglavnom je usmjeren na proučavanje i razumijevanje kako će na biljke utjecati povišene temperature izazvane klimatskim promjenama (Jagadish i sur. 2021).

Nekoliko je istraživanja (Qin i sur. 2008, Bauweraerts i sur. 2014, Wang i sur. 2020) pokazalo postojanje razlika u ekspresiji gena s obzirom na način izlaganja biljaka povišenoj temperaturi, sugerirajući da postoje različiti mehanizmi, moguće i senzori, koji omogućavaju aktivaciju odgovora biljaka na toplinski stres. Drugim riječima, potrebna su daljnja istraživanja te povezivanje rezultata iz različitih studija kako bi se stekao cjelovitiji i precizniji uvid u učinke toplinskog stresa na biljke (Jagadish i sur. 2021).

## **2.2. Učinak toplinskog stresa na biljke**

### **2.2.1. Učinak na morfološka i fiziološka svojstva**

Klijanje sjemenki, kao prva faza u životnom ciklusu biljaka, smatra se najosjetljivijom na djelovanje nepovoljnih temperaturnih uvjeta (Hasanuzzaman i sur. 2013, Chen i sur. 2016, Hassan i sur. 2021). Toplinski tretman sjemenki uzrok je slabe stope klijanja te inhibicije rasta korjenčića i izdanka, što naposljetku dovodi do značajnog pada biomase i prinosa biljaka (Toh i sur. 2008, Kumar i sur. 2011). Međutim, opseg štete ovisi prije svega o vrsti i genskoj pozadini biljke, kao i o jačini i trajanju toplinskog tretmana. Naime, istraživanje Chebrolu i sur. (2016) pokazalo je da izlaganje kultivara soje (*Glycine max* (L.) Merr.), osjetljivog na toplinski stres, temperaturi od 36 °C uzrokuje smanjenje klijavosti do 50% u odnosu na kontrolne biljke uzgajane na temperaturi od 24 °C, a nakon izlaganja temperaturi od 42 °C klijanje sjemenki potpuno je inhibirano. S druge strane, izlaganje kultivara tolerantnog na toplinski stres temperaturi od 36 °C ne dovodi do značajnog pada klijavosti, a 25% sjemenki proklije čak i nakon izlaganja temperaturi od 42 °C.

U klijanaca i odraslih biljaka, prvi znak nepovoljnog utjecaja povišenih temperatura su određene morfološke deformacije koje uključuju „opekline“ biljnih dijelova poput listova i stabljike, inhibiciju rasta korijena i izdanka, promjene boje plodova te starenje i otpadanje listova (Rodríguez i sur. 2005, Fahad i sur. 2017). Rast i razvoj biljke kompleksan je proces na koji utječu brojni fiziološki, biokemijski i molekularni mehanizmi. Međutim, u svojoj srži, razvoj biljaka temelji se na dijeljenju, elongaciji i diferencijaciji stanica (Buchanan i sur. 2015). Povišene temperature uzrokuju gubitak vode iz stanica, što dovodi do smanjenja veličine stanica i dehidracije biljnog tkiva. To uzrokuje daljnju inhibiciju rasta i razvoja biljke (Shah i Paulsen 2003, Wahid i Close 2007). Djelovanje toplinskog stresa često je praćeno nedostatkom vode u tlu, posebno u tropskim i suptropskim krajevima. Međutim, zanimljivo istraživanje iz 2007. godine pokazalo je da u listovima šećerne trske (*Saccharum officinarum* L.) dolazi do

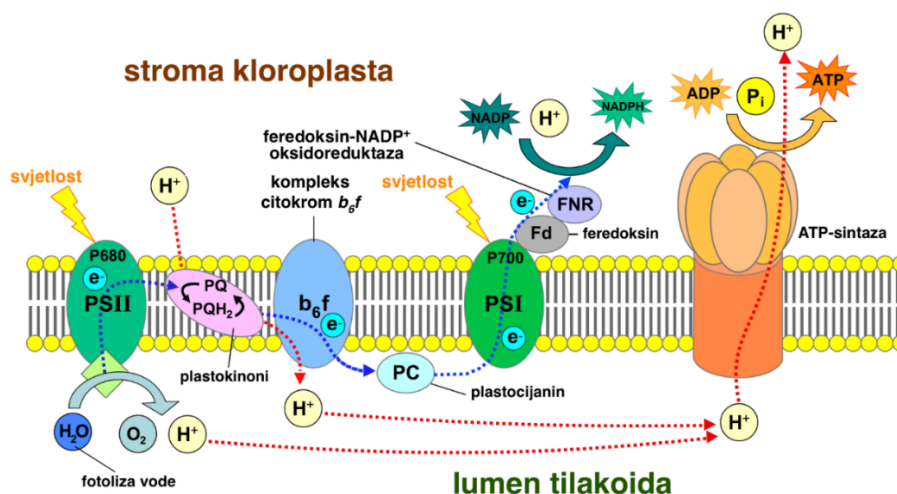
smanjenja sadržaja vode nakon izlaganja povišenim temperaturama unatoč činjenici da su tijekom pokusa biljke bile uzgajane u uvjetima optimalne vlažnosti zemlje i zraka (Wahid i Close 2007). Općenito, gubitak vode uslijed toplinskog stresa izraženiji je tijekom dana, uglavnom zbog povećane stope transpiracije, te može dovesti do narušavanja važnih fizioloških procesa poput fotosinteze, staničnog disanja, osmotske ravnoteže i stabilnosti membranskog sustava (Fahad i sur. 2017, Zhao i sur. 2021).

### **2.2.2. Učinak na fotosintezu**

Kao što sam već naglasila, rast i razvoj biljaka kontroliran je različitim i brojnim fiziološkim, biokemijskim i molekularnim procesima. Među njima, fotosinteza se ističe kao ključni proces koji značajno doprinosi rastu i razvoju biljaka (Ashraf i Harris 2013). Prema definiciji, fotosinteza je proces kojim biljke, alge, cijanobakterije i fotosintetske bakterije pretvaraju svjetlosnu energiju u kemijski stabilan oblik, tj. u organske spojeve. Put te pretvorbe je složen, a uključuje brojne fizikalne promjene i kemijske reakcije te velik broj različitih komponenti (Strasser i sur. 2000). U procesu fotosinteze možemo razlikovati dva ključna događaja koji su prostorno odvojeni – primarne reakcije, tj. reakcije ovisne o Sunčevoj svjetlosti te sekundarne reakcije ili Calvin-Benson-Basshamov (CBB) ciklus koji se iz povijesnih razloga često naziva reakcije u tami. U primarnim reakcijama, Sunčeva energija apsorbirana pigmentima u tilakoidnim membranama kloroplasta koristi se za fotolizu (oksidaciju) molekula vode, pri čemu se oslobađa kisik te u fotosintetskom lancu prijenosa elektrona pohranjuje energija u kemijskim vezama adenozin-trifosfata (ATP) i nikotinamid-adenin-dinukleotid-fosfata (NADPH). U sekundarnim reakcijama događa se fiksacija ugljikovog dioksida (CO<sub>2</sub>) u organske spojeve, a ATP i NADPH nastali tijekom primarnih reakcija koriste se u nekoliko reakcijskih koraka složenog procesa biosinteze ugljikohidrata (Miyake 2020, Sherin i sur. 2022).

Primarne reakcije temelje se na aktivnosti dviju različitih funkcionalnih jedinica – fotosustava II (PSII) i fotosustava I (PSI). Fotosustavi su složeni proteinski kompleksi na kojima možemo razlikovati dvije funkcionalne cjeline – tzv. kompleks antena i reakcijski centar. Kompleks antena građen je od proteina i pigmenata – klorofila i karotenoida, a služi za apsorpciju svjetlosne energije i prijenos energije do reakcijskog centra, u kojem se nalazi klorofil *a* i započinje prijenos elektrona. U reakcijskom centru PSII elektron se s klorofila *a* prenosi do primarnog akceptora elektrona, molekule feofitina, što označava prvi korak u fotosintetskom

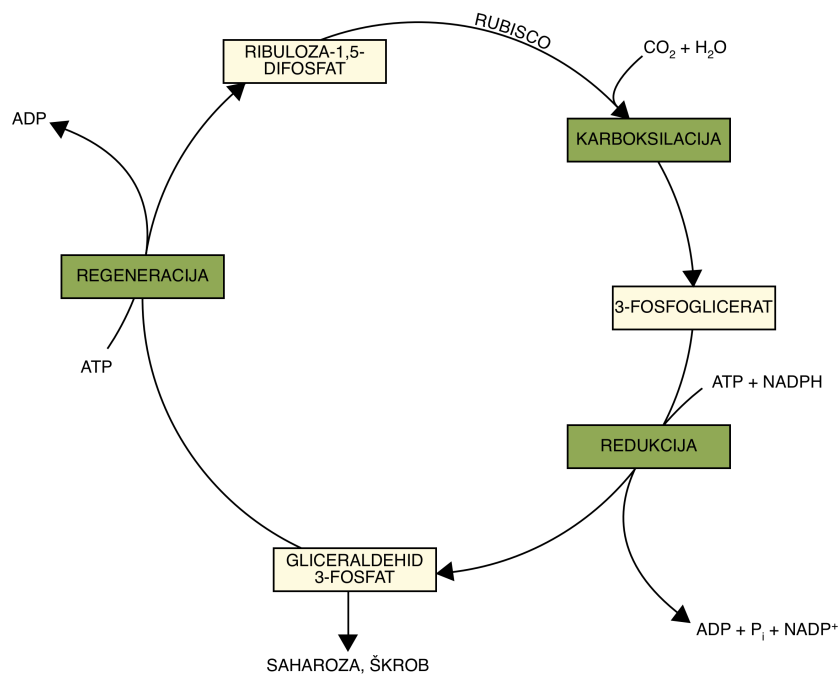
transportu elektrona. Elektron se dalje prenosi preko niza molekula i proteinskih kompleksa, koji uključuju plastokinone, kompleks citokrom *b<sub>6</sub>f*, plastocijanin, PSI, feredoksin i feredoksin-NADP<sup>+</sup>-oksidoreduktazu. Konačni produkt ovog prijenosa elektrona je već spomenuta molekula NADPH-a (Slika 2). Kako bi se nadomjestio elektron kojeg je klorofil *a* u reakcijskom centru PSII predao primarnom akceptoru (feofitinu), na PSII se odvija proces fotolize vode. Prilikom tog procesa dolazi do cijepanja molekula vode čime se oslobađaju elektroni, protoni (H<sup>+</sup>) i kisik (Buchanan i sur. 2015). Protoni oslobođeni fotolizom vode, kao i oni koji tijekom prijenosa elektrona iz strome ulaze u tilakoidni lumen, doprinose nastajanju protonskog gradijenta i omogućuju sintezu ATP-a. Ta se sinteza ostvaruje kretanjem protona u smjeru pada elektrokemijskog gradijenta, tj. iz tilakoidnog lumena u stromu kloroplasta. Pritom oni prolaze kroz transmembranski protein ATP-sintazu prilikom čega dolazi do fosforilacije adenozin-difosfata (ADP) i sinteze ATP-a (Slika 2).



**Slika 2.** Primarne reakcije fotosinteze odvijaju se u tilakoidnim membranama kloroplasta. Fotosintetski lanac prijenosa elektrona sastoji se od fotosustava II (PSII), fotosustava I (PSI), kompleksa citokrom *b<sub>6</sub>f*, plastokinona (PQ), plastocijanina (PC), feredoksina (Fd) i feredoksin-NADP<sup>+</sup> oksidoreduktaze (FNR). Prijenosom elektrona nastaje protonski gradijent koji koristi ATP-sintaza za sintezu ATP-a. Produkti primarnih reakcija, NADPH i ATP, koriste se u sekundarnim reakcijama fotosinteze, tj. Calvin-Benson-Basshamovu (CBB) ciklusu. Preuzeto i prilagođeno prema <https://shorturl.at/pvDPU>.

Sekundarne reakcije (CBB ciklus) odvijaju se u stromi kloroplasta. Taj proces uključuje vezanje molekula CO<sub>2</sub> iz atmosfere u organske molekule te niz biokemijskih reakcija koje koriste produkte primarnih reakcija, ATP i NADPH. CBB ciklus može se razmatrati kao proces koji čine tri visoko koordinirane faze – fiksacija CO<sub>2</sub> (karboksilacija), redukcija i regeneracija (Slika 3). U prvoj fazi, enzim ribuloza-1,5-difosfat karboksilaza/oksigenaza (RuBisCO)

katalizira karboksilaciju ribuloza-1,5-difosfata. Produkt te reakcije je 3-fosfoglicerat koji se u drugoj fazi reducira do gliceraldehid 3-fosfata. Faza redukcije obuhvaća dva uzastopna koraka pri čemu se koriste molekule ATP-a i NADPH-a nastale u primarnim reakcijama. Jedan dio nastalih molekula gliceraldehid 3-fosfata izlazi iz CBB ciklusa i koristi se za sintezu škroba u kloroplastima, odnosno sintezu saharoze u staničnom citosolu. Preostale molekule koriste se za posljednju fazu sekundarnih reakcija, u kojoj se u nizu enzimskih reakcija, uz utrošak ATP-a, regenerira ribuloza-1,5-difosfat. Time se ciklus zaokružuje, tj. nastankom ribuloza-1,5-difosfata ponovno je osiguran supstrat za reakciju fiksacije atmosferskog CO<sub>2</sub> (Buchanan i sur. 2015).



**Slika 3.** Sekundarne reakcije ili Calvin-Benson-Basshamov (CBB) ciklus odvijaju se u stromi kloroplasta, a uključuju tri faze – karboksilaciju, redukciju i regeneraciju. Aktivnošću enzima ribuloza-1,5-difosfat karboksilaza/oksigenaza (RuBisCO) dolazi do karboksilacije ribuloza-1,5-difosfata. Produkt reakcije je 3-fosfoglicerat koji se u drugoj fazi ciklusa reducira, pri čemu se koriste molekule ATP-a i NADPH-a nastale u primarnim reakcijama. Redukcijom 3-fosfoglicerata nastaje gliceraldehid 3-fosfat. Jedan dio nastalih molekula gliceraldehid 3-fosfata koristi se za sintezu saharoze i škroba, a preostale molekule će se u nizu enzimskih reakcija, i uz utrošak ATP-a, iskoristiti za regeneraciju ribuloza-1,5-difosfata. Preuzeto i prilagođeno prema <https://shorturl.at/qLT12>.

Danas je dobro poznato da povišena temperatura nepovoljno utječe na fotosintezu (Crafts-Brandner i Salvucci 2002, Ashraf i Harris 2013, Hu i sur. 2020). Pri povišenim temperaturama



dolazi do narušavanja strukture i funkcije fotosintetskog aparata, što dovodi do smanjenja stope fotosinteze, a naposljetku može uzrokovati i inhibiciju različitih metaboličkih reakcija (Allakhverdiev i sur. 2008, Akter i Rafiqul Islam 2017, Hu i sur. 2020). Na povišene temperature izrazito su osjetljive primarne reakcije fotosinteze, osobito PSII. Pod utjecajem toplinskog stresa povećava se fluidnost tilakoidnih membrana, što može dovesti do disocijacije PSII od membrana te disocijacije sustava za fotolizu vode od PSII. Takvi procesi narušavaju prijenos elektrona (Allakhverdiev i sur. 2008, Marutani i sur. 2012, Hu i sur. 2020). Također, biosinteza klorofila jedan je od prvih procesa koji su pogođeni djelovanjem povišenih temperatura (Allakhverdiev i sur. 2008, Hu i sur. 2020). Nekoliko je istraživanja otkrilo da se kod biljaka izloženih toplinskom stresu sintetizira manje klorofila, što se može pripisati smanjenoj stopi biosinteze i pojačanoj degradaciji, ali i kombinaciji tih dvaju procesa (Dutta i sur. 2009, Ashraf i Harris 2013, Shirdelmoghanloo i sur. 2016). Smanjenu stopu biosinteze klorofila može uzrokovati inhibicija enzima koji su uključeni u sam proces. Primjer je enzim 5-aminolevulinat dehidrataza 1 (ALAD1), prvi enzim u biosintetskom putu tetrapirola. Naime, istraživanja su pokazala da se njegova aktivnost u krastavcu i pšenici inhibira uslijed izlaganja biljaka toplinskom stresu što naposljetku dovodi do smanjenja biosinteze klorofila (Kumar Tewari i Charan Tripathy 1998). Zbog toga se analiza sastava fotosintetskih pigmenta i njihovih omjera može primijeniti kao pokazatelj fiziološkog odgovora biljaka na djelovanje povišenih temperatura (Magaña Ugarte i sur. 2018). Vezano uz sekundarne reakcije fotosinteze, nekoliko je istraživanja pokazalo da do pada fotosintetske učinkovitosti uslijed djelovanja povišenih temperatura dolazi zbog termalnog učinka na aktivnost enzima RuBisCO. Aktivnost ovog enzima regulira drugi enzim, RuBisCO aktivaza, koji omogućuje disocijaciju inhibitornih šećernih fosfata s aktivnog mjesta enzima RuBisCO (Spreitzer i Salvucci 2002). Tijekom djelovanja povišenih temperatura, aktivnost RuBisCO aktivaze je inhibirana, što rezultira daljnjom inhibicijom aktivnosti enzima RuBisCO, padom asimilacije CO<sub>2</sub> i u konačnici, smanjenom stopom fotosinteze (Spreitzer i Salvucci 2002, Sage i sur. 2008, Perdomo i sur. 2017).

Učinak povišenih temperatura na proces fotosinteze moguće je analizirati mjerenjem fotosintetske učinkovitosti. Jedna od metoda korištenih u tu svrhu je mjerenje fluorescencije klorofila *a* (Strasser i sur. 2000, 2004). Ranije je spomenuto da proces fotosinteze započinje apsorpcijom Sunčeve svjetlosti pigmentima u kompleksima antena PSI i PSII. Međutim, neće se sva apsorbirana energija iskoristiti u primarnim, odnosno fotokemijskim reakcijama već će se dio energije osloboditi u obliku topline, a dio u obliku fluorescencije, tj. svjetlosti u crvenom

području spektra. Riječ je o tri međusobno kompetitivna procesa, tj. u određenim okolišnim uvjetima može doći do pada učinkovitosti fotosinteze čime se mijenja udio energije koji je raspoloživ za preostala dva procesa, fluorescenciju i toplinu, rezultirajući njihovim porastom (Fracheboud i Leipner 2003). Upravo se zato mjerenje fluorescencije klorofila *a* uspješno koristi za praćenje i karakterizaciju fotosintetskih događaja (Strasser i sur. 2000, 2004). Za procjenu utjecaja različitih stresnih čimbenika na učinkovitost fotosinteze danas se najčešće koristi određivanje maksimalnog kvantnog prinosa PSII ( $F_v/F_m$ ) (Stirbet i sur. 2018, Xia i sur. 2023). Riječ je o parametru koji predstavlja omjer maksimalne ( $F_m$ ) i minimalne ( $F_0$ ) fluorescencije klorofila *a* mjerene u biljaka prilagođenih na uvjete tame. Prilagodбом biljaka na tamu osigurava se da su sve molekule reakcijskih centara PSII u oksidiranom stanju te je u takvim uvjetima moguće izmjeriti  $F_0$  (Byrdin i sur. 2000, Kalaji i sur. 2017). Kako bi se inducirao porast fluorescencije, biljke prilagođene na uvjete tame osvjetljava se pulsom jake svjetlosti, tj. saturacijskim pulsom. Time dolazi do redukcije većine reakcijskih centara te fluorescencija doseže svoj maksimum pri čemu je moguće izmjeriti  $F_m$  (Maxwell i Johnson 2000, Küpper i sur. 2019).

Danas postoje različite metode, kao što su JIP-test i metoda saturacijskog pulsa, koje omogućuju dublji i detaljniji uvid u fotosintetske procese (Schreiber i sur. 1994, Strasser i sur. 2000). Posebno se ističe JIP-test koji je zbog svoje relativno jednostavne primjene postao izrazito popularan tijekom posljednja dva desetljeća (Kalaji i sur. 2014, 2017). Kao što sam već spomenula, u biljaka prilagođenim uvjetima tame moguće je izmjeriti  $F_0$ , koje ujedno označava korak O u JIP-testu. Nakon osvjetljavanja biljaka pulsom jake svjetlosti postiže se razdvajanje naboja u molekuli klorofila *a* u reakcijskom centru te započinje prijenos elektrona. S klorofila *a*, elektroni se prenose do primarnog akceptora (feofitina). Za reakcijski centar vezane su molekule plastokinona A i B koje primaju elektrone od feofitina (Okamura i sur. 2000). U trenutku kad je reducirana većina molekula plastokinona A, postignut je korak J. Kad je reducirana većina molekula plastokinona B, postignut je korak I. Naposljetku, korak P postignut je redukcijom većine molekula plastokinona u tzv. plastokinonskom bazenu između PSII i kompleksa citokrom *b<sub>6</sub>f*. Time se postiže maksimalna vrijednost fluorescencije ( $F_m$ ) (Maxwell i Johnson 2000, Küpper i sur. 2019). Osim određivanja parametra  $F_v/F_m$ , primjenom JIP-testa moguće je procijeniti kako se apsorbirana energija koristi u svjetlosnim reakcijama fotosinteze (Strasser i sur. 2000, Živčák i sur. 2008). To uključuje analizu parametra  $PI_{ABS}$ , koji se u istraživanjima koristi kao pokazatelj učinka stresnih uvjeta (Strasser i sur. 2000, Chen i Cheng 2009, Zushi i sur. 2012, Jägerbrand i Kudo 2016). Navedeni parametar objedinjuje četiri glavna

toka energije u fotosintetskom aparatu – apsorpciju svjetlosti (fotona), protok „uhvaćenih“ fotona, prijenos elektrona te rasipanje energije po aktivnom reakcijskom centru PSII (Strasser i sur. 2000, 2004). Drugim riječima, određivanjem vrijednosti  $PI_{ABS}$  može se kvantitativno procijeniti vitalnost biljaka na temelju njihove fotosintetske aktivnosti (Živčák i sur. 2008).

### 2.2.3. Oksidacijski stres

Zbog djelovanja povišene temperature, u biljnoj stanici dolazi do pojave sekundarnog stresa, odnosno pojave oksidacijskog stresa uslijed pojačane stope sinteze različitih vrsta ROS-ova (Qu i sur. 2013). Najčešći oblici ROS-ova su vodikov peroksid ( $H_2O_2$ ), hidroksilni radikal ( $\cdot OH$ ), singletni kisik ( $^1O_2$ ) i superoksidni radikal ( $O_2^{\cdot -}$ ) (Kumar i Wani 2020). Glavni izvor ROS-ova pri djelovanju toplinskog stresa su kloroplasti, posebno PSI i PSII (Hasanuzzaman i sur. 2013, Zhao i sur. 2021). U normalnim okolišnim uvjetima, u procesu fotosinteze, apsorbirana svjetlosna energija učinkovito se koristi za pokretanje lanca prijenosa elektrona i konačno za proizvodnju ATP-a i NADPH-a. Međutim, u uvjetima toplinskog stresa, prijenos elektrona može postati neuravnotežen, što rezultira nastankom tripletnog klorofila, najčešće u PSII (Caffarri i sur. 2014). Tripletni klorofil može reagirati s drugim molekulama, poput kisika, stvarajući  $^1O_2$  (Krieger-Liszkay 2005). Kao rezultat svoje visoke reaktivnosti,  $^1O_2$  može reagirati s različitim biološkim molekulama, uzrokujući oštećenja i dovodeći do stanične smrti (op den Camp i sur. 2003). S obzirom da je riječ o relativno kratkoživućoj molekuli (3,1 do 3,9  $\mu s$  u čistoj vodi),  $^1O_2$  uglavnom reagira s molekulama u svom najbližem okruženju (Krasnovsky Jr 1998, Jajic i sur. 2015). Međutim, istraživanja su pokazala da  $^1O_2$  može biti i signalna molekula koja sudjeluje u aktivaciji ekspresije različitih gena. Primjer je istraživanje iz 2012. godine (Ramel i sur. 2012) koje je pokazalo da uslijed porasta količine  $^1O_2$  u uvjetima visokog osvjetljenja dolazi do pojačane sinteze jednog oblika karotenoida, poznatog kao  $\beta$ -ciklocitral. Autori su pokazali da je upravo  $\beta$ -ciklocitral zaslužan za indukciju velikog broja gena povezanih s pojačanom tolerancijom fotooksidacijskog stresa. Povrh toga, inducirani geni identificirani su kao  $^1O_2$ -inducibilni geni. Drugim riječima,  $\beta$ -ciklocitral vrlo vjerojatno sudjeluje kao molekula-glasnik u signalnom putu posredovanom molekulom  $^1O_2$ .

U biljnim stanicama,  $O_2^{\cdot -}$  može nastati u različitim organelima, uključujući kloroplaste, mitohondrije, peroksisome, ali i apoplast te plazmatsku membranu (Rhoads i sur. 2006, Rosenwasser i sur. 2011, Sandalio i sur. 2013). Primarni izvor  $O_2^{\cdot -}$  u kloroplastima je tzv. Mehlerova reakcija koja uključuje direktan prijenos elektrona s PSI na molekulu kisika, što

rezultira nastajanjem  $O_2^{\cdot-}$ . Novonastali  $O_2^{\cdot-}$  se dalje prevodi u  $H_2O_2$  uz pomoć antioksidacijskog enzima SOD (Asada 2006). Drugi važan izvor  $O_2^{\cdot-}$  su enzimi smješteni na plazmatskoj membrani, nazvani RbohB (engl. *respiratory burst oxidase homolog protein B*) i RbohD (engl. *respiratory burst oxidase homolog protein D*). Oba enzima ubrajaju se u tzv. NADPH oksidaze koje koriste NADPH kao donor elektrona za redukciju kisika do  $O_2^{\cdot-}$  (Sagi i Fluhr 2006). Važno je naglasiti da sama molekula  $O_2^{\cdot-}$  nastala djelovanjem NADPH oksidaze vrlo vjerojatno nema ulogu signalne molekule tijekom djelovanja abiotičkog stresa, time ni toplinskog, jer je riječ o umjereno reaktivnoj i kratkoživućoj (2 do 4  $\mu$ s) molekuli koja ne može prijeći membranu (Takahashi i Asada 1983). Naprotiv, tu ulogu vrlo vjerojatno ima  $H_2O_2$  jer se, zahvaljujući enzimu SOD,  $O_2^{\cdot-}$  relativno brzo dismutira do  $H_2O_2$  i  $O_2$  (Jajic i sur. 2015).

Posljednjih godina velika pažnja posvećena je NADPH oksidazi jer je pokazano da ROS-ovi generirani njihovom aktivnošću potiču oslobađanje dušikovog oksida (Wang i sur. 2014). Istraživanje iz 2010. godine (Xuan i sur. 2010) pokazalo je da prisustvo dušikovog oksida dovodi do aktivacije signalnog puta posredovanog proteinom kalmodulin 3. Međutim, do aktivacije kalmodulina ne dovodi isključivo dušikov oksid. Naime, u uvjetima toplinskog stresa aktiviraju se specifični kalcijevi kanali što dovodi do povećanja staničnih razina kalcija, što uzrokuje aktivaciju različitih signalnih puteva, prije svega onih vođenih proteinima iz skupina CBK (engl. *calcium/calmodulin binding protein-kinase*), CDPK (engl. *calcium dependent protein-kinase*) i kalmodulinom (Mittler i sur. 2012, Sajid i sur. 2018). Zajednički, aktivirani signalni putevi induciraju različite transkripcijske faktore, prije svega proteine HSFA1 i HSFA2 (engl. *heat shock factor A1 and A2*), koji će dalje inducirati druge transkripcijske faktore i pokrenuti odgovor biljke na toplinski stres (Li i sur. 2004).

Prilikom reakcije  $H_2O_2$  i  $O_2^{\cdot-}$  može nastati  $\cdot OH$ , a proces je poznat kao Haber-Weissova reakcija. Sama reakcija sastoji se od dva važna koraka – u prvom koraku se trovalentno željezo ( $Fe^{3+}$ ) u prisustvu  $O_2^{\cdot-}$  reducira do dvovalentnog željeza ( $Fe^{2+}$ ), a u drugom koraku, u reakciji  $Fe^{2+}$  i  $H_2O_2$  nastaje  $\cdot OH$  (tzv. Fentonova reakcija). Također,  $O_2^{\cdot-}$  može direktno reagirati s  $H_2O_2$  pri čemu isto nastaje  $\cdot OH$  (Sharma i sur. 2012). U odnosu na druge vrste ROS-ova,  $\cdot OH$  je najreaktivniji oblik te može reagirati sa svim biološki važnim molekulama uzrokujući stanična oštećenja poput peroksidacije lipida, razaranja membrane i deformacije proteina (Valko i sur. 2006). S obzirom da stanice ne posjeduju enzimatski mehanizam za uklanjanje  $\cdot OH$ , porast količine  $\cdot OH$  može uzrokovati staničnu smrt (Tiwari i sur. 2017). Unatoč visokoj reaktivnosti,  $\cdot OH$  je kratkoživuća molekula (~1 ns) pa je većina štete uzrokovana u blizini sinteze  $\cdot OH$

(Elstner 1982, Buxton i sur. 1988). Također, porast količine  $\cdot\text{OH}$  može se spriječiti razgradnjom  $\text{H}_2\text{O}_2$  enzimima poput katalaze (CAT) i peroksidaza (Tiwari i sur. 2017).

U usporedbi s prethodno spomenutim oblicima ROS-ova,  $\text{H}_2\text{O}_2$  je umjereno reaktivan, ali relativno stabilan ROS s duljim vremenom poluživota (1 ms). Također, s obzirom na razinu reaktivnosti i sposobnost prolaska kroz membranu,  $\text{H}_2\text{O}_2$  može utjecati na molekule udaljene od mjesta nastanka (Tiwari i sur. 2017). Upravo zbog tih karakteristika, značajna pozornost posvećena je istraživanju  $\text{H}_2\text{O}_2$  kao signalne molekule koja ima ulogu u regulaciji specifičnih bioloških procesa i aktivaciji mehanizama tolerancije na različite nepovoljne okolišne uvjete (Sharma i sur. 2012, Ohama i sur. 2017). Istraživanje provedeno 2006. godine (Volkov i sur. 2006) pokazalo je da je indukcija  $\text{H}_2\text{O}_2$  tijekom povišenih temperatura ključna za povećanu ekspresiju gena koji sudjeluju u odgovoru na toplinski stres, kao što su *HSP17.6* i *HSP18.2*. Također, isto istraživanje je pokazalo da  $\text{H}_2\text{O}_2$  pokreće aktivaciju spomenutih gena putem aktivacije gena *HSFA1a* i *HSFA1b*, i to u ranim fazama odgovora biljke na stres. Međutim, zbog pojačane stope sinteze  $\text{H}_2\text{O}_2$  također može doći do narušavanja strukture i funkcija biološki važnih molekula. Primjerice, istraživanja su pokazala da uslijed prisutnosti  $\text{H}_2\text{O}_2$  u koncentracijama višim od  $10\ \mu\text{M}$  dolazi do značajne inhibicije aktivnosti enzima ciklusa CBB uključenih u fazu regeneracije (Kaiser 1979, Leegood i Walker 1982). Kako bi se izbjeglo značajnije narušavanje strukture i funkcija molekula uslijed povećane količine  $\text{H}_2\text{O}_2$ , važna je precizna kontrola njegovih staničnih koncentracija i pravovremena aktivacija antioksidacijskih enzima poput CAT i peroksidaza (Sharma i sur. 2012).

#### **2.2.4. Oksidacijsko oštećenje membrana**

Nastajanje i uklanjanje ROS-ova moraju biti strogo kontrolirani kako bi se izbjegle neželjene posljedice u biljnoj stanici. Kad razina ROS-ova premaši kapacitet obrambenih mehanizama, stanje oksidacijskog stresa može dovesti do narušavanja strukture i funkcija molekula kao što su lipidi, proteini i nukleinske kiseline (Sharma i sur. 2012). Štoviše, porast koncentracije ROS-ova rezultira intenzivnijom peroksidacijom lipida, što dodatno doprinosi učincima oksidacijskog stresa u stanici, jer nastaju lipidni radikali koji mogu oštetiti proteine i nukleinske kiseline (Sharma i sur. 2012, Tiwari i sur. 2017).

Polinezasićene masne kiseline (PUFA, engl. *polyunsaturated fatty acids*), koje su uglavnom prisutne u membranskim fosfolipidima, posebno su osjetljive na oštećenja koja uzrokuju ROS-ovi (Sharma i sur. 2012, Tiwari i sur. 2017). Proces lipidne peroksidacije sastoji se od tri glavna

koraka – inicijacije, propagacije i terminacije (El-Beltagi i Mohamed 2013). U prvoj, inicijalnoj fazi lipidne peroksidacije, dolazi do djelomične redukcije molekule kisika putem  $\text{Fe}^{2+}$ , što rezultira stvaranjem slobodnih radikala. Novonastali radikali, prije svega  $\text{O}_2^{\cdot-}$  i  $\cdot\text{OH}$ , reagiraju s metilenskom ( $-\text{CH}_2-$ ) skupinom masnih kiselina, stvarajući konjugirane diene – lipidne peroksi radikale i hidroperokside. S obzirom na izrazitu reaktivnost peroksi radikala, oni reagiraju s novim molekulama kisika, stvarajući dodatne peroksi radikale. To potiče lančanu reakciju stvaranja lipidnih radikala. Međutim, antioksidansi poput  $\alpha$ -tokoferola mogu donirati ion  $\text{H}^+$  lipidnim radikalima što će naposljetku rezultirati ne-radikalnim produktima, odnosno terminacijom peroksidacije (Putman i sur. 2021).

Stupanj lipidne peroksidacije često se koristi kao pokazatelj oštećenja staničnih membrana uzrokovanih ROS-ovima. Pri tome se za procjenu stupnja lipidne peroksidacije mjeri koncentracija malondialdehida (MDA), jednog od krajnjih produkata peroksidacije nezasićenih masnih kiselina u fosfolipidima (Sharma i sur. 2012, Tiwari i sur. 2017). Nekoliko je istraživanja ukazalo na pozitivnu korelaciju između povećane količine ROS-ova i povećane koncentracije MDA u nepovoljnim okolišnim uvjetima (Das i Roychoudhury 2014, Choudhury i sur. 2017). Primjerice, tijekom dugotrajnog izlaganja stanica duhana (*Nicotiana tabacum* cv. Bright Yellow 2) povišenim temperaturama dolazi do povećanja razine  $\text{H}_2\text{O}_2$ , stupnja lipidne peroksidacije i oksidacije proteina (Sgobba i sur. 2015). S druge strane, autori nisu zabilježili takve promjene tijekom kraćeg izlaganja stanica duhana umjereno povišenim temperaturama, ali su primijetili nakupljanje proteina HSP i porast aktivnosti antioksidacijskog sustava.

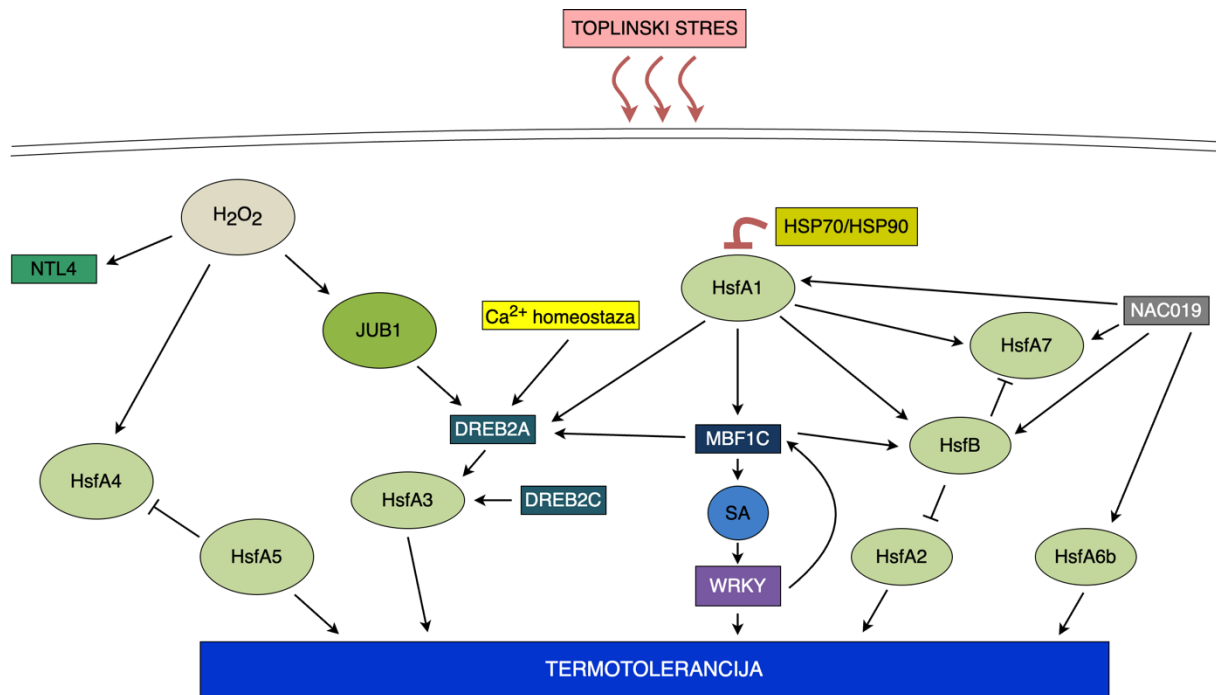
### **2.3. Mehanizmi odgovora biljaka na toplinski stres**

Tolerancija biljaka na visoke temperature temelji se na složenoj i sofisticiranoj mreži koja se sastoji od velikog broja različitih mehanizama. Prilagodba na povišene temperature uključuje reprogramiranje biljnog transkriptoma, proteoma, epigenoma i metaboloma te prema potrebi aktiviranje mehanizama programirane stanične smrti, što u konačnici može rezultirati odbacivanjem biljnih dijelova ili čak smrću čitavog organizma (Qi i sur. 2011, Sánchez-Rodríguez i sur. 2011). Nekoliko je istraživanja pokazalo da uslijed izlaganja biljaka povišenim temperaturama prvenstveno dolazi do indukcije spomenutih transkripcijskih faktora HSF, a zatim i do indukcije proteina HSP te pojačane ekspresije gena koji su uključeni u biosintezu antioksidansa i kompatibilnih osmolita (Wang i sur. 2016, Fang i sur. 2018, Galsurker i sur. 2018).

Proteini HSF podijeljeni su u tri konzervirane evolucijske klase (A, B i C) s obzirom na strukturne značajke njihovih oligomerizacijskih domena. Proteini iz klase A neophodni su za aktivaciju transkripcijskih faktora uslijed djelovanja povišenih temperatura. Toplinski stres uzrokuje aktivaciju i vezanje proteina HSFA za promotorsku regiju drugih gena putem prepoznavanja specifične domene HSE (engl. *heat stress elements*), što zauzvrat dovodi do aktivacije transkripcije ciljanih gena. Nasuprot proteinima iz klase A, proteini iz klase B i C smatraju se represorima transkripcije jer im nedostaje odgovarajući motiv AHA (engl. *aromatic hydrophobic acidic*) koji je nužan za transkripcijsku aktivnost proteina iz klase A (Scharf i sur. 2012, Jacob i sur. 2016). Uistinu, istraživanja (Mishra i sur. 2002, Yoshida i sur. 2011, Liu i sur. 2011) na uročnjaku te na poljoprivredno važnoj rajčici (*Solanum lycopersicum* L.) pokazala su da centralnu ulogu u aktivaciji i regulaciji složene transkripcijske mreže u odgovoru na toplinski stres imaju proteini iz porodice faktora toplinskog šoka A1 (HSFA1). Upravo se proteini HSFA1 smatraju tzv. „master“ regulatorima koji su neophodni za aktivaciju velikog broja transkripcijskih faktora uključenih u odgovor biljke na toplinski stres (Slika 4). Smanjena ekspresija ili potpuna inhibicija gena *HSFA1* u uročnjaku i rajčici rezultirala je smanjenom ekspresijom gena uključenih u odgovor na povišenu temperaturu te fenotipom osjetljivim na toplinski stres (Mishra i sur. 2002, Yoshida i sur. 2011, Liu i sur. 2011). Jedan od ključnih proteina reguliranih proteinom HSFA1 je protein DREB2A (engl. *dehydration-responsive element binding 2A*). Riječ je o transkripcijskom faktoru koji indukcijom transkripcije gena *HSFA3* (engl. *heat stress transcription factor A3*) sudjeluje u aktivaciji velikog broja gena u odgovoru na toplinski stres i sušu (Schramm i sur. 2008, Yoshida i sur. 2011). Istraživanje iz 2006. godine (Sakuma i sur. 2006) pokazalo je da biljke uročnjaka s prekomjernom ekspresijom gena *DREB2A* imaju značajno višu termotoleranciju. Istovremeno, biljke s utišanom ekspresijom spomenutog gena imale su značajno nižu toleranciju na povišene temperature u odnosu na divlji tip.

Proteini HSF iz klase B smatraju se transkripcijskim represorima jer negativno reguliraju ekspresiju mnogih gena induciranih povišenom temperaturom, poput gena *HSFA2*, *HSFA7a*, *HSP101* i *HSP70* (Ohama i sur. 2017). Također, geni koji kodiraju proteine iz porodice HSFB su ciljani geni nizvodno od HSFA1 te se smatra da upravo oni precizno podešavaju odgovor na toplinski stres potiskivanjem aktivnosti HSFA1 mehanizmom negativne povratne sprege (Ohama i sur. 2017, Zhao i sur. 2021). S druge strane, iako se prema dosadašnjoj literaturi proteini HSF iz klase C smatraju represorima transkripcije, njihove uloge još uvijek nisu u potpunosti razjašnjene (Jacob i sur. 2016, Zhao i sur. 2021). Naime, istraživanje na pšenici

pokazalo je da prekomjerna ekspresija gena *TaHSFC2a-B* dovodi do pojačane ekspresije gena koji kodiraju proteine HSP što naposljetku rezultira boljom termotolerancijom u odnosu na divlji tip (Hu i sur. 2018). Slični rezultati dobiveni su kloniranjem i prekomjernom ekspresijom gena *FaHSFC1b* iz trstaste vlasulje (*Festuca arundinacea* Schreb.) u uročnjaku (Zhuang i sur. 2018).



**Slika 4.** Pojednostavljeni prikaz transkripcijske regulatorne mreže tijekom odgovora biljke na toplinski stres. Pod utjecajem povišenih temperatura prekida se interakcija kompleksa proteina HSP70/90 i HSFA1, glavnih regulatora odgovora biljke na toplinski stres. Nakon prekida interakcije, protein HSFA1 odlazi iz citoplazme u jezgru gdje dovodi do aktivacije drugih transkripcijskih faktora uključenih u odgovor na toplinski stres. Uz aktivaciju HSFA1, toplinski stres rezultira nakupljanjem reaktivnih kisikovih oblika (ROS), poput H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, te povećanjem koncentracije kalcijevih iona (Ca<sup>2+</sup>) u stanici. Ti procesi dalje potiču aktivaciju dodatnih gena uključenih u odgovor biljke na toplinski stres. Preuzeto i prilagođeno prema Debnath i sur. (2024).

### 2.3.1. Proteini toplinskog šoka

Jedan od važnijih mehanizama u odgovoru biljaka na toplinski stres je indukcija proteina HSP u stanici (Kotak i sur. 2007). Ekspresija proteina HSP pod kontrolom je proteina HSF zahvaljujući prisustvu *cis*-regulatornog elementa HSE (engl. *heat shock element*). Naime, geni inducirani povišenom temperaturom, uključujući i gene koji kodiraju proteine HSP, u promotorskoj regiji sadrže visoko konzervirani element HSE. Poznato je da element HSE sadrži



palindromsku sekvencu (5'-AGAANNTTCT-3') koja služi kao vezno mjesto za proteine HSF čime se omogućava transkripcijska regulacija ciljanih gena (Nover i sur. 2001).

S obzirom na molekulsku masu, proteini HSP podijeljeni su u pet evolucijski konzerviranih porodica – HSP100 (ili ClpB), HSP90, HSP70 (ili DnaK), HSP60 (ili GroE) i sHSP (engl. *small heat shock proteins*, < 40 kDa). Općenito, proteini HSP čine izrazito heterogenu skupinu te se popis njihovih uloga neprestano širi kako istraživanja napreduju. Međutim, svaka od navedenih porodica ima svoju primarnu funkciju tijekom odgovora biljaka na toplinski stres (Hasanuzzaman i sur. 2013). Tako su proteini iz porodice HSP100 uključeni u disocijaciju i razgradnju proteina koji uslijed djelovanja nepovoljnih uvjeta formiraju agregate, a koji mogu narušiti normalne stanične funkcije. Proteini iz porodice HSP90 imaju ulogu ko-regulatora prijenosa signala uslijed djelovanja toplinskog stresa. Također, dio su procesa smatanja proteina, odnosno formiranja njihove trodimenzionalne strukture što je neophodan proces za uspostavljanje funkcionalnosti proteina. U tom procesu ulogu imaju i proteini iz porodice HSP70 i HSP60 koji sudjeluju u stabilizaciji novo-formiranih proteina kako bi se postigla njihova pravilna trodimenzionalna struktura. Proteini HSP70 i HSP90 imaju ulogu u regulaciji aktivnosti proteina HSFA1 tijekom djelovanja okolišnih uvjeta (Slika 4). U takvim uvjetima, kompleks proteina HSP70/90 vezan je na protein HSFA1 čime se utišava aktivnost proteina HSFA1 i onemogućuje njegova lokalizacija u jezgri (Yamada i sur. 2007, Hahn i sur. 2011). Tijekom djelovanja povišenih temperatura, prekida se interakcija između kompleksa HSP70/90 i proteina HSFA1 čime dolazi do aktivacije proteina HSFA1 i njegove translokacije iz citoplazme u jezgri, što naposljetku dovodi do ranije spomenute indukcije odgovora na toplinski stres (Ohama i sur. 2017). Proteini iz porodice sHSP služe kao strukturalna potpora i zaštita za stabilizaciju proteina koji se još nisu pravilno presložili ili još nisu smotani (Hasanuzzaman i sur. 2013).

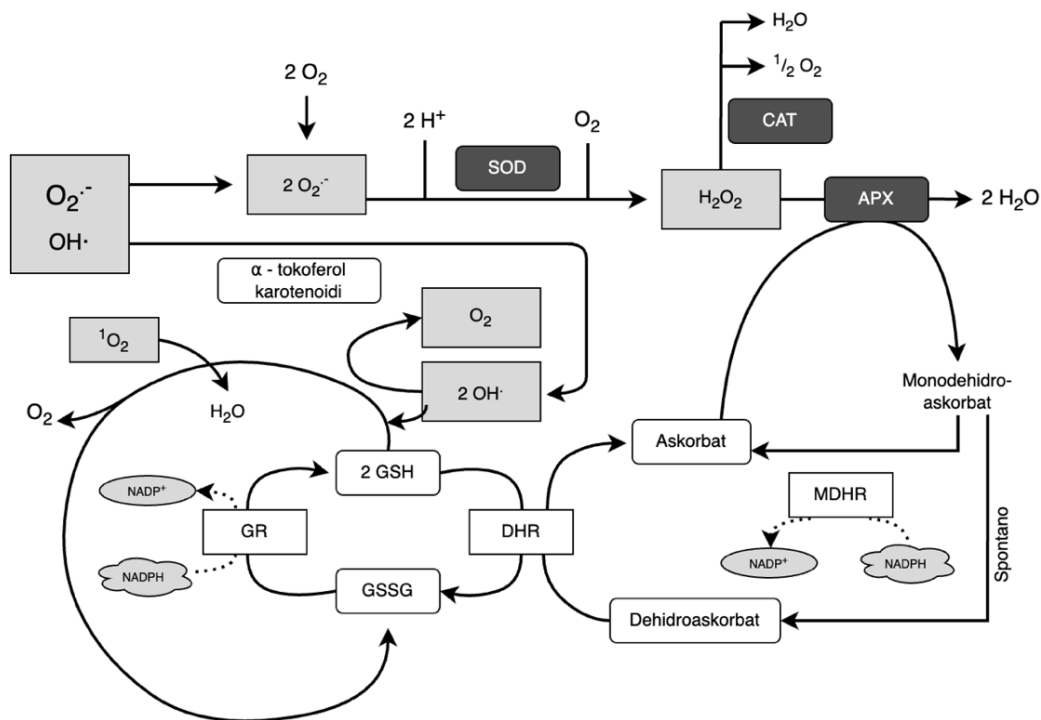
### **2.3.2. Antioksidacijski sustav**

U održavanju stanične homeostaze tijekom stresnih, ali i optimalnih okolišnih uvjeta važnu ulogu ima antioksidacijski sustav. Sam sustav čini kompleksna mreža različitih enzima i spojeva koji djeluju koordinirano kako bi neutralizirali štetan utjecaj slobodnih radikala i zaštitili stanice od oksidacijskog stresa (Sharma i sur. 2012). S obzirom na mjesto nastanka ROS-ova, antioksidansi su prisutni u različitim biljnim organelima kao što su kloroplasti,

mitohondriji i peroksisomi, a razlikujemo enzimski i ne-enzimski dio antioksidacijskog sustava (Sharma i sur. 2012, Tiwari i sur. 2017).

Prema istraživanju iz 2008. godine (Ahmad i sur. 2008), u biljnom genomu postoji preko 150 gena koji kodiraju antioksidacijske enzime te proteine uključene u neutralizaciju ROS-ova. Najistaknutiji enzimi antioksidacijskog sustava su CAT, superoksid dismutaza (SOD), peroksidaze te enzimi uključeni u askorbat-glutationski ciklus (Sharma i sur. 2012, Tiwari i sur. 2017). Nekoliko istraživanja predložilo je da enzim SOD čini prvu crtu obrane od oksidacijskog stresa uzrokovanog različitim nepovoljnim čimbenicima (Scandalios 1993, Shi i Zhu 2008, Srivastava i Dubey 2011). Naime, spomenuti enzim sudjeluje u dismutaciji dvije molekule  $O_2^{\cdot-}$  u jednu molekulu  $H_2O_2$  i jednu molekulu kisika (Slika 5). Zahvaljujući uklanjanju  $O_2^{\cdot-}$  smanjuje se mogućnost nastajanja izrazito reaktivnog i štetnog  $\cdot OH$  Haber-Weissovom reakcijom (Abouzari i Fakheri 2015). U biljaka postoji različit broj gena koji kodiraju izoforme enzima SOD. Primjerice, u uročnjaka postoji devet gena, dok ih je u riži (*Oryza sativa* L.) osam (Yadav i sur. 2019). S obzirom na prostetičku skupinu vezanu na pojedinu izoformu, geni *SOD* mogu se podijeliti u tri klase – klasu čije izoforme sadrže željezo (Fe-SOD), klasu čije izoforme sadrže mangan (Mn-SOD) te klasu čije izoforme sadrže bakar i cink (Cu/Zn-SOD) (Sharma i sur. 2012, Tiwari i sur. 2017).

Enzim CAT prvi je otkriveni i okarakterizirani enzim antioksidacijskog sustava. Radi se o enzimu koji se sastoji od četiri podjedinice (tetramer) te sadrži prostetičku skupinu hem, a odgovoran je za katalizu dismutacije dviju molekula  $H_2O_2$  do vode i kisika (Sharma i sur. 2012) (Slika 5). Dugo vremena se smatralo da je enzim CAT prisutan samo u peroksisomima, glavnom mjestu nastajanja  $H_2O_2$ . Međutim, pokazalo se da je enzim prisutan i u citosolu, kloroplastima i mitohondrijima (Mhamdi i sur. 2010). U uročnjaka postoje tri gena koji kodiraju izoforme katalaze – *CAT1-3*. Navedeni geni međusobno se razlikuju prema razini ekspresije u tkivu što često ovisi o tipu stresnog čimbenika. Primjerice, gen *CAT3* konstitutivno je eksprimiran u svim organima, dok je gen *CAT1* uglavnom eksprimiran u reproduktivnim organima i sjemenkama. S druge strane, analiza genske ekspresije u odgovoru biljaka na različite vrste stresnih čimbenika izdvojila je gen *CAT2* kao najjače eksprimirani gen od tri navedena (Alam i Ghosh 2018). Osim CAT, u biljnim stanicama postoji nekoliko drugih enzima koji mogu razgraditi  $H_2O_2$ . U usporedbi s njima, CAT je visoko specifična za  $H_2O_2$ , ali manje specifična za druge perokside. Također, jedinstvena je po tome što za razgradnju  $H_2O_2$  ne zahtijeva reducirajući donor elektrona, već koristi hem skupinu kao koenzim (Sharma i sur. 2012, Tiwari i sur. 2017).



**Slika 5.** Prikaz enzimskog i ne-enzimskog antioksidacijskog sustava u biljaka. Najznačajniji enzimi odgovorni za neutralizaciju reaktivnih kisikovih oblika ( $O_2^{\cdot-}$ ,  $\cdot OH$ ,  $^1O_2$ ,  $H_2O_2$ ) su superoksid dismutaza (SOD), katalaza (CAT) i askorbat peroksidaza (APX), dok su najznačajniji ne-enzimski spojevi  $\alpha$ -tokoferol i karotenoidi. Neutralizacija reaktivnih kisikovih oblika dodatno se pospješuje aktivnošću askorbat-glutathionskog ciklusa čija okosnica su enzimi monodehidroaskorbat reduktaza (MDHR) i dehidroaskorbat reduktaza (DHR) koji sudjeluju u regeneraciji askorbata te glutation reduktaza (GR) i ne-enzimski spojevi askorbat, oksidirani (GSH) i reducirani (GSSG) glutation. Preuzeto i prilagođeno prema Halliwell (2006) te Ceron-Garcia i sur. (2012).

Biljne peroksidaze čine drugu skupinu enzima koji prilikom oksidacije različitih supstrata reduciraju  $H_2O_2$  do vode (Das i Roychoudhury 2014, Tiwari i sur. 2017). S obzirom na staničnu lokalizaciju i funkciju, peroksidaze se mogu klasificirati u tri skupine. U biljkama su prisutne klasa 1 i klasa 3, dok je klasa 2 karakteristična isključivo za carstvo gljiva (Mathé i sur. 2010). Klasu 3 čini velika skupina različitih proteina koji pokazuju visok afinitet prema aromatskim molekulama poput gvajakola. Zbog toga su ovi enzimi poznati kao gvajakol peroksidaze (G-POD) i mogu se pronaći u vakuolama, staničnoj stijenci i citosolu (Mathé i sur. 2010, van Doorn i Ketsa 2014). Uz njihovu aktivnost vezani su različiti biološki procesi poput umrežavanja stanične stijenske, sinteze lignina i suberina, metabolizma auksina te tolerancije različitih abiotičkih i biotičkih čimbenika (Passardi i sur. 2005, Cosio i Dunand 2009, Marjamaa i sur. 2009). U literaturi, enzimi G-POD često se nazivaju „stres“ enzimima jer je velik broj istraživanja pokazao da prilikom izlaganja biljaka različitim nepovoljnim okolišnim uvjetima dolazi do indukcije njihove aktivnosti te učinkovite neutralizacije ROS-ova i peroksi radikala

(Kang i Saltveit 2002, Xu i sur. 2008, Bai i sur. 2010). U klasu 1 ubraja se askorbat peroksidaza (APX), centralni enzim askorbat-glutationskog ciklusa (Mathé i sur. 2010). APX katalizira redukciju  $H_2O_2$  do vode, koristeći askorbat kao donora elektrona (Slika 5). U uročnjaka postoji devet gena koji kodiraju izoforme APX u različitim staničnim dijelovima – citosolu, peroksisomima, stromi i tilakoidima kloroplasta (Chew i sur. 2003, Mittler i sur. 2004). U riži je opisano šest gena *APX*, od kojih su tri značajna za izoforme eksprimirane u kloroplastima, dvije za citosol i peroksisome, a jedna za mitohondrije (Teixeira i sur. 2006, Anjum i sur. 2014). U usporedbi s enzimom CAT, APX pokazuje viši afinitet prema  $H_2O_2$  te ima ključnu ulogu u održavanju unutarstanične ravnoteže ROS-ova, posebno tijekom nepovoljnih okolišnih uvjeta (Das i Roychoudhury 2014). Kao što je već ranije spomenuto, APX je ključni enzim askorbat-glutationskog ciklusa koji ima vitalnu ulogu u neutralizaciji ROS-ova i održavanju redoks ravnoteže unutar stanice (Tiwari i sur. 2017). Ciklus započinje redukcijom  $H_2O_2$  do vode, što istovremeno uzrokuje oksidaciju askorbata i nastanak monodehidroaskorbata (MDHA). Kako bi se aktivnost APX-a održala neprekinutom, neophodno je regenerirati MDHA (Slika 5). U procesu regeneracije sudjeluje enzim monodehidroaskorbat reduktaza (MDHR), pri čemu nikotinamid adenin dinukleotid (NADH) ili NADPH služe kao donori elektrona. Ukoliko ne dođe do brze redukcije MDHA, doći će do njegovog spontanog raspada na askorbat i dehidroaskorbat (DHA). Da bi se DHA regenerirao u askorbat, ključna je uloga enzima dehidroaskorbat reduktaze (DHR), koji koristi reducirani glutacion (GSH) kao donora elektrona za redukciju DHA u askorbat. Pri tome nastaje oksidirani dimer glutacion disulfid (GSSG), koji zatim djelovanjem enzima glutacion reduktaze (GR) i NADPH kao donora elektrona prelazi u reducirani oblik glutaciona, odnosno GSH (Das i Roychoudhury 2014, Tiwari i sur. 2017).

Osim enzima, dio antioksidacijskog sustava čine i ne-enzimski spojevi poznati kao ne-enzimski antioksidansi. U ovu skupnu ubrajaju se već spomenuti askorbat i GSH te  $\alpha$ -tokoferol, karotenoidi, fenolni spojevi i kompatibilni osmoliti kao što je aminokiselina prolin (Sharma i sur. 2012, Tiwari i sur. 2017). Među njima, za uklanjanje suvišne energije apsorbirane na fotosintetskim membranama, posebno su značajni karotenoidi (Tiwari i sur. 2017). Riječ je o lipofilnim organskim spojevima koji se nalaze u plastidima fotosintetski aktivnog i ne-aktivnog tkiva, a mogu apsorbirati svjetlosnu energiju valnih duljina od 450 do 570 nm te je prenositi na klorofil *a* (Das i Roychoudhury 2014, Tiwari i sur. 2017). U biljnom tkivu imaju mnogobrojne uloge, uključujući i zaštitu od oksidacijskog stresa. Naime, karotenoidi se mogu nalaziti u nekoliko energijskih stanja – osnovnom stanju te ovisno o količini apsorbirane energije, u jednom ili dva pobuđena stanja. Pri apsorpciji suvišne energije, odnosno prelasku u pobuđeno

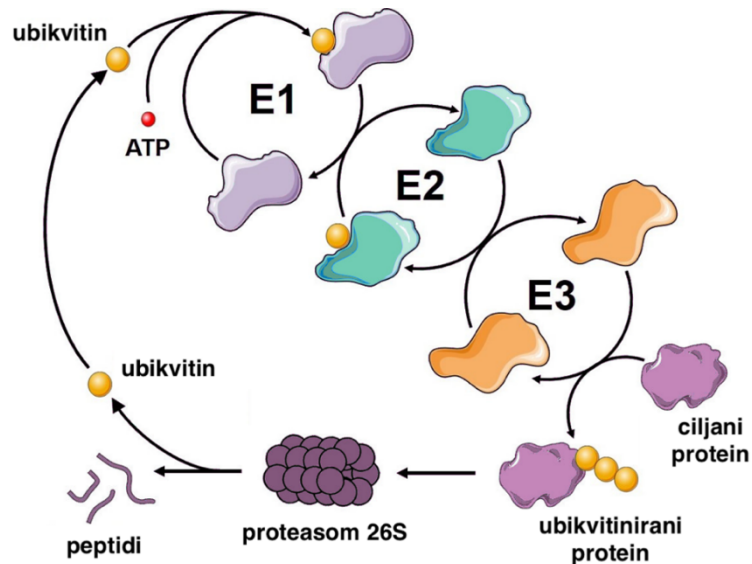
stanje, štite fotosintetski aparat tako što: 1) reagiraju s lipidnim peroksidima kako bi doveli do terminacije lipidne peroksidacije, 2) neutraliziraju  $^1\text{O}_2$  i oslobađaju suvišak energije kao toplinu, 3) reagiraju s tripletnim klorofilom kako bi se spriječilo nastajanje  $^1\text{O}_2$  te 4) otpuštaju suvišak apsorbirane energije kroz ksantofilski ciklus (Das i Roychoudhury 2014, Tiwari i sur. 2017). Uistinu, istraživanje iz 2011. godine (Gomathi i Rakkiyapan 2011) pokazalo je da visok udio karotenoida u otpornijem varijetetu šećerne trske doprinosi toleranciji biljke na solni stres pri čemu su tretirane biljke pokazale bolju membransku stabilnost i fotosintetsku učinkovitost u odnosu na varijetet sa smanjenim sadržajem karotenoida u tkivu.

Posljednjih godina, nekoliko je istraživanja (Elewa i sur. 2017, Qirat i sur. 2018, Sadeghipour 2020) istaknulo aminokiselinu prolin kao dio antioksidacijskog sustava biljaka. Prolin se smatra tzv. osmoprotektantom ili kompatibilnim osmolitom, a u koje se ubrajaju mali i izrazito topivi organski spojevi s neutralnim nabojem koji ne utječu na odvijanje metaboličkih reakcija tijekom optimalnih uvjeta (Das i Roychoudhury 2014, Hosseinfard i sur. 2022). Osmoliti se uobičajeno dijele u tri skupine – šećere i šećerne alkohole (npr. trehaloza, inozitol), kvarterne amonijeve spojeve (npr. glicin betain, poliamini) te aminokiseline (npr. prolin, ektoin). Među njima, prolin se istaknuo kao jedan od najučinkovitijih osmolita i signalnih molekula, zahvaljujući svojoj specifičnoj strukturi. Naime, zbog svoje cikličke strukture, prolin nema slobodnu amino skupinu koja može stvarati vodikove veze kao što to rade druge aminokiseline. To ga čini manje sklonim sudjelovanju u sekundarnim strukturama poput  $\alpha$ -zavojnica i  $\beta$ -ploča, ali doprinosi njegovoj sposobnosti djelovanja kao antioksidansa (Hosseinfard i sur. 2022). Prema Das i Roychoudhury (2014), prolin je učinkovit u neutralizaciji  $\cdot\text{OH}$  i  $^1\text{O}_2$  te može smanjiti oštećenja uzrokovana peroksidacijom lipida. Tijekom stresnih uvjeta, u biljkama raste količina prolina, što može biti posljedica njegove povećane sinteze ili smanjene degradacije (Verbruggen i Hermans 2008). Sinteza prolina odvija se u nekoliko koraka, pri čemu se kao supstrat koristi glutaminska kiselina, a biosintezu kataliziraju dva enzima – 1-pirolin-5-karboksilat sintetaza i pirolin-5-karboksilat reduktaza. Reakciju degradacije katalizira enzim prolin dehidrogenaza (Verbruggen i Hermans 2008). Iako tijekom stresa količina prolina raste, nekoliko istraživanja predložilo je moguće toksično djelovanje prolina i njegovog međuprodukta, pirolin-5-karboksilata (Hellmann i sur. 2000, Deuschle i sur. 2004, Rizhsky i sur. 2004). Istraživanje iz 2004. (Deuschle i sur. 2004) pokazalo je da nakon egzogene primjene prolina i pirolin-5-karboksilata dolazi do povećane akumulacije ROS-ova, indukcije ekspresije gena uključenih u odgovor na stres te inhibicije rasta uročnjaka.

### 2.3.3. Ubikvitin-proteasomalni put

Odgovor biljaka na unutarstanične signale, ali i promjene uvjeta okoliša uključuje složenu i preciznu kontrolu ekspresije različitih gena i proteina. Ova regulacija obuhvaća više razina, uključujući transkripciju, translaciju i post-translacijske mehanizme (Mittler i sur. 2012, Buchanan i sur. 2015). Ubikvitin-proteasomalni put smatra se jednim od ključnih post-translacijskih mehanizama jer sudjeluje u regulaciji stabilnosti velikog broja (80-90%) staničnih proteina (Xu i sur. 2019). Štoviše, ovaj put omogućuje brzu i selektivnu degradaciju proteina, zbog čega sudjeluje u regulaciji različitih staničnih i fizioloških procesa te ima vitalnu ulogu u rastu i razvoju biljaka te prilagodbi na promjenjive uvjete okoliša (Xu i sur. 2019, Ban i Estelle 2021). Sam mehanizam uključuje protein ubikvitin, aktivnost tri različita enzima (E1, E2 i E3), proteasom 26S te ciljane proteine (Sadanandom i sur. 2012).

Ubikvitin je kompaktni globularni protein sastavljen od 76 aminokiselina, a visoko konzervirana sekvenca ovog proteina prisutna je u svim eukariotskim organizmima (Schimke 1973, Callis i sur. 1995). Ubikvitin je osnovni član porodice proteina poznate kao „proteini slični ubikvitinu“ (engl. *ubiquitin like proteins*), a koji imaju sposobnost kovalentnog vezanja na ciljane proteine, utječući tako na njihovu stabilnost, aktivnost i lokalizaciju (Hershko i Ciechanover 1998, Jentsch i Pyrowolakis 2000). Vezanje ubikvitina na odgovarajuće proteine odvija se u tri koraka putem kaskade ovisne o ATP-u (Slika 6). Prvi korak započinje aktivacijom ubikvitina enzimom E1, koji katalizira stvaranje acil-fosfoanhidridne veze između adenozin-monofosfata (AMP) i C-terminalnog kraja glicina u molekuli ubikvitina. Aktivirani ubikvitin tvori stabilni međuprodukt s enzimom E1 izravnim vezanjem na cistein tiolesterskom vezom. Sljedeći korak uključuje prijenos, odnosno transesterifikaciju, aktiviranog ubikvitina s enzima E1 na enzim E2, poznatog i kao ubikvitin-konjugirajući enzim. U posljednjem koraku, ubikvitin se s enzima E2 prenosi na ciljani protein uz pomoć trećeg enzima, enzima E3 ili ubikvitin ligaze. Rezultat tog prijenosa je konjugirani spoj ubikvitina i odgovarajućeg proteina, pri čemu izopeptidna veza povezuje C-terminalni kraj glicina u molekuli ubikvitina i N-terminalni kraj lizina ciljanog proteina (Sadanandom i sur. 2012). Nakon što je ciljani protein označen ubikvitinom putem procesa ubikvitinacije, to može rezultirati različitim scenarijima ovisno o kontekstu i vrsti označenog proteina. Najčešća posljedica ubikvitinacije je ciljano usmjeravanje proteina prema proteasomu 26S, koji je odgovoran za razgradnju nepotrebnih ili oštećenih proteina (Ban i Estelle 2021).

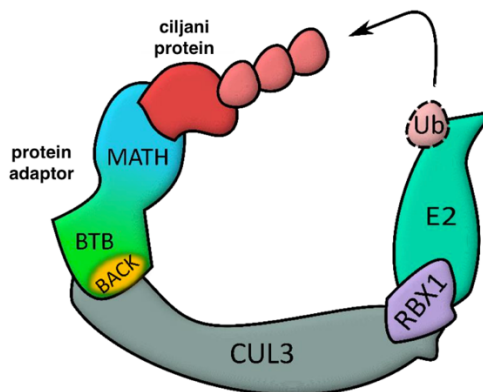


**Slika 6.** Pojednostavljeni prikaz ubikvitin-proteasomalnog puta. Do degradacije proteina na proteasomu 26S dolazi obilježavanjem ciljanih proteina molekulom ubikvitina kroz ATP-ovisnu aktivnost tri enzima (E1, E2 i E3). Preuzeto i prilagođeno prema <https://shorturl.at/aeizF>.

Ubikvitin ligaze predstavljaju najraznovrsniju skupinu proteina unutar mehanizma ubikvitinacije, čime se proširuje specifičnost ubikvitin-proteasomalnog puta (Ban i Estelle 2021). U biljaka, ubikvitin ligaze mogu se klasificirati u četiri glavne skupine – HECT (engl. *homologous to the E6-AP carboxyl terminus*), RING (engl. *really interesting new gene*), U-box i CRL (engl. *cullin-RING ligases*). Ligaze iz prve tri skupine su monomeri, dok se ligaze CRL sastoje od više podjedinica (Chen i Hellmann 2013). Do danas, najbolje su opisane ligaze iz skupine CRL, za koje su istraživanja pokazala da sudjeluju u svim aspektima rasta i razvoja biljaka (Xu i sur. 2019, Ban i Estelle 2021). Kao što je već spomenuto, ligaze CRL sastoje se od više podjedinica, pri čemu protein kulin služi kao strukturna okosnica kompleksa. Na C-terminalni kraj kulina veže se enzim E2, a na N-terminalni kraj ciljani protein. U biljaka su opisane četiri vrste ligaza CRL, koje se međusobno razlikuju prema prisutnoj izoformi kulina – CUL1, CUL3, CUL4 te ligaze CRL koje sadrže protein sličan kulinu, APC2 (engl. *anaphase-promoting complex 2*). Posljednjih godina, upravo su ligaze CUL3 prepoznate kao važni regulatori brojnih staničnih procesa u biljkama, uključujući signalne puteve, biosintezu hormona te odgovor na stres (Ban i Estelle 2021).

Istraživanja na obliću *Caenorhabditis elegans* prva su identificirala ligaze E3 bazirane na CUL3 (Furukawa i sur. 2003, Pintard i sur. 2003, Staller i sur. 2003). Također, ista istraživanja pokazala su kako protein CUL3 ulazi u interakciju s drugim proteinima. Riječ je o dvije skupine proteina – proteinima RBX1 (engl. *RING-box protein 1*) i proteinima BTB/POZ. Pri tome, proteini RBX1 služe za vezanje enzima E2 i njegovo usmjeravanje prema enzimu E3 tijekom

ubikvitinacije (Slika 7). S druge strane, proteini koji sadrže domenu BTB/POZ služe za vezanje ciljanih proteina te zbog toga obično sadrže dodatnu domenu, poput NH3 (engl. *nonphototropic hypocotil*), TPR (engl. *tetratricopeptide repeat*) i MATH (Xu i sur. 2019, Ban i Estelle 2021).



**Slika 7.** Interakcija ligaze E3 bazirane na kulinu 3 (CUL3) te proteina RBX1 i BTB-MATH. Protein CUL3 služi kao strukturna okosnica kompleksa. Njegov C-terminalni kraj služi za vezanje proteina RBX1 koji veže enzim E2 i olakšava prijenos ubikvitina (Ub) na ciljani protein. N-terminalni kraj proteina CUL3 veže protein BTB-MATH, koji ima ulogu specifičnog adaptora za ciljani protein. Preuzeto i prilagođeno prema Jagić (2023).

U genomu uročnjaka postoji šest gena koji zbog mehanizma alternativnog prekrajanja kodiraju najmanje 16 različitih izoformi proteina BTB/POZ-MATH (BPM). Međutim, daljnja istraživanja pokazala su kako se broj gena *BPM* razlikuje između vrsta, pri čemu su značajno veliko proširenje i raznolikost primijećeni u porodici trava (Juranić i Dresselhaus 2014). Uz spomenutih šest gena u uročnjaku, pet ih je pronađeno u rajčici, deset u bijeloj repi (*Brassica rapa* L.), 31 u kukuruzu (*Zea mays* L.) te 68 u riži (*Oryza sativa* L.) (Gingerich i sur. 2005, Gingerich i sur. 2007, Juranić i sur. 2012, Zhao i sur. 2013, Li i sur. 2018). Analiza spomenutih vrsta pokazala je da se porodica proteina BPM može podijeliti u dvije skupine – temeljnu skupinu (engl. *core group*), koja je zajednička većini istraživanih vrsta te proširenu skupinu (engl. *expanded group*) koja je nastala uslijed duplikacije gena, a karakteristična je za porodicu trava (Juranić i Dresselhaus 2014). Do danas je funkcionalno okarakterizirano samo nekoliko proteina BPM, a istraživanja su otkrila njihovu uključenost u razvojne procese i odgovor biljaka na abiotički stres, zahvaljujući čemu mogu utjecati na fenotipsku i fiziološku prilagodbu biljaka u promjenjivim okolišnim uvjetima. Weber i Hellman (2009) pokazali su da proteini BPM ulaze u interakciju s transkripcijskim faktorima iz skupine ERF/AP2 (engl. *ethylene response factor/apetala2*). Regulacija transkripcijskih faktora iz skupine ERF/AP2 predstavlja posljednji



korak u etilenskom signalnom putu kojim se regulira biosinteza fitohormona kao što su etilen, citokinini, giberelini i apscizinska kiselina (De Boer i sur. 2011, Qi i sur, 2011). Lechner i sur. (2011) pokazali su da proteini BPM stupaju u direktnu interakciju s transkripcijskim faktorom ATHB6 (engl. *homeobox-leucine zipper protein ATHB-6*), negativnim regulatorom signalnog puta apscizinske kiseline. Chen i sur. (2013) dokazali su uključenost proteina BPM u metabolizam masnih kiselina kroz interakciju s transkripcijskim aktivatorom WRI1 (engl. *wrinkled 1*). Proteini BPM utječu i na stabilnost transkripcijskog faktora MYB56 (engl. *myb-related protein 56*), negativnog regulatora cvjetanja (Chen i sur. 2015).

U okviru istraživanja uloge proteina BPM u toplinskom stresu, posebno je zanimljivo istraživanje iz 2017. godine (Morimoto i sur. 2017) gdje je pokazano da proteini BPM1-6 ulaze u interakciju s proteinom DREB2A, ključnim transkripcijskim faktorom koji regulira odgovor biljke na povišene temperature i sušu. Prethodno je već naglašeno kako je protein DREB2A reguliran proteinom HSFA1 te da biljke uročnjaka s prekomjernom ekspresijom gena *DREB2A* imaju značajno višu termotoleranciju u odnosu na divlji tip (Sakuma i sur. 2006, Schramm i sur. 2008, Yoshida i sur. 2011). No, prevelika količina proteina DREB2A u stanici dovodi do pojačane indukcije gena uključenih u odgovor biljke na stres, što može uzrokovati usporeni rast i razvoj biljke uslijed preraspodjele metaboličke energije. Kako bi se spriječio negativan učinak proteina DREB2A na rast i razvoj biljke, njegove razine u stanici moraju biti precizno kontrolirane. Upravo je istraživanje Morimoto i sur. (2017) pokazalo da proteini BPM posreduju u razgradnji proteina DREB2A kroz ubikvitin-proteasomalni put. Time proteini BPM negativno reguliraju odgovor biljke na toplinski stres i sušu, sprječavajući neželjene posljedice prevelike količine proteina DREB2A u stanici. Konkretno, tijekom normalnih okolišnih uvjeta, protein BPM2 lokaliziran je u jezgri stanice i posreduje u procesu degradacije proteina DREB2A. Dodatno, pod utjecajem povišenih temperatura, protein BPM4 se translocira iz citoplazme u jezgru kako bi, zajedno sa proteinom BPM2, regulirao stanične razine proteina DREB2A tijekom toplinskog stresa (Morimoto i sur. 2017).

#### **2.3.4. Metilacija DNA posredovana malim molekulama RNA**

Iako se transkripcijski faktori smatraju ključnim regulatorima biljnog odgovora na abiotički stres, sve više radova ukazuje na značajnu ulogu epigenetskih mehanizama u prilagodbi biljaka nepovoljnim okolišnim uvjetima (Ohama i sur. 2017, Chang i sur. 2020, Erdmann i Picard 2020). Epigenetske promjene obuhvaćaju strukturalne promjene kromatina koje rezultiraju

promijenjenom ekspresijom gena, a da pri tome ne dolazi do promjena u samoj sekvenci DNA. Ove promjene uključuju različite histonske varijante i modifikacije (npr., metilaciju, acetilaciju, fosforilaciju, ubikvitinaciju i SUMOilaciju), metilaciju DNA te male nekodirajuće molekule RNA, pri čemu je metilacija DNA jedan od najistraživanijih epigenetskih mehanizama (Duan i sur. 2018, Ashapkin i sur. 2020). Metilacija DNA je proces dodavanja metilne grupe na peti atom ugljika baze citozin (C) uz pomoć donora, kao što je S-adenozilmetionin, što rezultira nastankom 5-metilcitozina. Ovaj proces kataliziraju enzimi iz porodice DNA-metiltransferaza, a njihova aktivnost ovisi o okruženju sekvence koju metiliraju. Okruženje sekvence definirano je drugim bazama koje okružuju bazu C, što može rezultirati simetričnom ili asimetričnom metilacijom. Simetrična metilacija DNA prisutna je kod oba lanca molekule DNA i odnosi se na okruženje CG i CHG, pri čemu je oznaka G za bazu gvanin, a oznaka H za baze adenin, timin ili C. S druge strane, asimetrična metilacija događa se samo na jednom lancu DNA i odnosi se na okruženje CHH (Matzke i Mosher 2014). Simetrična metilacija nasljeđuje se tijekom replikacije DNA i može se održavati pasivno. No, za održavanje asimetrične metilacije potreban je aktivan proces koji u biljaka uključuje male interferirajuće molekule RNA (siRNA, engl. *small interfering RNA*). Molekule siRNA, kroz niz koraka, navode metiltransferazu DRM2 (engl. *domains rearranged methyltransferase 2*) na mjesta predviđena za metilaciju, a čitav mehanizam poznat je kao metilacija DNA posredovana malim molekulama RNA (RdDM, engl. *RNA-directed DNA methylation*) (Erdmann i Picard 2020). U biljaka, mehanizam RdDM jedini može metilirati bazu C neovisno o okruženju sekvence (Matzke i Mosher 2014).

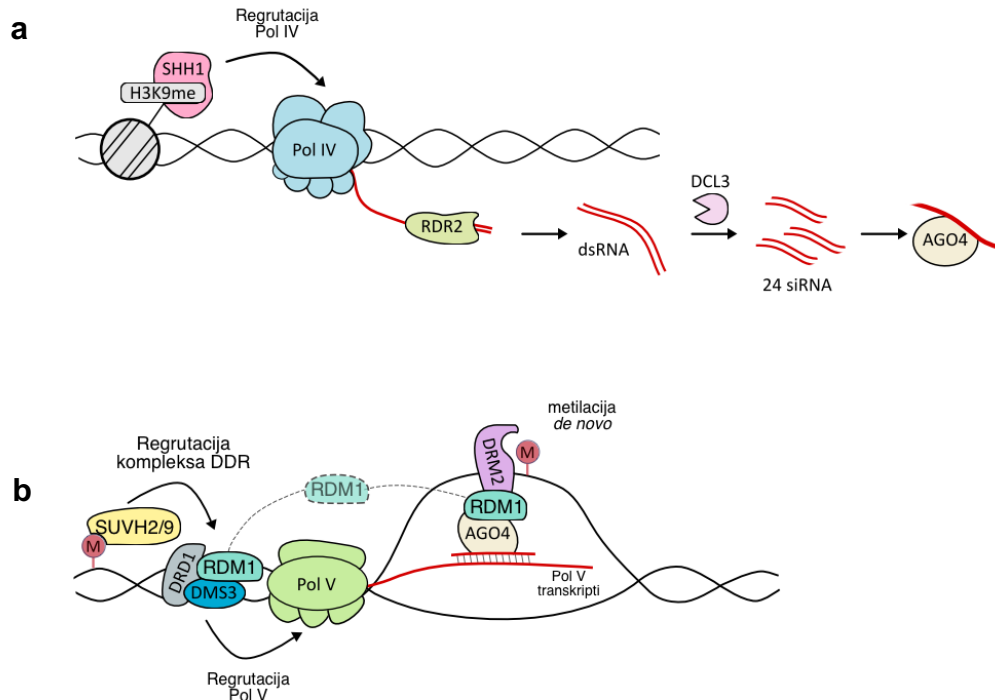
Do danas je najbolje opisan kanonski put RdDM-a (engl. *canonical RdDM*), ujedno i najaktivniji oblik RdDM-a u stanici (Cuerda-Gil i Slotkin 2016). Riječ je o mehanizmu koji je uglavnom karakterističan za regije koje su već metilirane kako bi pojačao postojeće metilirane obrasce, što predstavlja mehanizam pozitivne povratne sprege (Matzke i Mosher 2014, Cuerda-Gil i Slotkin 2016). Ključnu ulogu u ovom mehanizmu imaju dvije RNA polimeraze specifične za biljke – polimeraza IV (Pol IV) i polimeraza V (Pol V). Stoga se ovaj mehanizam može podijeliti na dva osnovna dijela – biosintezu molekula siRNA posredovanjem Pol IV te metilaciju DNA *de novo* posredovanjem Pol V (Slika 8a). Ukratko, aktivacija ovog mehanizma započinje navođenjem Pol IV na specifična mjesta u genomu, uglavnom u heterokromatinu. Za navođenje Pol IV ključni su proteini iz porodice CLSY (engl. *classy*) te protein SHH1 (engl. *SAWADEE homeodomain homolog 1*), a rezultat interakcije su male jednolančane molekule RNA (ssRNA), preteče molekula siRNA (Blevins i sur. 2015, Zhai i sur. 2015, Cuerda-Gil i Slotkin 2016, Singh i sur. 2019). Nakon toga, molekule ssRNA prevode se u dvolančane

molekule RNA (dsRNA) zahvaljujući interakciji Pol IV i proteina RDR2 (engl. *RNA-directed RNA polymerase 2*). Konačno, molekule dsRNA cijepaju se u molekule siRNA zahvaljujući aktivnosti endoribonukleaze DCL3 (engl. *dicer-like 3*). Novonastale siRNA vežu se za proteine iz porodice AGO (engl. *argonaute*). Riječ je o visoko konzerviranoj porodici proteina koja može vezati molekule siRNA, pri čemu nastaje kompleks AGO-siRNA. Važno je spomenuti da ovaj kompleks prepoznaje duge nekodirajuće sekvence RNA (engl. *scaffold RNA*), produkte aktivnosti Pol V (Meister 2013, Matzke i Mosher 2014).

U drugom dijelu ovog puta, mehanizam RdDM usmjerava se prema sekvencama DNA koje su komplementarne molekulama siRNA nastalim u prvom dijelu puta (Slika 8b). Navođenje Pol V na specifična mjesta u genomu olakšavaju proteini iz kompleksa DDR, sastavljenog od proteina DRD1 (engl. *defective in RNA-directed DNA methylation 1*), DMS3 (engl. *defective in meristem silencing 3*) i RDM1 (engl. *RNA-directed DNA methylation 1*). Protein DRD1 potiče aktivnost Pol V kroz remodeliranje kromatina, dok protein DMS3 sudjeluje u navođenju Pol V kroz interakciju s proteinima SUVH2 i SUVH9 (engl. *suppressor of variegation 3-9 homolog 2 and 9*), koji su neophodni za pravilnu lokalizaciju kompleksa DDR i Pol V. Protein RDM1 olakšava vezanje Pol V za kromatin te potpomaže vezanje metiltransferaze DRM2 za kompleks AGO-siRNA (Liu i sur. 2014, Wongpalee i sur. 2019, Erdmann i Picard 2020). Navođenjem i aktivnošću Pol V nastaju tzv. Pol V transkripti koje pronalazi kompleks AGO-siRNA i veže komplementarne sekvence duž transkripata. Naposljetku, navedeni koraci rezultirat će navođenjem metiltransferaze DRM2 i metilacijom ciljanih mjesta u genomu (Matzke i Mosher 2014, Erdmann i Picard 2020).

Osim biosinteze molekula siRNA putem aktivnosti proteina Pol IV-RDR2-DCL3, postoji i nekoliko manjih, dodatnih puteva koji mogu usmjeriti mehanizam RdDM prema specifičnim mjestima u genomu. Zajednički, ti putevi poznati su kao nekanonski put RdDM-a (engl. *non-canonical RdDM*), a ovisni su uglavnom o aktivnosti proteina Pol II i RDR6 (Cuerda-Gil i Slotkin 2016, Erdmann i Picard 2020). U usporedbi s kanonskim putem, nekanonski putevi obično su uključeni u uspostavljanje početne metilacije DNA na novim ciljanim lokusima, poput novo-umetnutih pokretnih genetičkih elemenata, umjesto održavanja postojećeg heterokromatina. Stoga je predloženo da nekanonski RdDM služi za regulaciju aktivnosti snažno eksprimiranih elemenata, poput transpozona, koji su obično ciljevi mehanizama post-transkripcijskog utišavanja gena, što će naposljetku rezultirati uspostavom heterokromatina (Matzke i Mosher 2014, Cuerda-Gil i Slotkin 2016, Erdmann i Picard 2020). Nakon što se to početno i utišano stanje uspostavi, može doći do navođenja Pol IV putem interakcije s

proteinima CLSY i SHH1, a kanonski put preuzima dugoročno održavanje utišavanja (Cuerda-Gil i Slotkin 2016).



**Slika 8.** U procesu metilacije DNA posredovane malim molekulama RNA mogu se razlikovati dva osnovna koraka: **(a)** biosinteza malih interferirajućih molekula RNA (siRNA) posredovanjem polimeraze (Pol) IV te **(b)** metilacija DNA *de novo* posredovanjem Pol V. U prvom koraku, interakcijom Pol IV i proteina RDR2 nastaju dvolančane RNA (dsRNA). Protein DCL3 zatim obrađuje dsRNA u siRNA te se one vežu na protein AGO4. U drugom koraku dolazi do pozicioniranja Pol V pomoću proteina SUVH2 i SUVH9, koji vežu prethodno metilirane regije DNA i povezuju se s kompleksom DDR (čine ga proteini DRD1, DMS3 i RDM1). Kompleks DDR navodi Pol V i potiče proizvodnju tzv. Pol V transkriptata koje prepoznaje kompleks AGO4-siRNA i veže komplementarne sekvence. Istovremeno, kompleks AGO4-siRNA veže protein RDM1, koji zauzvrat navodi metiltransferazu DRM2 što dovodi do metilacije DNA *de novo* na homolognim genomskim mjestima. Preuzeto i prilagođeno prema Jagić (2023).

Istraživanje iz 2013. godine (Popova i sur. 2013) bilo je prvo koje je povezalo biljni odgovor na toplinski stres s mehanizmom RdDM. Analizom biljaka sa suprimiranom ekspresijom gena ključnih za metilaciju DNA, otkriveno je da je mehanizam RdDM važan za bazičnu termotoleranciju biljaka. U spomenutom istraživanju autori su proučavali preživljavanje biljaka sa selektivno narušenim komponentama epigenetskog puta nakon izlaganja povišenim temperaturama. Utvrdili su da su biljke s utišanim genima koji kodiraju metiltransferaze DRM1 i DRM2 te CMT3 (engl. *chromomethylase 3*) pokazale manju osjetljivost na visoke temperature u usporedbi s biljkama čiji su geni *DCL3*, *RDR2*, *AGO4* ili *NRPD2* (engl. *nuclear RNA*

*polymerase D2A*) bili utišani. Drugim riječima, ovi rezultati jasno naglašavaju nužnost pravilnog funkcioniranja mehanizma RdDM u okviru termotolerancije biljaka. Nadalje, važno je spomenuti da precizno i učinkovito reguliranje aktivnosti pokretnih genetičkih elemenata tijekom toplinskog stresa također ovisi o pravilnom djelovanju mehanizma RdDM. Naime, istraživanje iz 2011. godine (Ito i sur. 2011) otkrilo je povećanu ekspresiju transkripata retrotranspozona *ONSEN* u biljaka u kojih je narušena biosinteza molekula siRNA. Dodatno, potomstvo biljaka s narušenim mehanizmom RdDM i izloženih povišenim temperaturama, pokazalo je pojačanu transpoziciju retrotranspozona *ONSEN* (Cavrak i sur. 2014). Zanimljivo je primijetiti da je istraživanje iz 2020. godine (Hayashi i sur. 2020) pokazalo veću frekvenciju transpozicije retrotranspozona *ONSEN* u biljaka sa smanjenom ekspresijom proteina Pol IV i RDR2 u usporedbi sa smanjenom ekspresijom proteina Pol V i DRM2. Ovi rezultati sugeriraju da su raniji koraci u mehanizmu RdDM ključni za ispravnu regulaciju aktivnosti retrotranspozona *ONSEN*, čime se naposljetku održava i genomska stabilnost biljke tijekom toplinskog stresa.

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. Biljni materijal

Istraživanja sam provela na modelnoj biljci uročnjak (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.), ekotip Columbia-0. Tijekom istraživanja koristila sam divlji tip te četiri linije uročnjaka s promijenjenom ekspresijom gena *BPM* ili *DMS3*.

1. **Divlji tip** (wt) su biljke uročnjaka u kojima ekspresija gena nije promijenjena te su služile kao kontrola za usporedbu s linijama uročnjaka koje imaju promijenjenu ekspresiju gena *BPM* i *DMS3*.
2. **Linija *oeBPM1* (104)** je transgenična linija uročnjaka s prekomjernom ekspresijom gena *BPM1*. Linija je dobivena ugradnjom transgena *BPM1-GFP* u genom uročnjaka (Škiljaica i sur. 2020). Transgen se nalazi pod kontrolom promotora CaMV 35S (engl. *cauliflower mosaic virus 35S*) čime je omogućena konstitutivna ekspresija proteinskog produkta transgena *BPM1-GFP*.
3. **Linija *amiR-bpm*** je linija uročnjaka u kojoj je korištenjem tzv. amiRNA tehnologije (engl. *artificial microRNA technology*) smanjena ekspresija gena *BPM1*, *4*, *5* i *6* (Lechner i sur. 2011, Tiwari i sur. 2014).
4. **Linija *oeDMS3* (6TV)** je transgenična linija uročnjaka s prekomjernom ekspresijom gena *DMS3*. Linija je dobivena ugradnjom transgena *DMS3-GFP* u genom uročnjaka (Jagić i sur. 2022). Transgen se nalazi pod kontrolom promotora CaMV 35S čime je omogućena konstitutivna ekspresija proteinskog produkta transgena *DMS3-GFP*.
5. **Linija *dms3-1*** je linija uročnjaka s točkastom mutacijom u kodonu na poziciji 339. Zbog mutacije dolazi do promjene aminokiseline te se prilikom translacije ugrađuje glutaminska kiselina umjesto glicina. Nastali proteinski produkt ne može stvarati aktivne dimere čime se narušava funkcionalnost proteina *DMS3* (Kanno i sur. 2008).

S obzirom da je cilj ovog rada bio pratiti i analizirati utjecaj toplinskog stresa i genske pozadine na biljke uročnjaka na morfološkoj, fiziološkoj, biokemijskoj i molekularnoj razini, istraživanje sam provela koristeći dva različita sustava – jedan u zemljanom supstratu, a drugi u sterilnoj hranjivoj podlozi (*in vitro*). Biljke sam uzgajala na zemljanom supstratu kako bih mogla pratiti dugoročni učinak toplinskog stresa te promijenjene ekspresije gena *BPM* i *DMS3* na rast i razvoj biljaka uročnjaka, od stadija klijanaca do stadija sjemenki. Kako bih detaljnije istražila učinak toplinskog stresa te promijenjene ekspresije gena *BPM* i *DMS3* u stadiju klijanaca, biljke sam

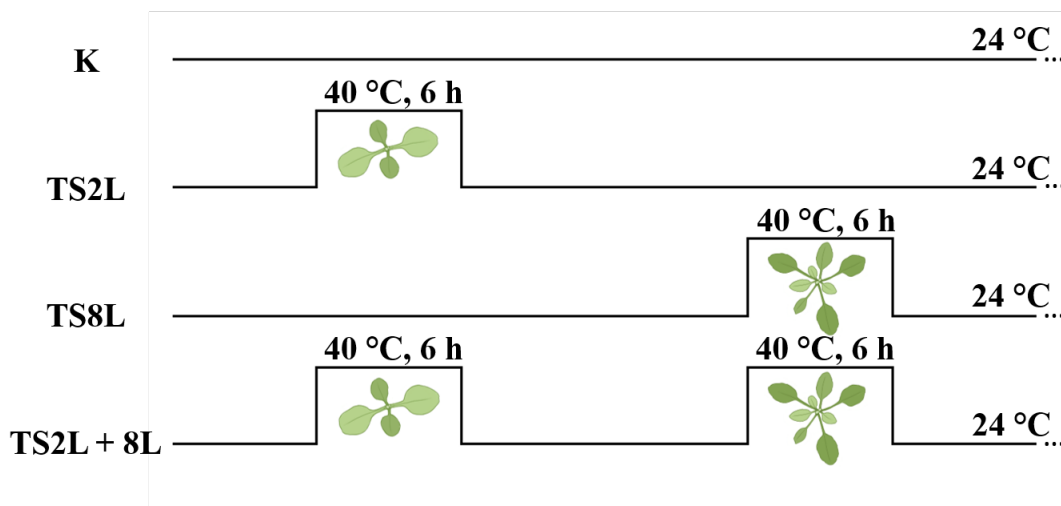
uzgajala na hranjivoj podlozi. Uzgojem na hranjivoj podlozi prikupila sam dovoljno biljnog materijala kako bih mogla odrediti širok spektar fizioloških, biokemijskih i molekularnih parametara, odnosno dobiti detaljniji uvid u učinak toplinskog stresa te promijenjene ekspresije gena *BPM* i *DMS3* na biljke u stadiju klijanaca.

### **3.2. Dugotrajni učinak toplinskog stresa od stadija klijanaca do stadija sjemenki**

Dugotrajni učinak toplinskog stresa, od stadija klijanaca do stadija sjemenki, pratila sam na biljkama uzgajanim na zemljanom supstratu. S obzirom da proteini *BPM* i *DMS3* sudjeluju u brojnim razvojnim procesima, istražila sam kako različite genske pozadine utječu na razvoj biljaka u kontrolnim fiziološkim uvjetima, također od stadija klijanaca do stadija sjemenki. Praćenje rasta biljaka provela sam pomoću sustava za fenotipizaciju biljaka GROWSCREEN Chamber koji se nalazi u laboratoriju za fenotipizaciju biljaka u sklopu znanstveno-istraživačkog centra Jülich (engl. *Jülich Plant Phenotyping Centre*) u Njemačkoj. Sustav GROWSCREEN Chamber sastoji se od dviju komora za rast biljaka u strogo kontroliranim uvjetima. Također, komore su opremljene kamerama koje omogućuju automatizirano praćenje biljaka na dnevnoj bazi. Kamere imaju dva tipa senzora – senzor RGB (engl. *red, green and blue*) koji omogućuje snimanje biljaka i ekstrakciju podataka iz slika pomoću kojih je moguće izračunati različite morfološke parametre te senzor koji omogućuje mjerenje fluorescencije klorofila *a*. S obzirom na to da sustav za fenotipizaciju omogućuje praćenje većeg broja biljaka, sve istraživane linije te divlji tip praćeni su istovremeno.

Za početak, veći broj (~500) sjemenki pojedine linije i divljeg tipa posijala sam u posude sa zemljanim supstratom (Fruhstorfer Erde, Hawita). Kako bih potaknula i ujednačila klijanje, posude sa sjemenkama stratificirala sam na temperaturi od 4 °C tri dana. Nakon završetka stratifikacije, posude sa sjemenkama premjestila sam u sustav GROWSCREEN Chamber u uvjete dugog dana (16 h svjetlosti, 8 h tame) na temperaturu od  $24 \pm 1$  C, intenziteta svjetlosti  $180-220 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , koncentracije  $\text{CO}_2$  400 ppm i vlažnosti zraka 60%. Peti dan rasta u komori, koristeći automatizirani sustav za detekciju klijanaca u sklopu sustava GROWSCREEN Chamber, odabrala sam 80 rastom ujednačenih klijanaca svake linije i divljeg tipa uročnjaka te sam ih presadila u zasebne posude sa zemljanim supstratom. Posude s pojedinačnim klijanacima vratila sam u komoru za uzgoj te ih rasporedila nasumično kako bih smanjila utjecaj drugih čimbenika na tijek pokusa. Pet dana nakon presađivanja, klijanice sam

podijelila u četiri skupine (Slika 9). Prva skupina bila je kontrolna skupina (K) koja je tijekom pokusa rasla na temperaturi od 24 °C, dok su preostale tri skupine bile tretman-skupine, odnosno skupine izložene temperaturi od 40 °C u trajanju od šest sati u različitim razvojnim stadijima. Prvu tretman-skupinu (TS2L) izložila sam povišenoj temperaturi u stadiju s dva prava lista (razvojna faza 1,02; definirana prema Boyes i sur. 2001), drugu tretman-skupinu (TS8L) izložila sam u stadiju s osam pravih listova (razvojna faza 1,08), dok sam treću tretman-skupinu (TS2L+8L) izložila povišenoj temperaturi u razvojnoj fazi 1,02, a zatim ponovno u razvojnoj fazi 1,08. Nakon svakog pojedinog tretmana povišenom temperaturom, biljke sam vratila na temperaturu od 24 °C i pratila ih do stadija sjemenki. Automatizirani sustav u sklopu sustava GROWSCREEN Chamber na dnevnoj bazi vagao je posude s biljkama kako bi se pratila vlažnost zemljanog supstrata. Na temelju tih podataka, biljke sam prema potrebi zalijevala vodovodnom vodom održavajući raspon vlage u supstratu između 40 i 70%. Na taj način isključen je učinak suše prilikom djelovanja povišene temperature. Preostali uvjeti održavani su pri konstantnim vrijednostima tijekom trajanja pokusa – uvjeti dugog dana (16 h svjetlosti, 8 h tame), intenzitet svjetlosti 180-220  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , koncentracija CO<sub>2</sub> 400 ppm i vlažnost zraka 60%.



**Slika 9.** Pokus praćenja učinka toplinskog stresa i genske pozadine na rast i razvoj biljaka uročnjaka (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.) s promijenjenom ekspresijom gena *BPM* i *DMS3*. Biljke su uzgajane na zemljanom supstratu na temperaturi od 24 °C do razvoja dva prava lista u rozeti. U toj fazi podijeljene su u četiri skupine. Kontrolna skupina (K) rasla je tijekom pokusa na 24 °C, dok su tretman-skupine izložene temperaturi od 40 °C tijekom šest sati u različitim razvojnim fazama. Prva tretman-skupina (TS2L) izložena je temperaturi od 40 °C u fazi s dva prava lista, druga tretman-skupina (TS8L) u fazi s osam pravih listova, dok je treća tretman-skupina (TS2L+8L) izložena u obje razvojne faze – s dva i s osam pravih listova. Nakon tretmana sve skupine rasle su na 24 °C do stadija sjemenki. Crtež priredile Mirta Tokić i Sandra Vitko koristeći program Inkscape.



### 3.2.1. Fenotipizacija biljaka

Kako bih istražila učinak toplinskog stresa i genske pozadine na biljke uročnjaka s promijenjenom ekspresijom gena *BPM* i *DMS3* od stadija klijanaca do stadija sjemenki, pratila sam morfološka svojstva te izmjerila fluorescenciju klorofila *a*, biomasu biljaka i sjemenki. Morfološke parametre biljaka pratila sam od 12. do 23. dana uzgoja, izuzevši dane kad su biljke bile tretirane povišenom temperaturom i vikend (Tablica 1). Fluorescenciju klorofila *a* izmjerila sam u dvije vremenske točke – odmah nakon izlaganja povišenoj temperaturi od 40 °C i 48 sati nakon oporavka na temperaturi od 24 °C. Sedam dana nakon zadnjeg izlaganja biljaka povišenoj temperaturi od 40 °C prikupila sam po sedam cijelih biljaka svake linije i skupine kako bi im odredila suhu masu. Također, kako bih odredila utjecaj toplinskog tretmana i genske pozadine na biomasu sjemenki, do stadija sjemena uzgojila sam po tri biljke od svake linije i skupine koje su predstavljale biološke replike. Dozrele sjemenke prikupila sam nakon otprilike dva mjeseca kako bih odredila biomasu. Sve navedene parametre odredila sam u sve tri skupine tretiranih biljaka. Kontrolne biljke analizirane su u istim vremenskim točkama kao i tretirane biljke.

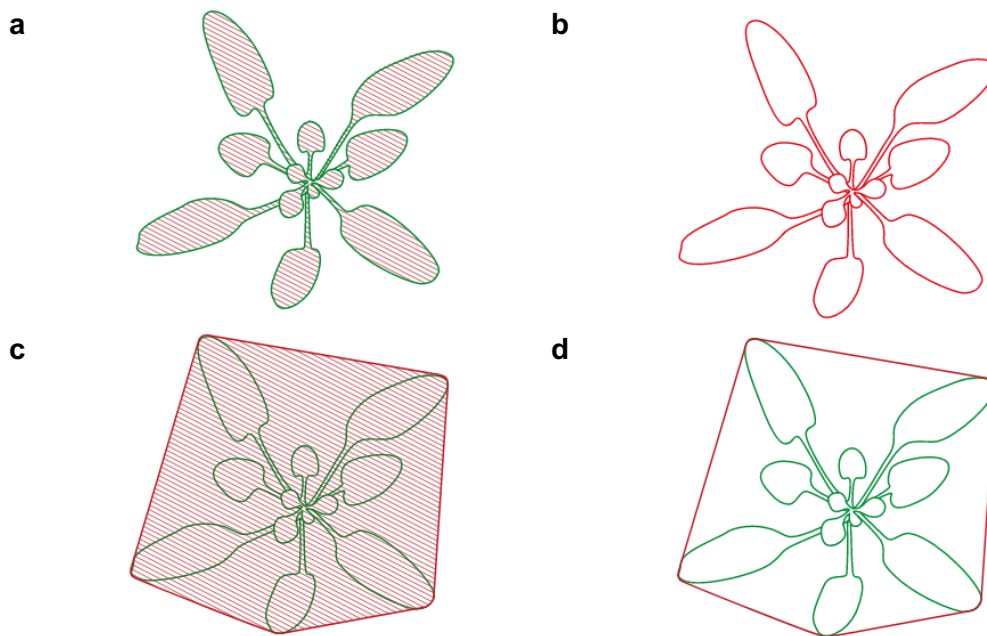
**Tablica 1.** Prikaz mjerenih parametara po danima. Morfološke parametre biljaka i fluorescenciju klorofila *a* pratila sam u pojedinim vremenskim točkama od 12. do 23. dana uzgoja. Biljke su povišenoj temperaturi od 40 °C izložene 13. i/ili 20. dana od početka uzgoja (označeno crvenom bojom). Slovo x označava dane kad nije mjereno niti jedan parametar.

Dani	Mjereni parametri
12.	morfološki parametri
<b>13.</b>	fluorescencija klorofila <i>a</i>
14.	morfološki parametri
15.	morfološki parametri, fluorescencija klorofila <i>a</i>
16.	morfološki parametri
17.	x
18.	x
19.	morfološki parametri
<b>20.</b>	fluorescencija klorofila <i>a</i>
21.	morfološki parametri
22.	morfološki parametri, fluorescencija klorofila <i>a</i>
23.	morfološki parametri
24.	x
25.	x
26.	x
27.	prikupljanje i sušenje biljaka za određivanje suhe mase
28.	x
29.	određivanje suhe mase biljaka
...	...
nakon dva mjeseca	prikupljanje sjemenki, određivanje biomase

### 3.2.1.1. Određivanje morfoloških parametara

Pratila sam i odredila sljedeće morfološke parametre, pri čemu sam za svaki parametar odredila srednju vrijednost najmanje deset bioloških replika (Slika 10):

1. Površinu rozete [ $\text{mm}^2$ ];
2. Opseg rozete [ $\text{mm}$ ];
3. Površinu konveksne ljuške (engl. *convex hull area*) [ $\text{mm}^2$ ] – parametar opisuje površinu najmanjeg konveksnog poligona koji obuhvaća sve listove rozete;
4. Opseg konveksne ljuške (engl. *convex hull perimeter*) [ $\text{mm}$ ] – parametar opisuje opseg najmanjeg konveksnog poligona koji obuhvaća sve listove rozete.



**Slika 10.** Prikaz praćenih morfoloških parametara – (a) površina i (b) opseg rozete, te (c) površina i (d) opseg konveksne ljuške. Crvene linije predstavljaju mjerenu površinu, odnosno opseg. Crteže priredila Mirta Tokić koristeći program Inkscape.

### 3.2.1.2. Mjerenje fluorescencije klorofila *a*

Prije mjerenja fluorescencije klorofila *a*, biljke su prilagođene na uvjete tame gašenjem lampi u sustavu GROWSCREEN Chamber u trajanju od 30 minuta pri temperaturi od 24 °C. Nakon 30 minuta, izmjerila sam minimalnu razinu fluorescencije ( $F_0$ ), a zatim su biljke osvijetljene pulsom jake svjetlosti ( $5000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) u trajanju od 0,8 sekundi. To je rezultiralo maksimalnim prinosom fluorescencije ( $F_m$ ) (Maxwell i Johnson 2000, Küpper i sur. 2019).

Koristeći izmjerene parametre  $F_0$  i  $F_m$ , izračunala sam parametar koji opisuje maksimalni kvantni prinos PSII ( $F_v/F_m$ ) prema formuli:

$$F_v/F_m = \frac{F_m - F_0}{F_m}$$

Dobivene vrijednosti izrazila sam kao srednju vrijednost najmanje pet bioloških replika.

### 3.2.1.3. Određivanje biomase biljaka i sjemenki

Sedam dana nakon zadnjeg izlaganja biljaka povišenoj temperaturi od 40 °C prikupila sam po sedam cijelih biljaka svake linije i skupine. Odmah nakon prikupljanja, biljke sam nježno isprala u vodovodnoj vodi kako bih uklonila zaostale čestice zemlje na korijenju. Zatim sam biljke inkubirala 48 sati na temperaturi od 70 °C te ih izvagala kako bih odredila suhu masu. Svaka biljka predstavljala je jednu biološku repliku, a dobivene vrijednosti izrazila sam kao srednju vrijednost šest do sedam bioloških replika.

Kako bih odredila utjecaj toplinskog tretmana i genske pozadine na biomasu sjemenki, do stadija sjemena uzgojila sam po tri biljke od svake linije i skupine koje su predstavljale biološke replike. Dozrele sjemenke prikupila sam nakon otprilike dva mjeseca (Tablica 1). Sjemenke uočnjaka relativno su malene i lagane – otprilike 1000 sjemenki ima masu od 20 mg. Zbog toga sam za određivanje biomase sjemenki prvo izvagala prazne mikroeprovete ( $m_1$ ) koristeći preciznu analitičku vagu očitavanja 0,0001 g (Sartorius BL 120S, Hrvatska). Zatim sam u svaku mikroeprovetu dodala točno određen broj sjemenki (250-350) te ponovno izvagala mikroeprovete ( $m_2$ ). Biomasu 100 sjemenki za pojedinu biološku repliku izračunala sam prema formuli:

$$\text{Biomasa 100 sjemenki} = \frac{m_2 - m_1}{\text{broj sjemenki}} \times 100 \text{ [mg]}$$

Dobivene vrijednosti izrazila sam kao srednju vrijednost tri biološke replike.

### 3.2.1.4. Test klijavosti sjemenki

Kako bih odredila utjecaj toplinskog tretmana i genske pozadine na klijavost sjemenki, provela sam test klijavosti. Za početak, u mikroeproveta volumena 2 mL izvagala sam 4,5-5 mg sjemenki po uzorku koristeći preciznu analitičku vagu. Za svaku liniju i skupinu pripremila sam tri mikroeprovete sa sjemenkama, pri čemu je mikroeproveta sadržavala sjemenke prikupljene

od jedne biljke, tj. predstavljala je jednu biološku repliku. Po završetku vaganja, sjemenke sam inkubirala jednu minutu u 70% (v/v) etanolu (LabExpert, Slovenija). Nakon toga sam ih kratko isprala u sterilnoj destiliranoj vodi (dH<sub>2</sub>O), te ih potom sterilizirala deset minuta u otopini koja je sadržavala 0,01% (v/v) Mucosal™ (Sigma) u 1% (w/v) Izosan® G (Pliva, Hrvatska). Nakon deset minuta, sjemenke sam isprala pet puta u sterilnoj dH<sub>2</sub>O.

Sjemenke sam položila na krutu podlogu koja je sadržavala 0,9% (w/v) agara (Sigma). Prije korištenja, otopinu agara sterilizirala sam u autoklavu (AMB240N, Astel Scientific, Velika Britanija) pri temperaturi od 121 °C i tlaku od 0,15 MPa u trajanju od 18 minuta. Nakon sterilizacije, otopinu sam prelila u sterilne Petrijeve zdjelice promjera devet cm te pustila da se otopina ohladi na sobnu temperaturu. Upotrijebivši mikropipetu, položila sam otprilike 50 sjemenki po jednoj sterilnoj zdjelici te zdjelice zatvorila parafinskom trakom. Sve navedene korake provela sam u sterilnim uvjetima u kabinetu s horizontalnim laminarnim strujanjem zraka (Heraeus, Njemačka). Sjemenke u zatvorenim zdjelicama stratificirala sam tri dana. Po završetku stratifikacije, zdjelice sa sjemenkama prebacila sam u komoru za uzgoj biljaka u uvjete dugog dana (16 h svjetlosti, 8 h tame) na temperaturu od  $24 \pm 1$  °C i intenziteta svjetlosti 120-130  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Petrijeve zdjelice rasporedila sam nasumično kako bih smanjila utjecaj drugih čimbenika na tijek pokusa. Klijanje sam pratila tijekom pet dana od dana stavljanja zdjelica u komoru te sam svakodnevno bilježila broj prokljalih sjemenki u pojedinoj zdjelici. Za svaku liniju i skupinu izračunala sam udio prokljalih sjemenki s obzirom na ukupni broj nasadenih sjemenki (50) i rezultat izrazila kao postotak. Postupak sam ponovila za svaki dan praćenja klijanja i svaku biološku repliku, a konačni rezultat izrazila sam kao srednju vrijednost tri biološke replike po pojedinom danu. Jedna Petrijeva zdjelica predstavljala je jednu biološku repliku, odnosno sjemenke prikupljene od jedne biljke.

### **3.3. Učinak toplinskog stresa na biljke u stadiju klijanaca**

Učinak toplinskog stresa i genske pozadine na istraživane linije i divlji tip uročnjaka u stadiju klijanaca analizirala sam u sustavu *in vitro*. Uzevši u obzir broj istraživanih linija i broj potrebnih bioloških replika, istraživanje sam podijelila u dva dijela te sam zasebno postavila pokus za linije s promijenjenom ekspresijom gena *BPM*, odnosno za linije s promijenjenom ekspresijom gena *DMS3*. Pri tome sam biljke divljeg tipa koristila u oba dijela pokusa kao kontrolu.

Za početak, na preciznoj analitičkoj vagi izvagala sam 3,5 mg sjemenki u mikroepreveti volumena 2 mL. Za svaku liniju, odnosno divlji tip, pripremila sam ukupno 20 mikroepreveta sa sjemenkama. Po završetku vaganja, sjemenke sam sterilizirala prema postupku opisanom u poglavlju 3.2.1.4. Test klijavosti sjemenki. Nakon zadnjeg ispiranja sjemenki, uklonila sam svu dH<sub>2</sub>O. Zatim sam u mikroeprevete dodala po 1 mL tekuće hranjive podloge. Podloga (pH 5,7) je sadržavala smjesu makro- i mikroelemenata (Sigma) čije koncentracije su definirane prema Murashige i Skoog (1962), 2% (w/v) saharozu (Lach-Ner, Češka) i 2,5 mmol L<sup>-1</sup> kalijeve soli 2-(N-morfolino)etansulfonske kiseline (MES-kalijeve sol, Sigma). Prije korištenja, tekuću hranjivu podlogu sterilizirala sam u autoklavu (121 °C, 0,15 MPa, 18 minuta). Upotrijebivši mikropipetu, sjemenke sam zajedno s tekućom podlogom prebacila u sterilne Petrijeve zdjelice promjera šest cm te ih zatvorila parafinskom trakom. Sve navedene korake provela sam u sterilnim uvjetima koristeći kabinet s horizontalnim laminarnim strujanjem zraka. Sjemenke u zatvorenim zdjelicama sam stratificirala tri dana, a po završetku stratifikacije zdjelice sam prebacila u komoru za uzgoj biljaka. Postupak stratifikacije te uvjeti uzgoja detaljno su opisani u poglavlju 3.2.1.4. Test klijavosti sjemenki.

Klijanje sam pratila tijekom 12 dana od dana stavljanja zdjelica u komoru te sam tijekom tog perioda dva puta dodala po 1 mL sterilne hranjive podloge u svaku zdjelicu sa sjemenkama. Podlogu sam dodala u sterilnim uvjetima. Dvanaestog dana rasta, kad su klijanci bili u razvojnoj fazi 1,02, zdjelice s klijancima podijelila sam u dvije skupine – kontrolnu (K) i tretman (TS) (Slika 11). Kontrolna skupina ostala je u komori za uzgoj biljaka na temperaturi od 24 °C, dok sam skupinu predviđenu za tretman prebacila u inkubator (Hood TH 30, Edmund Bühler, Njemačka) prethodno zagrijan na temperaturu od 37 °C. Nakon šest sati izlaganja povišenoj temperaturi, tretirane klijance vratila sam u komoru za uzgoj. Jednu polovinu od ukupnog broja zdjelica s kontrolnim i tretiranim klijancima upotrijebila sam odmah – dio tkiva odvojila sam za mjerenje fluorescencije klorofila *a*, a dio sam prikupila i pohranila u ledenicu na -80 °C za daljnje fiziološke, biokemijske i molekularne analize. Iste korake ponovila sam s preostalim zdjelicama, ali nakon 24-satnog oporavka na 24 °C u komori za uzgoj. Sav biljni materijal sam prije prikupljanja i mjerenja isprala u dH<sub>2</sub>O kako bih uklonila tekuću hranjivu podlogu.



**Slika 11.** Pokus praćenja učinka toplinskog stresa i genske pozadine na klijance uročnjaka (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.) s promijenjenom ekspresijom gena *BPM* i *DMS3*. Biljke su uzgajane *in vitro* na temperaturi od 24 °C do razvoja dva prava lista. U toj fazi podijeljene su u dvije skupine. Kontrolna skupina (K) rasla je tijekom pokusa na 24 °C, dok je tretman-skupina (TS) izložena temperaturi od 37 °C tijekom šest sati. Fiziološki, biokemijski i molekularni parametri analizirani su u dvije vremenske točke – odmah nakon izlaganja (1.) i 24 sata nakon oporavka na temperaturi od 24 °C (2.). Kontrolna skupina analizirana je u istim vremenskim točkama kao i tretman-skupina. Crtež priredile Mirta Tokić i Sandra Vitko koristeći program Inkscape.

### 3.3.1. Određivanje fizioloških parametara

#### 3.3.1.1. Mjerenje polifaznog rasta fluorescencije klorofila *a* JIP-testom

Fotosintetsku učinkovitost klijanaca uzgojenih *in vitro* odredila sam primjenom JIP-testa koji se temelji na mjerenju polifaznog rasta fluorescencije klorofila *a* u biljaka prilagođenih na uvjete tame (Strasser i sur. 2000). Za indukciju i mjerenje fluorescencije koristila sam fluorometar FluorPen FP 100 (Photon Systems Instruments, Češka).

Prije početka mjerenja fluorescencije grupirala sam ~50 klijanaca pojedine linije i skupine te je takva grupa predstavljala jednu biološku repliku. Klijance sam zatim smjestila na pladanj obložen s nekoliko slojeva vlažnog filter papira čime sam osigurala da tijekom prilagodbe na uvjete tame ne dođe do njihovog isušivanja. Klijance sam držala 30 minuta u tami pri sobnoj temperaturi (24 °C). Za indukciju polifaznog rasta fluorescencije, klijance sam osvjetlila pulsom plave svjetlosti koji ima maksimum emisijske svjetlosti pri valnoj duljini od 455 nm i gustoću toka fotona od 3000  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Fluorometar FluorPen omogućava bilježenje brzih promjena intenziteta fluorescencije klorofila *a* nakon 50  $\mu\text{s}$  ( $F_0$ ), 2 ms ( $F_T$ ) i 30 ms ( $F_1$ ) te nakon dostizanja maksimalnog intenziteta fluorescencije ( $F_m$ ). Pomoću računalnog programa FluorPen, očitala sam i obradila parametre koji opisuju glavna funkcionalna svojstva PSII, a na temelju kojih sam mogla izvesti zaključke o fotosintetskoj učinkovitosti klijanaca (Tablica 2). Jedna biološka replika predstavljala je grupu od ~50 klijanaca, a dobivene vrijednosti izrazila sam kao srednju vrijednost pet bioloških replika.

**Tablica 2.** Izmjereni i izračunati fotosintetski parametri dobiveni primjenom JIP-testa, odnosno mjerenjem polifaznog rasta fluorescencije klorofila *a*. Popis je preuzet i prilagođen prema Strasser i sur. (2000).

Parametar	Opis
$F_0$	intenzitet fluorescencije nakon 50 $\mu$ s (korak O)
$F_J$	intenzitet fluorescencije nakon 2 ms (korak J)
$F_I$	intenzitet fluorescencije nakon 30 ms (korak I)
$F_m$	maksimalni intenzitet fluorescencije (korak P)
$F_v$	maksimalna varijabilna fluorescencija
$F_v/F_m$	maksimalni kvantni prinos PSII
$V_j$	varijabilna fluorescencija između koraka O i J
$M_0$	ukupna brzina zatvaranja reakcijskih centara
$RC/CS_o = F_v/F_m \times (V_j/M_0) \times F_0$	gustoća aktivnih reakcijskih centara po osvijetljenoj površini lista
$ABS/RC = M_0 \times (1/V_j) \times [1/(F_v/F_m)]$	apsorpcija svjetlosti (fotona) po aktivnom reakcijskom centru
$TR_0/RC = M_0 \times (1/V_j)$	protok uhvaćenih fotona po aktivnom reakcijskom centru
$ET_0/RC = M_0 \times (1/V_j) \times (1-V_j)$	prijenos elektrona po aktivnom reakcijskom centru
$DI_0/RC = (ABS/RC) - (TR_0/RC)$	rasipanje energije po aktivnom reakcijskom centru
$PI_{ABS} = (RC/ABS) \times (TR_0/DI_0) \times [ET_0/(TR_0-ET_0)]$	indeks fotosintetske učinkovitosti

### 3.3.1.2. Određivanje sadržaja fotosintetskih pigmenata

Sadržaj fotosintetskih pigmenata – klorofila *a*, klorofila *b* i ukupnih karotenoida, odredila sam prema metodi Wellburn (1994). Ekstrakciju pigmenata provela sam u rashlađenoj prostoriji s prigušenom rasvjetom kako bi se smanjila mogućnost degradacije pigmenata.

Biljni ekstrakt pripremila sam u hladnom tarioniku homogenizirajući otprilike 25 klijanaca, odnosno 50 mg svježeg biljnog tkiva u 1000  $\mu$ L ohlađenog 80% (v/v) acetona (Kemika, Hrvatska) uz dodatak oko 20 mg kalcijevog karbonata (Gram-mol, Hrvatska). Homogenat sam



prelila u smeđe mikroeprovete volumena 1,5 mL, kratko promiješala (~10 s) na vibracijskoj miješalici (Vibromix 204 EV, Tehtnica, Slovenija) te potom centrifugirala (Eppendorf, Njemačka) deset minuta na 5000 g pri temperaturi od 4 °C. Dobiveni supernatant prelila sam u nove smeđe mikroeprovete. Na talog sam dodala 500 µL ohlađenog acetona te ponovila miješanje i centrifugiranje. Dobiveni supernatant spojila sam s prethodno dobivenim supernatantom. Volumen svih uzoraka ujednačila sam dopunjavanjem do volumena 1,5 mL ohlađenim acetonom. Apsorbanciju uzoraka izmjerila sam spektrofotometrijski (UV-VIS spektrofotometar Specord 40, Analytic Jena, Njemačka) pri valnim duljinama od 470, 646 i 663 nm koristeći staklene kivete. Za slijepu probu koristila sam 1,5 mL ohlađenog acetona. Koncentraciju pigmenata, izraženu kao mikrogram pigmenta po mililitru ekstrakcijskog otapala [ $\mu\text{g mL}^{-1}$ ], izračunala sam primjenjujući formule opisane u Wellburn (1994):

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

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

$$c_{cars} = \frac{(1000 A_{470} - 3,27 c_a - 104 c_b)}{198}$$

$c_a$ ,  $c_b$ ,  $c_{cars}$  – koncentracija klorofila *a*, klorofila *b*, odnosno karotenoida;

$A_{470}$ ,  $A_{646}$ ,  $A_{663}$  – apsorbancija izmjerena pri valnim duljinama od 470, 646, ili 663 nm.

Iz dobivenih koncentracija, izračunala sam sadržaj pojedinog pigmenta, izražen kao mikrogram pigmenta po masi svježeg tkiva [ $\mu\text{g g}^{-1}$  svježe mase], prema formuli:

$$\text{Sadržaj pigmenta} = \frac{c_{\text{pigment}} \times V_{\text{eks.}}}{m}$$

$c_{\text{pigment}}$  – prethodno izračunata koncentracija klorofila *a*, klorofila *b* ili karotenoida [ $\mu\text{g mL}^{-1}$ ];

$V_{\text{eks.}}$  – volumen ekstrakcijskog otapala (1,5 mL);

$m$  – masa tkiva [g].

Dobivene vrijednosti izrazila sam kao srednju vrijednost pet bioloških replika. Jedna biološka replika predstavljala je otprilike 50 mg svježe mase klijanaca pojedine linije i skupine.

### 3.3.2. Određivanje biokemijskih i molekularnih parametara

#### 3.3.2.1. Određivanje sadržaja vodikovog peroksida

Sadržaj  $H_2O_2$  izmjerila sam prema metodi opisanoj u Máta i Hideg (2017) koja se temelji na oksidaciji dvovalentnih željezovih iona ( $Fe^{2+}$ ) u trovalentne ione ( $Fe^{3+}$ ) u prisustvu  $H_2O_2$  i boje ksilenol narančasto. Ioni  $Fe^{3+}$  stvaraju kompleks s bojom ksilenol narančasto što se može mjeriti spektrofotometrijski pri valnim duljinama raspona 550 do 600 nm.

Biljni ekstrakt pripremila sam u hladnom tarioniku homogenizirajući otprilike 50 mg svježeg tkiva u 500  $\mu$ L ohlađenog 70% (v/v) etanola. Homogenat sam centrifugirala deset minuta na 15000 g pri temperaturi od 4 °C, a dobiveni ekstrakt prelila sam u novu mikroeprevetu te ga do mjerenja čuvala na ledu. Za mjerenje apsorbancije  $H_2O_2$  u uzorcima, koristila sam reagens FOX koji se sastojao od 124  $\mu$ mol  $L^{-1}$  boje ksilenol narančasto (Sigma), 99 mmol  $L^{-1}$  sorbitola (Sigma) te 0,248 mmol  $L^{-1}$  amonijeva željezo (II) sulfat heksahidrata (Kemika, Hrvatska) prethodno pripremljenog u sumpornoj kiselini koncentracije 2,5 mol  $L^{-1}$  (Kemika, Hrvatska). U novu mikroeprevetu dodala sam 1000  $\mu$ L reagensa FOX i po 50  $\mu$ L pojedinog uzorka. Dobivenu otopinu promiješala sam kratko na vibracijskoj miješalici, inkubirala 15 minuta na sobnoj temperaturi te spektrofotometrijski izmjerila apsorbanciju u plastičnoj kiveti pri valnoj duljini od 560 nm. Za slijepu probu koristila sam 50  $\mu$ L 70% (v/v) etanola. Koncentraciju  $H_2O_2$  izračunala sam pomoću jednadžbe pravca linearnog dijela kalibracijske krivulje. Za izradu kalibracijske krivulje pripremila sam niz poznatih koncentracija  $H_2O_2$  (1,82-72,8  $\mu$ mol  $L^{-1}$ , Lach-Ner, Češka). Rezultate sam izrazila kao srednju vrijednost pet bioloških replika, u jedinicama nmol  $H_2O_2$  po gramu svježe mase [nmol  $g^{-1}$  svježe mase]. Jedna biološka replika predstavljala je otprilike 50 mg svježe mase klijanaca pojedine linije i skupine.

#### 3.3.2.2. Određivanje stupnja lipidne peroksidacije

Stupanj lipidne peroksidacije odredila sam mjerenjem sadržaja MDA, spoja koji nastaje prilikom peroksidacije nezasićenih masnih kiselina, a služi kao indikator stupnja oštećenja membranskih lipida (Hodges i sur. 1999).

Otprilike 200 mg svježeg tkiva homogenizirala sam u hladom tarioniku u 2000  $\mu$ L hladne 0,1% (w/v) trikloroetene kiseline (TCA, Acros Organics) uz dodatak oko 20 mg polivinilpolipirrolidona (PVPP, Sigma). Homogenat sam centrifugirala deset minuta na 15000 g pri temperaturi od 4 °C, a dobiveni ekstrakt prelila sam u novu mikroeprevetu te ga do mjerenja

čuvala na ledu. Za mjerenje MDA, pripremila sam dva seta mikroeproveta s navojnim čepom. U prvi set dodala sam 750  $\mu\text{L}$  0,5% (w/v) tiobarbiturne kiseline (TBA, Sigma) pripremljene u 20% (w/v) TCA i 250  $\mu\text{L}$  pojedinog uzorka. U drugi set dodala sam 750  $\mu\text{L}$  20% (w/v) TCA i 250  $\mu\text{L}$  pojedinog uzorka. Dobivene otopine promiješala sam kratko na vibracijskoj miješalici i inkubirala u termobloku (AccuBlock, Labnet, SAD) 30 minuta pri temperaturi od 100 °C, nakon čega sam reakciju zaustavila naglim hlađenjem uzoraka na ledu. Uzorke sam nakon hlađenja centrifugirala pet minuta na 15000 g pri temperaturi od 4 °C, odvojila supernatant u nove mikroeprovete, a taloge bacila. Apsorbanciju uzoraka izmjerila sam spektrofotometrijski pri valnim duljinama od 440, 532 i 600 nm koristeći plastične kivete. Za slijepe probe koristila sam 250  $\mu\text{L}$  0,1% (w/v) TCA. Produkt reakcije TBA i MDA ima apsorpcijski maksimum pri valnoj duljini od 532 nm. Međutim, određeni flavonoidi (npr. pigmenti antocijani) u kiselim uvjetima također imaju maksimum pri spomenutoj valnoj duljini. Za korekciju konačnog rezultata uzela sam u obzir interferenciju uzrokovanu pigmentima te sam pri valnim duljinama od 532 i 600 nm izmjerila apsorbanciju reakcijske smjese bez TBA. Također, zbog moguće interferencije uzrokovane prisutnošću ugljikohidrata, izmjerila sam apsorbanciju reakcijske smjese s TBA pri 440 nm. Temeljem svega navedenog, stupanj lipidne peroksidacije u pojedinom uzorku izračunala sam primjenjujući formule opisane u Hodges i sur. (1999):

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

$$B = [A_{440+TBA} - A_{600+TBA}] \times 0,0571$$

$$\text{Stupanj lipidne peroksidacije} = \frac{(A-B)}{\epsilon \times l} \times \frac{V_{r.s.} \times V_{eks.}}{V_{uz.} \times m} \times 10^6 \text{ [nmol MDA g}^{-1}\text{ svježe mase]}$$

$A_{440+TBA}$ ,  $A_{532+TBA}$ ,  $A_{600+TBA}$  – apsorbancija reakcijske smjese koja sadrži TBA, izmjerena pri valnim duljinama od 440, 532 ili 600 nm;

$A_{440-TBA}$ ,  $A_{532-TBA}$ ,  $A_{600-TBA}$  – apsorbancija reakcijske smjese koja ne sadrži TBA, izmjerena pri valnim duljinama od 440, 532 ili 600 nm;

0,0571 – omjer molarnih apsorpcijskih (ekstinkcijskih) koeficijenta saharoze (koncentracija 1-10 mol L<sup>-1</sup>) pri valnim duljinama od 532 i 440 nm;

$\epsilon$  – molarni apsorpcijski koeficijent MDA (157000 mol L<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>);

$l$  – duljina optičkog puta (1 cm);

$V_{r.s.}$  – volumen reakcijske smjese (1000  $\mu\text{L}$ );

$V_{eks.}$  – volumen ekstrakcijskog pufera (2000  $\mu\text{L}$ );

$V_{uz.}$  – volumen uzorka (250  $\mu\text{L}$ );

$m$  – masa tkiva [g].

Dobivene vrijednosti pomnožila sam s 1000000 kako bih rezultat izrazila kao nmol MDA po gramu svježe mase [ $\text{g}^{-1}$  svježe mase], a svaki rezultat je srednja vrijednost pet bioloških replika. Jedna biološka replika predstavljala je otprilike 200 mg svježe mase klijanaca pojedine linije i skupine.

### 3.3.2.3. Određivanje sadržaja prolina

Sadržaj prolina odredila sam prema metodi opisanoj u Bates i sur. (1973), a koja se temelji na reakciji ninhidrina s prolinom u kiselim uvjetima i pri visokoj temperaturi. Nastali produkt ima apsorpcijski maksimum pri 520 nm.

Za određivanje prolina koristila sam ekstrakte pripremljene u 0,1% (w/v) TCA koje sam koristila i za mjerenja sadržaja MDA te sam stoga postupak ekstrakcije opisala u Poglavlju 3.3.2.2. Za mjerenje prolina, u mikroeprovete s navojnim čepom dodala sam po 400  $\mu\text{L}$  pojedinog ekstrakta, ledene octene kiseline (Gram-mol, Hrvatska) i kiselog ninhidrina koji se sastojao od 0,14 mol  $\text{L}^{-1}$  ninhidrina (Tokyo Chemical Industry) pripremljenog u smjesi od 18 mL ledene octene kiseline i 12 mL 6 mol  $\text{L}^{-1}$  fosforne kiseline (Carlo Erba Reagents, Njemačka). Reakcijsku smjesu sam kratko promiješala na vibracijskoj miješalici i inkubirala u termobloku jedan sat pri temperaturi od 100 °C, nakon čega sam reakciju zaustavila naglim hlađenjem uzoraka na ledu. Potom sam u mikroeprovete dodala 1 mL toluena (Kemika, Hrvatska), kratko promiješala smjesu na vibracijskoj miješalici i pustila uzorke da odstoje otprilike deset minuta na sobnoj temperaturi kako bi došlo do odvajanja gornje – toluenske, i donje – vodene faze. Kad su se faze odvojile, pipetom sam prikupila gornju fazu i prenijela ju u staklenu kivetu te izmjerila apsorbciju pri valnoj duljini od 520 nm. Za slijepu probu sam koristila 400  $\mu\text{L}$  0,1% (w/v) TCA. Sadržaj prolina izračunala sam pomoću jednadžbe pravca dobivene iz linearnog dijela kalibracijske krivulje. Za izradu kalibracijske krivulje pripremila sam niz poznatih koncentracija L-prolina (1-500  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , Sigma). Rezultate sam izrazila kao srednju vrijednost pet bioloških replika, u jedinicama  $\mu\text{mol}$  prolina po gramu svježe mase [ $\mu\text{mol g}^{-1}$  svježe mase]. Jedna biološka replika predstavljala je otprilike 200 mg svježe mase klijanaca pojedine linije i skupine.

#### 3.3.2.4. Ekstrakcija proteina

Za mjerenje aktivnosti antioksidacijskih enzima, ukupne topive proteine ekstrahirala sam u puferu koji se sastojao od 0,1 mmol L<sup>-1</sup> etilendiamintetraoctene kiseline (EDTA) u 100 mmol L<sup>-1</sup> kalij-fosfatnog pufera, pH vrijednosti 7,0. Ekstrakcijski pufer pripremila sam miješanjem 6,15 mL 1 mol L<sup>-1</sup> dikalij hidrogen fosfata (Scharlau, Španjolska), 3,85 mL 1 mol L<sup>-1</sup> kalij dihidrogen fosfata (Kemika, Hrvatska) i 1 mL 10 mmol L<sup>-1</sup> EDTA (Kemika, Hrvatska). Dobiveni volumen nadopunila sam s dH<sub>2</sub>O do 100 mL. Biljno tkivo usitnila sam u hladnom tarioniku uz dodatak oko 15 mg PVPP-a te homogenizirala u 1500 µL hladnog ekstrakcijskog pufera. Dobiveni homogenat centrifugirala sam 30 minuta na 20000 g pri temperaturi od 4 °C. Nakon centrifugiranja, supernatant sam odvojila u novu mikroepuvetu i pohranila na -20 °C za daljnje analize. Za pojedinu liniju i skupinu pripremila sam pet bioloških replika te je jedna biološka replika predstavljala otprilike 150 mg svježe mase klijanaca.

Za analizu ekspresije proteina metodom imunodetekcije, ukupne topive proteine ekstrahirala sam u puferu Tris-HCl, pH vrijednosti 8,0 (Staples i Stahmann 1964). Pufer je sadržavao 0,1 mol L<sup>-1</sup> Tris (Sigma), 0,5 mol L<sup>-1</sup> saharoze, 6,5 mmol L<sup>-1</sup> ditiotreitola (DTT, Sigma) i 8,25 mmol L<sup>-1</sup> cistein-HCl (Sigma). Biljno tkivo homogenizirala sam u hladnom tarioniku uz dodatak oko 5 mg PVPP-a i 500 µL hladnog ekstrakcijskog pufera. Dobiveni homogenat centrifugirala sam 30 minuta na 20000 g pri temperaturi od 4 °C. Nakon centrifugiranja, supernatant sam odlila u novu mikroepuvetu i pohranila u ledenicu na -20 °C za daljnje analize. Za pojedinu liniju i skupinu pripremila sam tri biološke replike te je jedna biološka replika predstavljala otprilike 50 mg svježe mase klijanaca.

#### 3.3.2.5. Mjerenje koncentracije ukupnih topivih proteina

Koncentraciju proteina koje sam ekstrahirala u kalij-fosfatnom puferu i puferu Tris-HCl odredila sam metodom po Bradfordu (Bradford 1976). Metoda se temelji na vezanju boje CBB (engl. *coomassie brilliant blue*) za proteine, pri čemu nastaje promjena boje koja se mjeri spektrofotometrijski pri valnoj duljini od 595 nm.

Prvo sam pripremila matičnu otopinu za koju sam otopila 350 mg boje CBB G-250 (Sigma) u 100 mL 96% etanola te dodala 200 mL 88% fosforne kiseline. Zatim sam pripremila radnu otopinu boje koja se sastojala od 425 mL dH<sub>2</sub>O, 15 mL 96% etanola, 30 mL 88% fosforne kiseline i 30 mL matične otopine boje. Za mjerenje koncentracije proteina, u mikroepuvete

sam dodala 1000  $\mu\text{L}$  radne otopine i 50  $\mu\text{L}$  pojedinog uzorka. Smjesu sam kratko promiješala na vibracijskoj miješalici te ju inkubirala deset minuta na sobnoj temperaturi. Apsorbanciju uzoraka izmjerila sam u plastičnim kivetama pri valnoj duljini od 595 nm. Za svaki uzorak pripremila sam dvije tehničke replike, a za izračun koncentracije proteina koristila sam srednju vrijednost njihovih apsorbancija. Za slijepu probu koristila sam 50  $\mu\text{L}$  kalij-fosfatnog pufera, odnosno pufera Tris-HCl. Koncentraciju proteina izračunala sam pomoću jednadžbe pravca dobivene iz linearnog dijela kalibracijske krivulje. Za izradu kalibracijske krivulje pripremila sam niz poznatih koncentracija (0,1-0,8  $\text{mg mL}^{-1}$ ) albumina iz goveđeg seruma (BSA, Sigma). Rezultate sam izrazila u miligramima proteina po mililitru ekstrakcijskog pufera [ $\text{mg mL}^{-1}$ ].

### 3.3.2.6. Mjerenje aktivnosti antioksidacijskih enzima

#### *Mjerenje aktivnosti G-POD*

Aktivnost G-POD (EC 1.11.1.7) izmjerila sam prema metodi opisanoj u Maehly i Chance (1954). Metoda se temelji na spektrofotometrijskom mjerenju nastanka tetragvajakola, produkta koji nastaje oksidacijom gvajakola. Spomenutu reakciju kataliziraju peroksidaze prilikom čega gvajakol služi kao donor elektrona.

U plastičnu kivetu dodala sam 980  $\mu\text{L}$  reakcijske smjese koja se sastojala od 50  $\text{mmol L}^{-1}$  kalij-fosfatnog pufera (pH 7,0), 18  $\text{mmol L}^{-1}$  gvajakola (Sigma) i 4,5  $\text{mmol L}^{-1}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ . Potom sam u reakcijsku smjesu dodala 20  $\mu\text{L}$  proteinskog ekstrakta (Poglavlje 3.3.2.4.), kratko promiješala otopinu te spektrofotometrijski mjerila promjenu apsorbancije pri valnoj duljini od 470 nm svakih 15 sekundi tijekom tri minute. Za slijepu probu koristila sam 20  $\mu\text{L}$  ekstrakcijskog pufera (0,1  $\text{mmol L}^{-1}$  EDTA u 100  $\text{mmol L}^{-1}$  kalij-fosfatnom puferu, pH 7,0). Aktivnost G-POD u uzorcima izračunala sam pomoću formule:

$$\text{G-POD} = \frac{\Delta A_{s.v.} \times 4 \times V_{r.s.}}{V_{uz.} \times \varepsilon \times l \times \gamma} [\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}_{\text{prot.}}^{-1}]$$

$\Delta A_{s.v.}$  – srednja vrijednost promjene apsorbancije u 15 sekundi;

4 – faktor korekcije, za izražavanje rezultata po minuti;

$V_{r.s.}$  – volumen reakcijske smjese (1000  $\mu\text{L}$ );

$V_{uz.}$  – volumen uzorka (20  $\mu\text{L}$ );

$\varepsilon$  – molarni apsorpcijski koeficijent (26,6  $\text{mmol L}^{-1} \text{cm}^{-1}$ );

l – duljina optičkog puta (1 cm);

$\gamma$  – masena koncentracija proteina u ekstraktu [ $\text{mg mL}^{-1}$ ].

Rezultate sam izrazila kao srednju vrijednost pet bioloških replika, u jedinicama  $\mu\text{mol}$  nastalog produkta tetragvajakola po minuti po miligramu ukupnih topivih proteina [ $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}_{\text{prot.}}^{-1}$ ].

### ***Mjerenje aktivnosti APX***

Aktivnost APX (EC 1.11.1.11) odredila sam spektrofotometrijski prema metodi opisanoj u Nakano i Asada (1981), a koja se temelji na praćenju oksidacije askorbata pomoću askorbat peroksidaze i  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

U kvarcnu kivetu dodala sam  $795 \mu\text{L}$   $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$  EDTA u  $50 \text{ mmol L}^{-1}$  kalij-fosfatnom puferu (pH 7,0),  $5 \mu\text{L}$   $20 \text{ mmol L}^{-1}$  askorbata (Sigma),  $180 \mu\text{L}$  proteinskog ekstrakta (Poglavlje 3.3.2.4.) te  $20 \mu\text{L}$   $12 \text{ mmol L}^{-1}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ . Otopinu sam kratko promiješala te mjerila promjenu apsorbancije pri valnoj duljini od  $290 \text{ nm}$  svaku sekundu tijekom 15 sekundi. Za slijepu probu koristila sam  $180 \mu\text{L}$  ekstrakcijskog pufera ( $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$  EDTA u  $100 \text{ mmol L}^{-1}$  kalij-fosfatnom puferu, pH 7,0). Aktivnost APX u uzorcima izračunala sam pomoću formule:

$$\text{APX} = \frac{\Delta A_{s.v.} \times 60 \times V_{r.s.}}{V_{uz.} \times \varepsilon \times l \times \gamma} [\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}_{\text{prot.}}^{-1}]$$

$\Delta A_{s.v.}$  – srednja vrijednost promjene apsorbancije svake sekunde;

60 – faktor korekcije, za izražavanje rezultata po minuti;

$V_{r.s.}$  – volumen reakcijske smjese ( $1000 \mu\text{L}$ );

$V_{uz.}$  – volumen uzorka ( $180 \mu\text{L}$ );

$\varepsilon$  – molarni apsorpcijski koeficijent ( $2,8 \text{ mmol L}^{-1} \text{cm}^{-1}$ );

$l$  – duljina optičkog puta ( $1 \text{ cm}$ );

$\gamma$  – masena koncentracija proteina u ekstraktu [ $\text{mg mL}^{-1}$ ].

Rezultate sam izrazila kao srednju vrijednost pet bioloških replika, u jedinicama  $\mu\text{mol}$  utrošenog askorbata po minuti po mg ukupnih topivih proteina [ $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}_{\text{prot.}}^{-1}$ ].

### ***Mjerenje aktivnosti CAT***

Aktivnost CAT (EC 1.11.1.6) izmjerila sam prema metodi opisanoj u Aebi (1984). Metoda se temelji na spektrofotometrijskom mjerenju razgradnje supstrata,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , pomoću katalaze.

U kvarcnu kivetu dodala sam 950  $\mu\text{L}$  reakcijske smjese koja se sastojala od 50  $\text{mmol L}^{-1}$  kalij-fosfatnog pufera (pH 7,0) i 10  $\text{mmol L}^{-1}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ . Potom sam u reakcijsku smjesu dodala 50  $\mu\text{L}$  proteinskog ekstrakta (Poglavlje 3.3.2.4.), kratko promiješala otopinu te spektrofotometrijski izmjerila promjenu apsorbancije pri valnoj duljini od 240 nm svakih deset sekundi tijekom dvije minute. Za slijepu probu koristila sam 50  $\mu\text{L}$  ekstrakcijskog pufera (0,1  $\text{mmol L}^{-1}$  EDTA u 100  $\text{mmol L}^{-1}$  kalij-fosfatnog pufera, pH 7,0). Aktivnost CAT u uzorcima izračunala sam pomoću formule:

$$\text{CAT} = \frac{\Delta A_{s.v.} \times 6 \times V_{r.s.} \times 1000}{V_{uz.} \times \varepsilon \times l \times \gamma} [\text{nmol min}^{-1} \text{mg}_{\text{prot.}}^{-1}]$$

$\Delta A_{s.v.}$  – srednja vrijednost promjene apsorbancije u deset sekundi;

6 – faktor korekcije, za izražavanje rezultata po minuti;

$V_{r.s.}$  – volumen reakcijske smjese (1000  $\mu\text{L}$ );

$V_{uz.}$  – volumen uzorka (50  $\mu\text{L}$ );

$\varepsilon$  – molarni apsorpcijski koeficijent (40  $\text{mmol L}^{-1} \text{cm}^{-1}$ );

l – duljina optičkog puta (1 cm);

$\gamma$  – masena koncentracija proteina u ekstraktu [ $\text{mg mL}^{-1}$ ].

Dobivene vrijednosti pomnožila sam s 1000 kako bih rezultat izrazila kao srednju vrijednost pet bioloških replika u jedinicama  $\text{nmol}$  utrošenog  $\text{H}_2\text{O}_2$  po minuti po  $\text{mg}$  ukupnih topivih proteina [ $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}_{\text{prot.}}^{-1}$ ].

### **Mjerenje aktivnosti SOD**

Aktivnost SOD (EC 1.15.1.1) odredila sam spektrofotometrijski prema metodi opisanoj u Beauchamp i Fridovich (1971). Metoda se temelji na katalizi oksidacije ksantina enzimom ksantin oksidaza (XOD). Tijekom oksidacije ksantina nastaju superoksidni anioni ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ) koji reduciraju supstrat NBT (engl. *nitroblue tetrazolium*) u NBT-diformazan što se može pratiti promjenom apsorbancije pri valnoj duljini od 560 nm. SOD katalizira dismutaciju  $\text{O}_2^{\bullet-}$  i tako smanjuje količinu nastalog NBT-diformazana. Drugim riječima, ukoliko se u sustavu ne nalazi SOD, reakcija nastanka NBT-diformazana teče maksimalnom brzinom. Zbog toga sam u prvom dijelu postupka morala odrediti potrebnu koncentraciju enzima XOD za postizanje maksimalne brzine reakcije nastanka NBT-diformazana, a koja je definirana promjenom apsorbancije od  $0,025 \pm 0,005$  po minuti. Za postizanje maksimalne brzine, u plastičnu kivetu dodala sam



825  $\mu\text{L}$  SOD reakcijskog pufera ( $75 \mu\text{mol L}^{-1}$  NBT (Tokyo Chemical Industry) i  $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$  EDTA u  $50 \text{ mmol L}^{-1}$  kalij-fosfatnom puferu, pH 7,8),  $75 \mu\text{L}$   $10,8 \text{ mmol L}^{-1}$  ksantina (Sigma),  $50 \mu\text{L}$  ekstrakcijskog pufera ( $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$  EDTA u  $100 \text{ mmol L}^{-1}$  kalij-fosfatnom puferu, pH 7,0) i  $50 \mu\text{L}$   $0,05 \text{ U mL}^{-1}$  XOD (Sigma). Otopinu sam kratko promiješala i izmjerila promjenu apsorbancije pri  $560 \text{ nm}$  svakih  $30$  sekundi tijekom tri minute. Nakon što sam potvrdila da enzim XOD aktivnosti  $0,05 \text{ U mL}^{-1}$  dovodi do postizanja maksimalne brzine reakcije nastanka NBT-diformazana, započela sam drugi dio postupka i izmjerila aktivnost SOD u proteinskim ekstraktima (Poglavlje 3.3.2.4.). U kivetu sam dodala  $825 \mu\text{L}$  SOD reakcijskog pufera,  $75 \mu\text{L}$  ksantina,  $45 \mu\text{L}$  ekstrakcijskog pufera,  $50 \mu\text{L}$  XOD i  $5 \mu\text{L}$  proteinskog ekstrakta, kratko promiješala te izmjerila promjenu apsorbancije. Za slijepu probu koristila sam  $825 \mu\text{L}$  SOD reakcijskog pufera,  $75 \mu\text{L}$  ksantina,  $50 \mu\text{L}$  ekstrakcijskog pufera i  $50 \mu\text{L}$   $\text{dH}_2\text{O}$ .

Aktivnost SOD u uzorcima izračunala sam pomoću jednadžbe pravca linearnog dijela kalibracijske krivulje pripremljene na temelju niza poznatih aktivnosti SOD ( $0,005\text{-}1 \text{ U } \mu\text{L}^{-1}$ , Sigma). Za svaku navedenu enzimsku aktivnost izmjerila sam promjenu apsorbancije pri valnoj duljini od  $560 \text{ nm}$ , a potom izračunala srednju vrijednost promjene apsorbancije po minuti. Spomenutu srednju vrijednost izrazila sam kao recipročnu vrijednost te grafički prikazala u ovisnosti o aktivnosti SOD. Iz tog grafičkog prikaza izračunala sam jednadžbu pravca. Rezultate sam izrazila kao srednju vrijednost pet bioloških replika u jedinici U po mg proteina [ $\text{U mg}^{-1}$  proteina], pri čemu je mjerna jedinica U (engl. *units*) definirana kao količina SOD potrebna za inhibiciju  $50\%$  brzine redukcije NBT.

### **3.3.2.7. Imunodetekcija proteina HSP70, HSP90 i RuBisCO**

#### ***Razdvajanje proteina poliakrilamid-gel elektroforezom pri denaturirajućim uvjetima***

Kako bih analizirala ekspresiju proteina HSP70, HSP90 i RuBisCO, provela sam poliakrilamid-gel elektroforezu pri denaturirajućim uvjetima (metoda SDS-PAGE) koja se temelji na gibanju denaturiranih proteina u električnom polju, čime se postiže njihovo razdvajanje s obzirom na molekulsku masu (Laemmli 1970). Metodu sam primijenila na uzorcima čija ekstrakcija je opisana u Poglavlju 3.3.2.4.

Postupak sam započela denaturacijom proteina u uzorcima, pri čemu sam koristila pufer za denaturaciju koji se sastojao od  $87,5 \text{ mmol L}^{-1}$  Tris-HCl (pH 6,8),  $2\%$  (w/v) natrijevog dodecil-sulfata (SDS, PlusOne),  $45\%$  glicerola (Kemika, Hrvatska),  $12,5\%$  2-merkaptetanola (Merck) i  $0,0125\%$  (w/v) boje bromfenol modriilo (Sigma). Svakom uzorku ( $100 \mu\text{L}$ ) dodala sam  $25 \mu\text{L}$

pufera za denaturaciju. Smjesu sam kratko promiješala na vibracijskoj miješalici te inkubirala u termobloku pet minuta pri temperaturi od 95 °C. Po završetku inkubacije, uzorke sam kratko (~pet minuta) ohladila na ledu i prije nanošenja u jažice na gelu još jednom promiješala na vibracijskoj miješalici.

Za razdvajanje proteina primijenila sam diskontinuiranu elektroforezu koja se sastoji od dva gela – gela za sabijanje (4%) i gela za razdvajanje (12%), puferiranih pri različitim pH vrijednostima. Gelove sam pripremila u malom sustavu za gel-elektroforezu (Mini-PROTEAN 3 Cell, Bio-Rad), pri čemu je gel za sabijanje sadržavao 3,05 mL dH<sub>2</sub>O, 1,25 mL 0,5 mol L<sup>-1</sup> Tris-HCl (pH 6,8), 665 µL akrilamida/bis-akrilamida (T = 30%, C = 2,66%, Sigma), 50 µL 10% (w/v) SDS, 50 µL 10% (w/v) amonij persulfata (APS, Sigma) i 10 µL tetrametiletildiamina (TEMED, Sigma), dok je gel za razdvajanje sadržavao 3,35 mL dH<sub>2</sub>O, 2,50 mL 1,5 mol L<sup>-1</sup> Tris-HCl (pH 8,8), 4,00 mL akrilamida/bis-akrilamida (T = 30%, C = 2,66%), 100 µL 10% (w/v) SDS, 100 µL 10% (w/v) APS i 10 µL TEMED. U pojedinu jažicu u gelu nanijela sam ukupno 4 µg proteina. Stoga sam prema izmjerenoj koncentraciji proteina u uzorcima (Poglavlje 3.3.2.5.) izračunala koji volumen pojedinog uzorka moram nanijeti u jažice. U prvu jažicu uvijek sam nanosila biljege molekulskih masa, raspona masa od 10 do 180 kDa (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Thermo Fischer Scientific). Elektroforezu sam provela na sobnoj temperaturi u elektrodnom puferu (pH 8,3) koji je sadržavao 25 mmol L<sup>-1</sup> Tris, 192 mmol L<sup>-1</sup> glicin (Kemika, Hrvatska) i 0,1% (w/v) SDS. Prvih 15-20 minuta, dok se uzorci nisu sabili u ravnu liniju na gelu, elektroforezu sam provela pri naponu od 80 V. Kad su uzorci prošli gel za sabijanje i počeli se razdvajati, napon sam povisila na 200 V. Elektroforeza je u tim uvjetima trajala otprilike sat vremena, a zaustavila sam ju kad se boja bromfenol modriilo približila donjem rubu gela.

### ***Western analiza proteina***

Po završetku elektroforeze, pripremila sam sustav za prijenos proteina (Mini Trans-Blot® Cell, Bio-Rad) razdvojenih u gelu na nitroceluloznu membranu (0,45 µm, Amersham™ Protran™). Veliku Petrijevu zdjelicu napunila sam puferom za prijenos (pH 8,3) koji je sadržavao 28 mmol L<sup>-1</sup> Trisa, 192 mmol L<sup>-1</sup> glicina i 10% (v/v) metanola (J. T. Baker). U zdjelici napunjenoj puferom pripremila sam višeslojni „sendvič“ u kazeti za prijenos koji se redom sastojao od donje strane kazete, spužvice, filter papira, gela, nitrocelulozne membrane, filter papira, spužvice, i gornje strane kazete. Prije zatvaranja kazete, nekoliko puta sam prošla po površini

gornje spužvice staklenom epruветom položenom poput valjka, kako bih istisnula zaostale mjehuriće zraka te pospješila priljublivanje membrane uz gel, a time i prijenos proteina. Tako pripremljenu kazetu prebacila sam u sustav za elektroprijenos pazeći da membrana u sustavu bude orijentirana prema pozitivnoj elektrodi, tj. anodi. Sustav za elektroprijenos stavila sam u kadnicu, dodala posudu s ledom kako bih osigurala dodatno hlađenje te čitavu kadnicu napunila hladnim puferom za prijenos. Prijenos je trajao 60 minuta na 60 V.

Nakon prijenosa, u svrhu provjere njegove uspješnosti, membranu sam obojila bojom koja je sadržavala 0,05% (w/v) Ponceau S (Sigma) u 5% (v/v) octenoj kiselini. Nakon što se boja vezala na proteine, položaj biljega molekulskih masa na membrani označila sam grafitnom olovkom. Obojanoj membranu sam skenirala (Canon, LiDE 120), a zatim sam višak boje uklonila višestrukim ispiranjem u dH<sub>2</sub>O, pri čemu je zadnje ispiranje bilo u puferu 1× TBS-T (engl. *Tris-buffered saline-Tween*). Pufer se sastojao od 20 mmol L<sup>-1</sup> Trisa, 150 mmol L<sup>-1</sup> natrijevog klorida (Gram-mol, Hrvatska) i 1% (v/v) Tweena 20 (Appllichem, Njemačka), a pH vrijednost mu je iznosila 7,5. Nakon što sam uklonila svu boju, membranu sam inkubirala u otopini za blokiranje koja se sastojala od 5% (w/v) mlijeka u prahu (Dukat, Hrvatska) pripremljenog u puferu 1× TBS-T. Blokiranje je trajalo 60 minuta na sobnoj temperaturi, uz miješanje. Nakon blokiranja, membranu sam isprala dva puta po pet minuta u puferu 1× TBS-T, te ju inkubirala preko noći na temperaturi od 4 °C u primarnom antitijelu pripremljenom u otopini za blokiranje (Tablica 3). Sljedećeg dana sam membranu isprala dva puta po pet minuta u puferu 1× TBS-T, te ju inkubirala u otopini za blokiranje u koju sam dodala sekundarno antitijelo obilježeno enzimom peroksidaza iz hrena (HRP, engl. *horseradish peroxidase*) (Tablica 3). Inkubacija je trajala 60 minuta na sobnoj temperaturi uz miješanje. Uslijedilo je ispiranje membrane u puferu 1× TBS-T, dva puta po pet minuta, nakon čega sam provela detekciju proteinskih vrpca upotrebom kemiluminiscentnog supstrata (Immobilon Forte Western HRP, Merck Millipore) kako bi se dobio signal koji sam očitavala pomoću uređaja za kemiluminiscenciju (C-DiGit Blot Scanner, LI-COR Biosciences – GmbH, SAD). Intenzitet signala detektiranih proteinskih vrpca kvantificirala sam pomoću računalnog programa za analizu membrana (Image Studio™ Lite 5.2, LI-COR Biosciences – GmbH, SAD). Značajnom razlikom između kvantificiranih proteinskih vrpca smatrala sam vrijednosti 1,5 puta veće ili manje od odgovarajuće kontrolne vrijednosti.

**Tablica 3.** Priprema primarnih i sekundarnog antitijela korištenih za imunodetekciju proteina HSP70, HSP90 i velike podjedinice proteina RuBisCO (rbcL).

Protein	Primarno antitijelo	Razrjeđenje	Sekundarno antitijelo	Razrjeđenje
HSP70	poliklonsko, kunićji anti-HSP70 (Agrisera, AS08 371)	1:3000		
HSP90	poliklonsko, kunićji anti-HSP90 (Agrisera, AS08 346)	1:3000	anti-kunićji IgG, HRP (Merck Millipore)	1:10 000
rbcL	poliklonsko, kunićji anti-rbcL (Agrisera, AS03 037)	1:4000		

### 3.3.2.8. Analiza ekspresije gena metodom qPCR

#### *Izolacija ukupne RNA*

Za izolaciju ukupne RNA iz klijanaca uročnjaka koristila sam komercijalni paket (MagMAX™ Plant RNA Isolation Kit, Thermo Fischer Scientific). Prikupila sam otprilike 20 mg tkiva klijanaca u mikroeprovete od 1,5 mL koje su sadržavale 5-10 staklenih kuglica za homogenizaciju (SiLibeads Type S, Sigmund Linder). Tkivo sam smrznula u tekućem dušiku i pohranila u ledenicu na -80 °C do daljnjih analiza. Prije izolacije ukupne RNA, mikroeprovete s tkivom izvadila sam iz ledenice i držala u tekućem dušiku. Zatim sam tkivo usitnila u homogenizatoru (GC Silvermix 90, 900548, BF Mulholland, Velika Britanija) pri frekvenciji od 50 Hz, u trajanju od dva puta po osam sekundi.

Izolaciju RNA provela sam prema uputama proizvođača. Ukratko, u svaku mikroeprovetu s usitnjenim tkivom dodala sam 550 µL pufera za lizu iz paketa, uz dodatak 2% (w/v) polivinilpirolidona (PVP, Sigma) i 40 mmol L<sup>-1</sup> DTT. Potom sam uzorke promiješala 15-20 sekundi na vibracijskoj miješalici, kratko (~2 sekunde) centrifugirala kako bih prikupila kapljice zaostale na poklopcu mikroeproveta te inkubirala u termobloku pet minuta pri temperaturi od 56 °C. Po završetku inkubacije, uzorke sam centrifugirala deset minuta na 16000 g pri sobnoj temperaturi. Zatim sam, koristeći mikropipetu prenijela 400 µL supernatanta u nove, čiste mikroeprovete, a taloge bacila. U svaki uzorak (400 µL) dodala sam 25 µL suspenzije magnetnih kuglica za vezanje RNA i 400 µL 96% etanola. Otopinu sam promiješala deset sekundi na vibracijskoj miješalici, kratko centrifugirala te stavila mikroeprovete na magnetni stalak (DynaL Biotech ASA, Norveška) na dvije minute. Tijekom tog vremena,

magnetne kuglice s vezanom RNA priljubile su se uz magnetni stalak, a otopina razbistrila. Bez micanja mikroepreveta sa stalka, prikupila sam i bacila supernatant. Zatim sam mikroeprevete maknula sa stalka i u svaku dodala 700  $\mu$ L otopine za ispiranje koja je dio sadržaja paketa (Wash Solution 1). Otopinu sam ponovno promiješala deset sekundi na vibracijskoj miješalici, kratko centrifugirala te stavila mikroeprevete na magnetni stalak na dvije minute. Kao i u ranijem koraku, prikupila sam i bacila supernatant, bez micanja mikroepreveta sa stalka. Uzorke sam zatim inkubirala pet minuta na sobnoj temperaturi kako bih omogućila evaporaciju zaostalog etanola iz otopine za ispiranje. Za vrijeme inkubacije, pomoću kemikalija iz paketa, pripremila sam otopinu DNase I Master Mix koja je po uzorku sadržavala 100  $\mu$ L puferske otopine 2 $\times$  DNase I Buffer, 4  $\mu$ L otopine DNase I Solution, 20  $\mu$ L otopine MnCl<sub>2</sub> i 76  $\mu$ L sterilne vode bez nukleaza. Otopina je do korištenja držana na ledu. Nakon završetka inkubacije, mikroeprevete sam maknula sa stalka te sam u svaku dodala po 200  $\mu$ L prethodno pripremljene otopine DNase I Master Mix. Svaku mikroeprevetu sam nježno protresla prstima i smjestila na 15 minuta u termoblok zagrijan na 37 °C. Nakon inkubacije, uz miješanje pri 350 rpm, mikroeprevete sam izvadila iz termobloka i kratko centrifugirala. Zatim sam u svaku mikroeprevetu dodala 150  $\mu$ L puferske otopine Rebinding Buffer iz paketa i 400  $\mu$ L 96% etanola. Otopinu sam ponovno promiješala deset sekundi na vibracijskoj miješalici, kratko centrifugirala te mikroeprevete stavila na magnetni stalak na dvije minute. Bez micanja mikroepreveta sa stalka, prikupila sam i bacila supernatant. Zatim sam mikroeprevete maknula sa stalka i u svaku dodala 700  $\mu$ L otopine za ispiranje iz paketa (Wash Solution 1). Ponovila sam prethodne korake s miješanjem, centrifugiranjem i bacanjem supernatanta. Mikroeprevete sam maknula sa stalka te nastavila postupak ispiranja dodavanjem po 700  $\mu$ L sljedeće otopine za ispiranje (Wash Solution 2) u svaku mikroeprevetu. Ponovila sam prethodne korake s miješanjem, centrifugiranjem i bacanjem supernatanta. Još jednom sam dodala 700  $\mu$ L otopine za ispiranje (Wash Solution 2) te ponovila sve prethodne korake. Nakon tog zadnjeg ispiranja, uzorke sam inkubirala pet minuta na sobnoj temperaturi kako bih omogućila evaporaciju zaostalog etanola iz otopine za ispiranje. Nakon pet minuta, uzorke sam maknula sa stalka i u svaki dodala 70  $\mu$ L sterilne vode bez nukleaza. Otopinu sam ponovno promiješala deset sekundi na vibracijskoj miješalici, kratko centrifugirala te stavila mikroeprevete na magnetni stalak na dvije minute. Bez micanja mikroepreveta sa stalka, prikupila sam i prebacila supernatant koji je sadržavao izoliranu RNA u nove, sterilne mikroeprevete. Koncentraciju i čistoću izolirane RNA izmjerila sam spektrofotometrijski koristeći uređaj NanoDrop™ 1000 (Thermo Fischer Scientific).

### ***Reverzna transkripcija ukupne RNA***

Izoliranu RNA prevela sam u komplementarnu DNA (cDNA) metodom reverzne transkripcije. Budući da je za reakciju reverzne transkripcije u mikroeprevetu potrebno dodati 1 µg ukupne RNA, za svaki uzorak izračunala sam koliki volumen izolirane RNA moram dodati u smjesu za reverznu transkripciju s obzirom na izmjerenu koncentraciju RNA.

U skladu s prethodnim izračunom, u mikroeprevete od 200 µL dodala sam odgovarajući volumen izolirane RNA, te dopunila sterilnom vodom bez nukleaza do volumena od 13 µL. Svakom uzorku dodala sam 1,5 µL smjese koja se sastojala od 0,5 µL početnica (Oligo(dT)<sub>18</sub>, Thermo Fischer Scientific) i 1 µL 10 mmol L<sup>-1</sup> mješavine nukleotida (dNTP, Sigma). Smjesu sam promiješala pomoću mikropipete te inkubirala pet minuta u uređaju za PCR (GeneAmp® PCR System 2700, Thermo Fischer Scientific) pri temperaturi od 65 °C. Nakon inkubacije, temperaturu na uređaju namjestila sam na 4 °C kako bih svakom uzorku dodala smjesu koja se sastojala od 4 µL pufera 5× Reaction Buffer, 0,5 µL otopine RiboLock RNase Inhibitor i 1 µL enzima RevertAid H Minus Reverse Transcriptase (Thermo Fischer Scientific). Sve otopine su tijekom pokusa držane na ledu. Uzorke i novu smjesu ponovno sam promiješala pomoću mikroeprevete te kratko centrifugirala. Uzorke sam vratila u uređaj za PCR te ih inkubirala 45 minuta pri temperaturi od 42 °C, a zatim 15 minuta pri temperaturi od 70 °C. Po završetku reakcije, sve uzorke razrijedila sam u sterilnoj vodi bez nukleaza s obzirom na masu korištene RNA (1 µg), kako bi konačna koncentracija cDNA bila 10 ng µL<sup>-1</sup>. Uzorke sam do daljnjih analiza pohranila na 4 °C.

### ***Provjera čistoće cDNA***

Kako bih provjerila čistoću dobivene cDNA, odnosno kontaminaciju uzoraka genomskom DNA, umnožila sam fragment gena *ACT3* (engl. *actin 3*) lančanom reakcijom polimeraze (metoda PCR). S obzirom na to da cDNA nastaje reverznom transkripcijom molekule RNA, ona sadrži samo egzone, odnosno kodirajuće regije. Nasuprot tome, genomski DNA potječe od genoma, te sadrži i egzone i introne (nekodirajuće regije). Zbog toga se umnoženi fragmenti koji potječu od cDNA razlikuju veličinom od onih koji potječu od genomske DNA.

U mikroeprevetu od 200 µL dodala sam 2 µL cDNA i 23 µL smjese koja se sastojala od 12,5 µL otopine 2× EmeraldAmp MAX PCR Master Mix (Takara Bio), 0,5 µL 10 µmol L<sup>-1</sup> nizvodne (5'-CTGGCATCATACTTTCTACAATG-3') i 0,5 µL 10 µmol L<sup>-1</sup> uzvodne početnice (5'-

CACCACTGAGCACAATGTTAC-3') za gen *ACT3* te 9,5  $\mu\text{L}$  redestilirane  $\text{H}_2\text{O}$ . Za pozitivnu kontrolu koristila sam 2  $\mu\text{L}$  genomske DNA, a za negativnu kontrolu 2  $\mu\text{L}$  redestilirane  $\text{H}_2\text{O}$ . Sve otopine držane su na ledu. Dobivenu smjesu promiješala sam pomoću mikropipete, kratko centrifugirala te ju stavila u uređaj za PCR na umnažanje (Tablica 4). Očekivana veličina fragmenta gena *ACT3* dobivenog umnažanjem genomske DNA iznosi 733 parova baza (bp), a fragmenta dobivenog umnažanjem cDNA 650 bp.

Kako bih analizirala umnožene fragmente, uzorke sam prvo razdvojila agaroznom gel-elektroforezom koristeći uređaj RunOne™ Electrophoresis Unit (Embi Tec). Pripremila sam 2% (w/v) agarozni gel (Sigma) u puferu  $1\times$  TAE (engl. *Tris-acetate-EDTA*) koji se sastojao od 1  $\text{mmol L}^{-1}$  EDTA u 40  $\text{mmol L}^{-1}$  Tris-acetata, pH vrijednosti 8,0 (Sigma). U jažice sam nanijela 3  $\mu\text{L}$  biljega molekulskih masa (GeneRuler 1 kb DNA Ladder, Thermo Fischer Scientific) te po 5  $\mu\text{L}$  pojedinog uzorka, pozitivne ili negativne kontrole. Prvih pet minuta, tijekom kojih su uzorci ulazili u gel, elektroforezu sam provela pri naponu od 25 V. Nakon pet minuta, napon sam povisila na 100 V. Elektroforeza je u tim uvjetima trajala otprilike 30 minuta. Po završetku elektroforeze, višak pufera sam ocijedila te sam gel stavila na inkubaciju u otopinu etidij-bromida koncentracije 10  $\text{ng L}^{-1}$ . Inkubacija je trajala 15 minuta pri temperaturi od 4 °C. Nakon inkubacije, gel sam izložila UV svjetlosti dvije sekunde i fotografirala (Kodak EDAS 290).

**Tablica 4.** Program umnažanja fragmenta gena *ACT3*.

Vrijeme	Temperatura	Broj ciklusa	Proces
3 minute	98 °C	1 ciklus	denaturacija DNA
10 sekundi	98 °C		
30 sekundi	56 °C	35 ciklusa	vezanje početnica
1 minuta	72 °C		
7 minuta	72 °C	1 ciklus	sinteza komplementarnih lanaca
$\infty$	4 °C		pohrana do daljnjih analiza

### ***Kvantifikacija ekspresije gena metodom qPCR***

Za kvantifikaciju ekspresije gena *BPM1-6* te transgena *BPM1-GFP* koristila sam metodu qPCR (engl. *quantitative PCR*) koju sam provela koristeći uređaj za PCR u stvarnom vremenu (Magnetic Induction Cyler (Mic) PCR Machine, Bio Molecular Systems). Kao endogenu

kontrolu koristila sam gene *OGIO* (engl. *2-oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase superfamily protein*) i *PUX7* (engl. *plant UBX domain-containing protein 7*) koje su Škiljaica i sur. (2022) predložili kao najbolje endogene kontrole za klijance uročnjaka prilikom istraživanja toplinskog stresa. Prije početka reakcije umnažanja, za svaki uzorak pripremila sam reakcijsku smjesu volumena 13  $\mu\text{L}$ . Smjesa se sastojala se od 7,5  $\mu\text{L}$  otopine 2 $\times$  GoTaq $^{\text{®}}$  qPCR MasterMix (Promega), 4,9  $\mu\text{L}$  redestilirane  $\text{H}_2\text{O}$ , 0,3  $\mu\text{L}$  10  $\mu\text{mol L}^{-1}$  nizvodne i 0,3  $\mu\text{L}$  10  $\mu\text{mol L}^{-1}$  uzvodne početnice za odgovarajući gen (Tablica 5). Sve otopine su tijekom postupka držane na ledu. U mikroeprovete sa smjesom (13  $\mu\text{L}$ ) dodala sam 2  $\mu\text{L}$  pojedinog kalupa cDNA, međusobno ih promiješala i stavila u uređaj za PCR (Tablica 6). Svaki uzorak pripremila sam u dvije tehničke replike. Za negativnu kontrolu, umjesto uzorka, dodala sam 2  $\mu\text{L}$  redestilirane  $\text{H}_2\text{O}$ .

**Tablica 5.** Početnice korištene za umnažanje gena od interesa kvantitativnom reakcijom PCR u stvarnom vremenu. Efikasnosti početnica izračunate su u računalnom programu uređaja za PCR u stvarnom vremenu (Mic qPCR Analysis Software, Biomolecular Systems).

Naziv gena	Pristupni broj	Sekvenca 5' $\rightarrow$ 3' (nizvodno/uzvodno)	Efikasnost početnica	Literaturni navod
<i>BPM1</i>	At5g19000	CCCGGTTGCACTGAATGGGA / ACGATTCATTGTACTTGCTAGATCCGATT	0,90	Škiljaica i sur. 2020
<i>BPM2</i>	At3g06190	TCTATCCGGGTAATAAGATCGAAGA / CCTTGAAACCCTAATTGTGTC	0,86	Škiljaica i sur. 2020
<i>BPM3</i>	At2g39760	AGTGATAGACGACATCGAACCT / CAAGGTCATAGAGGTCAGCA	0,86	Škiljaica i sur. 2020
<i>BPM4</i>	At3g03740	GAAGTACTGACATGGAGCCT / CACTGACTCGCACATTAGAC	0,84	Škiljaica i sur. 2020
<i>BPM5</i>	At5g21010	CGTTTGCCTTAAGTTTACTGCC / ACTGTTACTACCTTCCTCGTG	0,78	A. Škiljaica
<i>BPM6</i>	At3g43700	AAGGGTCAGGCAGCGAACCA / CCGCTTCCCTTTCATTCCGGTACA	0,94	Lechner i sur. 2011
<i>BPM1-GFP</i>	/	AGTGGAAGACGAGTGAAGC / CTGAACTTGTGGCCGTTTAC	0,75	A. Škiljaica
<i>OGIO</i>	At5g51880	ATCCAAGAGCAGTTCAAGCAAG / GAGAGCCATACCTTCCACTG	0,82	Škiljaica i sur. 2022
<i>PUX7</i>	At1g14570	GTTTCTCAGACTATCAAAGCCA / ATCAATTACAAGCACCACGG	0,76	Škiljaica i sur. 2022

Po završetku reakcije umnažanja, provjerila sam specifičnost nastalih produkata pomoću krivulja taljenja. Krivulje su dobivene zagrijavanjem od 50  $^{\circ}\text{C}$  do 95  $^{\circ}\text{C}$  s brzinom porasta temperature od 0,5  $^{\circ}\text{C}$  po sekundi.



**Tablica 6.** Protokol umnažanja fragmenata pojedinih gena primjenom metode qPCR.

Vrijeme	Temperatura	Broj ciklusa	Proces
5 minuta	95 °C	1 ciklus	denaturacija DNA
5 sekundi	95 °C	40 ciklusa	vezanje početnica i sinteza
10 sekundi	60 °C		komplementarnih lanaca
∞	4 °C	pohrana do daljnjih analiza	

**Obrada podataka dobivenih metodom qPCR**

Vrijednosti za  $C_t$  i efikasnost početnica (Tablica 5), potrebne za kvantifikaciju ekspresije gena, izračunate su u računalnom programu uređaja za PCR u stvarnom vremenu (Mic qPCR Analysis Software, Biomolecular Systems).  $C_t$  označava točku, odnosno ciklus u kojem je moguće odvojiti i detektirati fluorescentni signal od tzv. pozadinskog signala na krivulji. Vrijednost  $C_t$  obrnuto je proporcionalna količini umnoženog fragmenta DNA. Efikasnost početnica predstavlja uspješnost vezanja pojedinog para početnica na kalup DNA te sintezu dviju molekula DNA od jedne molekule u svakom ciklusu reakcije (Vandesompele i sur. 2002, Pfaffl 2004). Za kvantifikaciju ekspresije gena od interesa izračunala sam vrijednost  $\Delta C_t$  korištenjem sljedećih formula:

$$A = (1 + \text{srednja vrijednost efikasnosti početnica za gen od interesa})^{C_t \text{ gena od interesa}}$$

$$B = (1 + \text{srednja vrijednost efikasnosti početnica za endogenu kontrolu I})^{C_t \text{ endogene kontrole I}}$$

$$C = (1 + \text{srednja vrijednost efikasnosti početnica za endogenu kontrolu II})^{C_t \text{ endogene kontrole II}}$$

$$D = \text{geometrijska sredina vrijednosti B i C}$$

$$\Delta C_t = \frac{D}{A}$$

Geni od interesa bili su nativni geni *BPM1-6* i transgen *BPM1-GFP*, a endogene kontrole I i II geni *OGIO* i *PUX7*. S obzirom na to da sam svaki uzorak pripremila u dvije tehničke replike, prosječnu vrijednost  $C_t$  dobila sam računanjem geometrijske sredine dviju tehničkih replika za pojedini uzorak.

Nadalje, zanimala me relativna promjena ekspresije odabranih gena ( $\Delta\Delta C_t$ ). Zbog toga sam ekspresiju izmjerenih nativnih gena *BPM1-6* u kontrolnim i tretiranim klijancima istraživanih linija normalizirala u odnosu na ekspresiju tih gena u kontrolnim klijancima divljeg tipa. Ekspresiju transgena *BPM1-GFP* normalizirala sam u odnosu na ekspresiju nativnog gena

*BPM1* u liniji *oeBPM1*. Dobivene vrijednosti izrazila sam kao srednju vrijednost tri biološke replike. Jedna biološka replika predstavljala je otprilike 20 mg svježe mase klijanaca pojedine linije i skupine.

### 3.4. Obrada i statistička analiza podataka

Pokus s biljkama uzgojenim na zemljanom supstratu provela sam jednom, dok sam pokus s biljkama uzgojenim *in vitro* provela tri puta. Broj bioloških replika razlikovao se s obzirom na mjerene parametre te je broj replika naznačen u opisu metode pojedinog parametra.

Cilj morfološke karakterizacije biljaka od stadija klijanaca do stadija sjemenki bio je praćenje dugoročnog učinka toplinskog stresa te promijenjene ekspresije gena *BPM* i *DMS3* na rast i razvoj biljaka uročnjaka. Prilikom obrade rezultate uzela sam u obzir da su biljke praćene gotovo svakodnevno tijekom dva tjedna, da je praćeno pet linija biljaka s različitim genskim pozadinama (*wt*, *oeBPM1*, *amiR-bpm*, *oeDMS3*, *dms3-1*) te da su biljke bile izložene povišenoj temperaturi u različitim razvojnim stadijima (dva i/ili osam listova u rozeti). Imajući na umu cilj istraživanja, bilo je potrebno primijeniti odgovarajući statistički model koji će otkriti koje su varijable (genska pozadina, razvojni stadij u kojem su biljke izložene povišenoj temperaturi, dan praćenja) imale najveći utjecaj na mjerene morfološke parametre (površina i opseg rozete, površina i opseg konveksne ljuske). Stoga sam za istraživanje učinka spomenutih varijabli koristila tzv. stablo odlučivanja (engl. *decision tree*). Ukratko, osnovna ideja primjene metode stablo odlučivanja je stvaranje dijagrama koji će razdvojiti ulazne podatke u različite grupe (čvorove, engl. *node*) na temelju statistički značajne razlike između tih grupa. U svakom čvoru stabla, provode se novi statistički testovi kako bi se utvrdilo je li razlika između daljnjih podskupova podataka statistički značajna ili je rezultat slučajnosti, a podaci se dijele na podskupove sve dok postoji statistički značajna razlika između grupa. Svaki model stabla potrebno je provjeriti, odnosno izračunati točnost klasifikacije (engl. *accuracy score*). Točnost klasifikacije predstavlja omjer broja točno klasificiranih podataka prema ukupnom broju korištenih podataka. Za validaciju modela koristi se nasumično odvojeni dio ulaznih podataka (do 20% ukupnih podataka). Očekivano, što je točnost veća, model je precizniji i bolje predviđa raspodjelu podataka u grupe. Analizu stabla odlučivanja provela sam u programu R 4.0.2 korištenjem paketa „*party*“ i sintakse *ctree(Tretmani ~ Površina rozete + Opseg rozete + Površina konveksne ljuske + Opseg konveksne ljuske)*.

U okviru ovog istraživanja, model stabla generiran je za divlji tip te linije s promijenjenom ekspresijom gena *BPM* (*oeBPM1*, *amiR-bpm*), odnosno gena *DMS3* (*oeDMS3*, *dms3-1*). Za svaku liniju generiran je po jedan model za svaki dan praćenja morfoloških parametara, odnosno ukupno je po liniji generirano sedam modela. S obzirom da su biljke tretirane u dva različita stadija, za svaku liniju prikazana su dva modela najveće točnosti klasificiranja. Odabir prvog modela odnosio se na dane praćenja biljaka nakon izlaganja prvom tretmanu i do izlaganja drugom tretmanu (od 14. do 19. dana), a odabir drugog modela odnosio se na dane nakon prvog tretmana do kraja pokusa (od 14. do 23. dana). Time je za svaku liniju omogućen odabir modela koji najbolje uspijeva razlikovati promjene u morfološkim parametrima s obzirom na razvojni stadij u kojem su biljke izložene povišenoj temperaturi i dan praćenja. Također, ovaj oblik analize omogućio mi je ustanoviti koji dani praćenja su pokazali najizraženije učinke tretmana te koji od parametara su bili najpodložniji promjenama uslijed tretmana.

Nakon analize provedene pomoću stabla odlučivanja, gdje sam identificirala morfološke parametre koji su omogućili učinkovito razdvajanje različitih skupina u određenim danima praćenja, usporedila sam podatke dobivene za biljke divljeg tipa s onima za linije s promijenjenom ekspresijom gena *BPM* (*oeBPM1*, *amiR-bpm*), odnosno gena *DMS3* (*oeDMS3*, *dms3-1*). Pri tome sam u obzir uzela i kontrolne biljke i biljke izložene povišenoj temperaturi. Za svaki parametar testirala sam distribuciju podataka korištenjem Shapiro-Wilkovog *W* testa, te jednakost varijanci korištenjem Levenovog testa. Za  $p > 0,05$  smatrala sam da su podaci normalno distribuirani, a varijanca jednaka. Budući da podaci nisu pokazali odstupanje od normalne distribucije, te da je varijanca bila jednaka, statističku analizu nastavila sam korištenjem parametrijskih testova. S obzirom na broj uspoređivanih skupina, koristila sam Studentov *t*-test za nezavisne uzorke (usporedba dviju skupina) ili jednosmjernu analizu varijance (usporedba više od dviju skupina). Ukoliko je jednosmjerna analiza varijance pokazala da postoje značajne razlike između uspoređivanih grupa, provela sam analizu *post hoc* kako bih utvrdila između kojih skupina postoji značajna razlika. Za analizu *post hoc* odabrala sam test Tukey HSD. Sve razlike smatrala sam značajnim pri  $p \leq 0,05$ .

Za razliku od morfoloških parametara, preostali parametri mjereni su u manjem broju vremenskih točaka. Zbog toga sam za analizu tih parametara odabrala dvosmjernu analizu varijance čime sam istražila učinak toplinskog tretmana i genske pozadine na određeni parametar u pojedinoj vremenskoj točki. Prije provođenja dvosmjerne analize, testirala sam distribuciju (Shapiro-Wilkov *W* test) i varijancu (Levenov test) podataka jer su preduvjeti za

provođenje ovog testa normalna distribucija podataka i jednakost varijanci. Za otkrivanje razlika između genskih pozadina, odnosno razlika između kontrolnih i tretman-skupina, odvojeno sam analizirala učinak pozadine i tretmana. S obzirom na broj uspoređivanih skupina, koristila sam Studentov *t*-test za nezavisne uzorke, odnosno jednosmjernu analizu varijance i test Tukey HSD. Sve razlike smatrala sam značajnim pri  $p \leq 0,05$ . Za statističku analizu promjene relativne ekspresije gena koristila sam Studentov *t*-test za zavisne uzorke jer sam ekspresiju gena analizirala u istom tkivu koje je prikupljeno prije izlaganja klijanaca povišenoj temperaturi, odmah nakon izlaganja te nakon 24-satnog oporavka. Također, razlike sam smatrala značajnim pri  $p \leq 0,05$ . Statističku analizu podataka provela sam pomoću programa R 4.0.2 i Microsoft Excel 365 uz dodatak paketa „*Real Statistics Resource Pack*“ te sam konačne rezultate prikazala kao srednje vrijednosti aritmetičke sredine, a odstupanje od srednje vrijednosti izrazila sam kao standardnu pogrešku.

Kako bih vizualizirala sličnosti i razlike između linija uzgajanih *in vitro*, provela sam analizu glavnih komponenti (PCA, engl. *principal component analysis*). Analizirala sam izmjerene fiziološke i biokemijske parametre. Za analizu nisam uzela u obzir podatke dobivene western analizom i metodom qPCR zbog manjeg broja replika u odnosu na fiziološke i biokemijske parametre. Prije analize PCA, radi normalizacije podataka, provela sam dvosmjernu analizu varijance (de Haan i sur. 2006). Model je pokazao značajnu razliku ( $p \leq 0,05$ ) između klijanaca prikupljenih u prvoj i drugoj vremenskoj točki. Stoga sam analizu PCA provela odvojeno za te dvije vremenske točke. Broj značajnih komponenti PCA prikazala sam pomoću tzv. grafikona loma (engl. *scree plot*) koji se sastoji od grafa s dvije osi: os x (horizontalna) prikazuje redni broj glavne komponente, dok os y (vertikalna) prikazuje varijancu (ili varijabilnost) objašnjenu tom komponentom. Glavni cilj grafikona loma je identificirati "lomnu točku" na grafu, tj. točku gdje varijanca počinje opadati znatno brže. Broj komponenti koje treba zadržati za analizu obično se odabire na temelju ove lomne točke. Naposljetku, prije vizualizacije modela PCA, provela sam analizu doprinosa mjerenih parametara komponentama PCA kako bih iz analize eventualno isključila parametre koji ne doprinose značajno objašnjenju varijance. Za mjerenje doprinosa izračunala sam vrijednost  $\cos^2$  (engl. *square cosine*) koja mjeri koliko parametar doprinosi određenoj komponenti u PCA, a koja se interpretira kao "kosinus kuta" između parametra i komponente. Što je  $\cos^2$  bliže 1, to znači da je parametar dobro usklađen s tom komponentom, dok niže vrijednosti ukazuju na manji doprinos. Analizu PCA provela sam u programu R 4.0.2 korištenjem paketa „*corrplot*“ i „*factoextra*“.

## 4. REZULTATI

### 4.1. Fenotipizacija biljaka od stadija klijanaca do stadija sjemenki

Dugoročni učinak toplinskog stresa i genske pozadine na rast i razvoj biljaka s promijenjenom ekspresijom gena *BPM*, odnosno gena *DMS3*, pratila sam i analizirala uzgojem biljaka na zemljanom supstratu. Tom prilikom sam učinke toplinskog tretmana pratila izlaganjem biljaka povišenoj temperaturi u stadiju s dva lista (TS2L), stadiju s osam listova (TS8L), odnosno izlaganjem biljaka u oba stadija – s dva i osam listova (TS2L+8L). Analiza četiri morfološka parametra koja opisuju rast rozete – površina i opseg rozete te površina i opseg konveksne ljuske (Prilog 1-4), pokazala je da je toplinski tretman inhibirao rast rozete u većine istraživanih linija, neovisno o razvojnom stadiju. Smanjeni rast nakon izlaganja povišenoj temperaturi zabilježila sam u biljaka linija *oeBPM1*, *amiR-bpm*, *oeDMS3* te biljaka divljeg tipa. U biljaka linije *dms3-1*, koje su povišenoj temperaturi bile izložene u stadiju s dva lista (TS2L), odnosno u oba stadija (TS2L+8L), također sam uočila inhibiciju rasta. Međutim, biljke koje su bile tretirane u stadiju s osam listova (TS8L) pokazale su više vrijednosti morfoloških parametara u odnosu na kontrolne biljke. Analizom genskih pozadina utvrdila sam da su linije *oeBPM1* i *dms3-1* imale generalno niže vrijednosti navedenih morfoloških parametara u usporedbi s linijom *amiR-bpm*, odnosno linijom *oeDMS3* i divljim tipom.

#### 4.1.1. Morfološki parametri

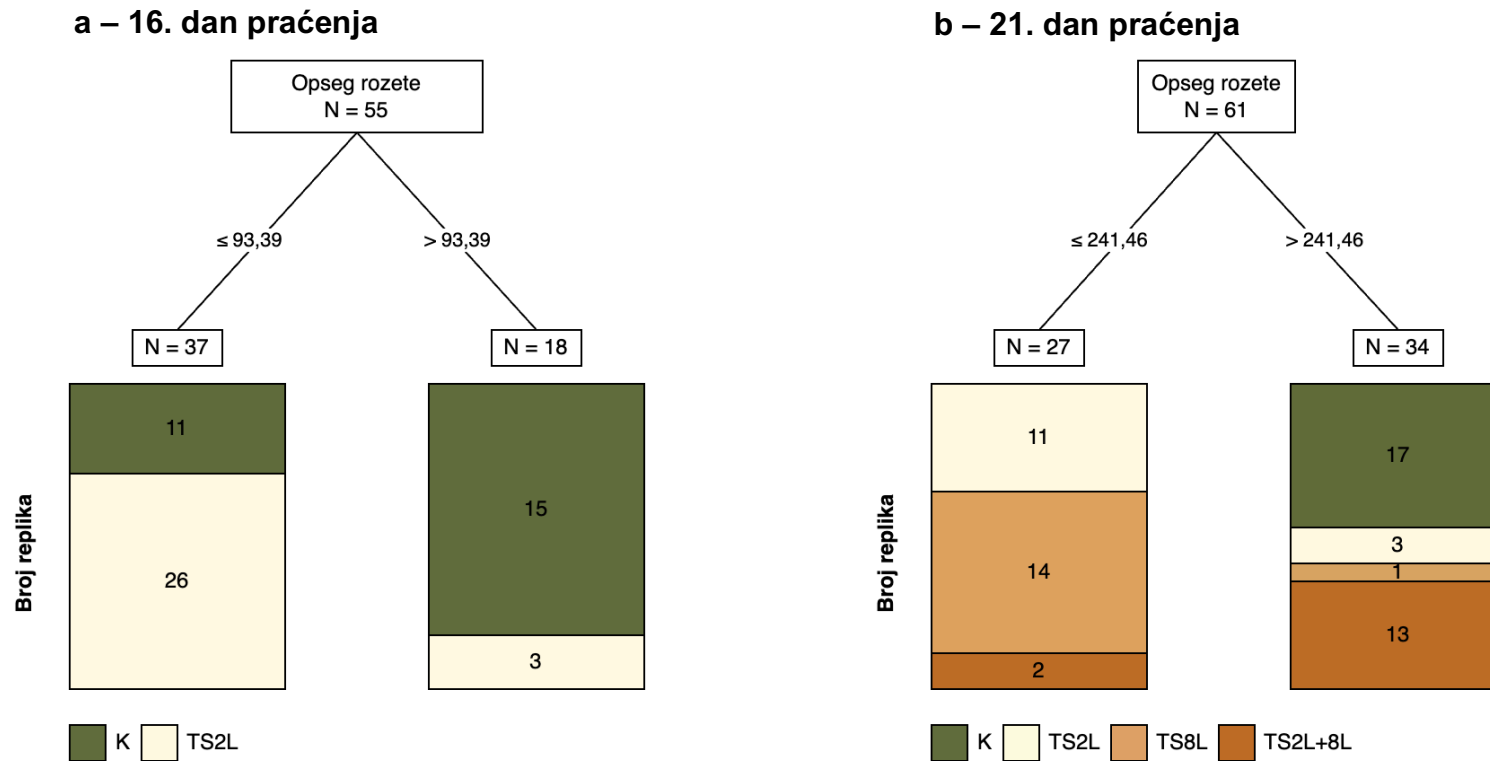
Na morfološke parametre koji su dobiveni praćenjem biljaka pet različitih genskih pozadina (*oeBPM1*, *amiR-bpm*, *oeDMS3*, *dms3-1*, divlji tip) nakon izlaganja povišenoj temperaturi u različitim stadijima razvoja (dva i/ili osam listova u rozeti) primijenila sam statistički model stablo odlučivanja. Na taj sam način odabrala koji dani praćenja su pokazali najizraženije učinke tretmana, te koji od mjerenih parametara se pokazao najosjetljivijim na promjene uzrokovane tretmanima (Prilog 1-4). Detaljno objašnjenje navedenog postupka nalazi se u poglavlju 3.4. Obrada i statistička analiza podataka. S obzirom na to da su biljke bile izložene tretmanima u dva različita razvojna stadija, za divlji tip te svaku od linija s promijenjenom ekspresijom gena *BPM* (*oeBPM1*, *amiR-bpm*), odnosno gena *DMS3* (*oeDMS3*, *dms3-1*) prikazala sam dva statistička modela. Prvi model odnosio se na dane praćenja od trenutka izlaganja biljaka prvom tretmanu pa do izlaganja drugom tretmanu, odnosno od 14. do 19. dana

pokusa. Drugi model obuhvatio je razdoblje od prvog tretmana do kraja pokusa (od 14. do 23. dana).

### ***Divlji tip***

Usporedba točnosti klasifikacije modela generiranih za divlji tip izdvojila je 16. i 21. dan praćenja kao modele s najvećom točnosti – 64,28% odnosno 57,89% (Prilog 5). Dakle, modeli za 16. i 21. dan odabrani su jer su razlike između kontrolnih i tretiranih biljaka bile najizraženije upravo ta dva dana u usporedbi sa svim danima praćenja (od 14. do 23. dana). Model za 16. dan pokazao je odvajanje biljaka tretiranih u stadiju s dva lista (TS2L) od kontrolnih biljaka (K) na temelju opsega rozete (Slika 12a), pri čemu se većina tretiranih biljaka tri dana nakon tretmana izdvojila u grupu koja ima opseg rozete manji ili jednak 93,39 mm, dok je većina kontrolnih biljaka bila u grupi koja ima opseg rozete veći od 93,39 mm. Dakle, izlaganje biljaka divljeg tipa u ranijem stadiju (TS2L) uzrokovalo je smanjenje njihova opsega rozete u usporedbi s kontrolnim biljkama. Model za 21. dan uspješno je grupirao biljke tretirane u stadiju s dva lista (TS2L) i kontrolne biljke (K) prema opsegu rozete (Slika 12b). Za kontrolne biljke bio je karakterističan opseg rozete veći od 241,46 mm, dok je za biljke tretirane u stadiju s dva lista devet dana nakon oporavka bio značajan opseg rozete manji ili jednak 241,46 mm<sup>2</sup>. Model se nije pokazao točnim prilikom grupiranja biljaka tretiranih u stadiju s osam listova (TS8L) i biljaka tretiranih u oba stadija (TS2L+8L). Iz tih rezultata proizlazi da je opseg rozete biljaka iz skupine TS2L bio manji u usporedbi s kontrolnim biljkama i devet dana nakon tretmana. S druge strane, model nije precizno mogao razlučiti razlike između skupina TS2L i TS2L+8L, kao ni između skupina K i TS8L. Ovi rezultati sugeriraju da tretman u ranijem stadiju (TS2L) uzrokuje dugoročne promjene u opsegu rozete biljaka divljeg tipa, dok tretman u kasnijem stadiju (TS8L) nema izraženiji učinak na opseg rozete.

wt



**Slika 12.** Stabla odlučivanja za morfološke parametre u biljaka divljeg tipa praćene (a) 19. dana, odnosno (b) 21. dana. Čvorovi prikazuju varijablu na temelju koje je došlo do najbolje raspodjele podataka (opseg rozete) te ukupan broj bioloških replika (N). Između čvorova, prikazane su granične vrijednosti varijable na temelju koje je napravljena podjela podataka. Stupčasti grafikoni predstavljaju broj bioloških replika grupiranih u određenu skupinu – K (kontrolna skupina), TS2L (skupina izložena toplinskom tretmanu u razvojnom stadiju s dva prava lista), TS8L (skupina izložena toplinskom tretmanu u razvojnom stadiju s osam pravih listova) i TS2L+8L (skupina izložena toplinskom tretmanu u dva razvojna stadija – s dva i osam pravih listova).

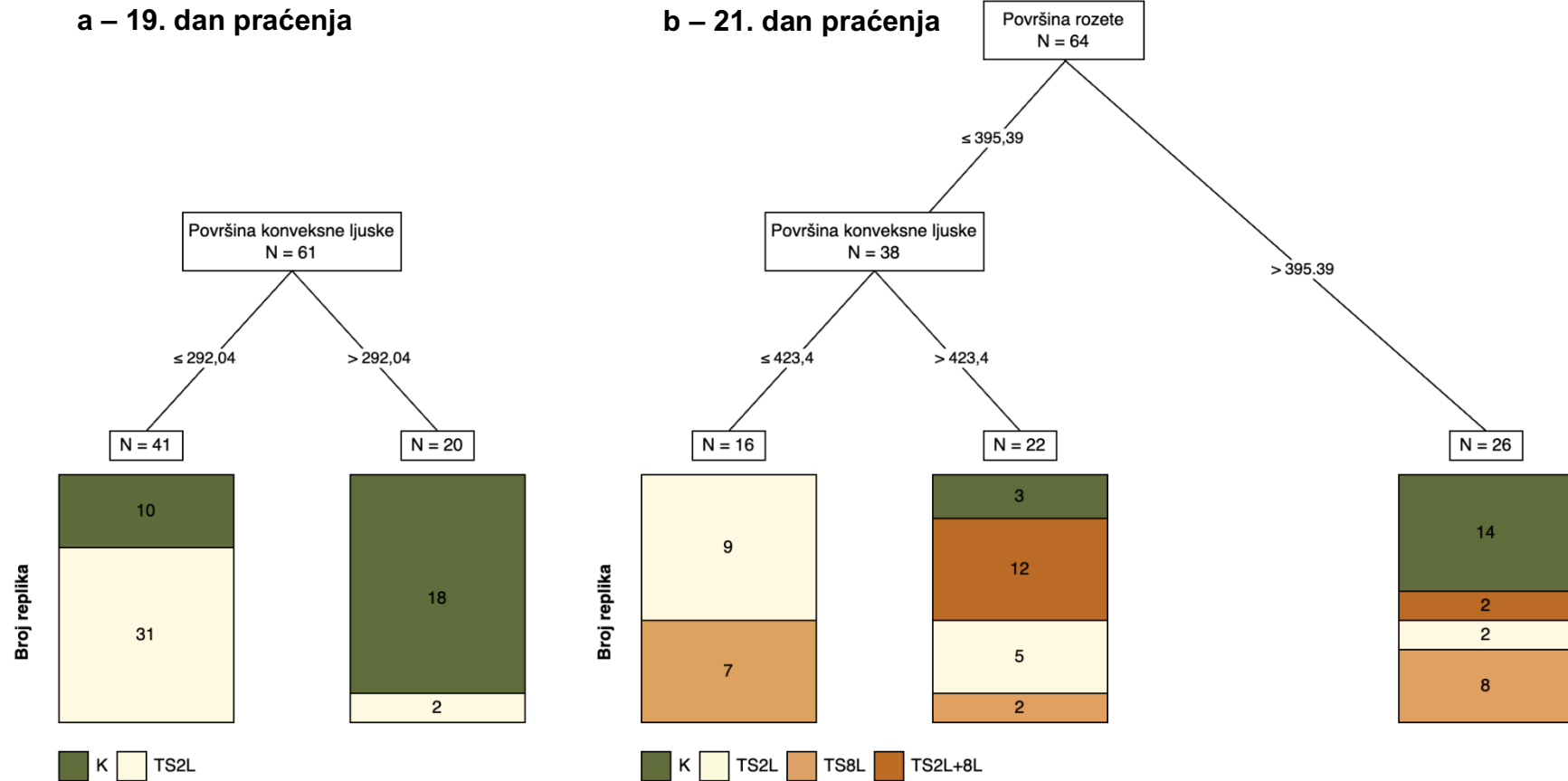
### ***Linije s promijenjenom ekspresijom gena BPM***

Usporedba točnosti klasifikacije modela generiranih za liniju *oeBPM1* izdvojila je modele za 19. i 21. dan praćenja kao modele s najvećom točnošću – 82,35% odnosno 58,33% (Prilog 5). Model za 19. dan pokazao je dobro odvajanje biljaka tretiranih u stadiju s dva lista (TS2L) od kontrolnih biljaka (K) na temelju površine konveksne ljuske (Slika 13a). Većina tretiranih biljaka šest dana nakon izlaganja toplinskom stresu izdvojila se u grupu koja ima površinu konveksne ljuske manju ili jednaku 292,04 mm<sup>2</sup>, dok je većina kontrolnih biljaka bila u grupi koja ima površinu konveksne ljuske veću od 292,04 mm<sup>2</sup>. Iz toga proizlazi da je tretman biljaka linije *oeBPM1* u stadiju s dva lista (TS2L) uzrokovao smanjenje površine konveksne ljuske tretiranih biljaka u usporedbi s kontrolnim biljkama. Model za 21. dan uspješno je grupirao dvije skupine tretiranih biljaka (TS2L, TS2L+8L) i kontrolne biljke (K) prema površini rozete i površini konveksne ljuske (Slika 13b). Tretirane biljke (TS2L, TS2L+8L) imale su površinu rozete manju ili jednaku 395,39 mm<sup>2</sup>, dok je za kontrolne biljke bila značajna površina rozete veća od 395,39 mm<sup>2</sup>. Unutar tretiranih biljaka, one tretirane u oba stadija (TS2L+8L) razlikovale su se od biljaka tretiranih samo u stadiju s dva lista (TS2L) na temelju površine konveksne ljuske. Specifično, većina biljaka iz skupine TS2L+8L imala je površinu ljuske veću od 423,4 mm<sup>2</sup>, za razliku od biljaka iz skupine TS2L. Model nije uspješno grupirao biljke tretirane samo u stadiju s osam listova (TS8L). Dakle, toplinski tretman biljaka u ranom stadiju (TS2L) te tretman biljaka u oba stadija (TS2L+8L) rezultirali su inhibicijom rasta linije *oeBPM1*, što se odrazilo kroz smanjenje površine rozete i konveksne ljuske.

Za razliku od linije *oeBPM1*, usporedba točnosti klasifikacije modela generiranih za liniju *amiR-bpm* pokazala je da su modeli generirani za 16. i 22. dan praćenja imali najveću točnost – 70% odnosno 31,57% (Prilog 5). Model za 16. dan pokazao je odvajanje biljaka na temelju opsega rozete pri čemu su biljke tretirane u stadiju s dva lista tri dana nakon tretmana (TS2L) imale opseg rozete manji ili jednak 108,87 mm, a kontrolne (K) opseg veći od 108,87 mm (Slika 14a). Drugim riječima, izlaganje biljaka u stadiju s dva lista (TS2L) povišenoj temperaturi dovelo je do smanjenja opsega rozete biljaka linije *amiR-bpm*. Model za 22. dan grupirao je skupine linije *amiR-bpm* na temelju površine rozete (Slika 14b), pri čemu su sve tretirane biljke (TS2L, TS8L, TS2L+8L) imale površinu rozete manju ili jednaku 688,11 mm<sup>2</sup>, a većina kontrolnih biljaka (K) površinu veću od 688,11 mm<sup>2</sup>. Iz toga proizlazi da je toplinski tretman, neovisno o razvojnom stadiju, uzrokovao inkibiciju rasta rozete linije *amiR-bpm*.

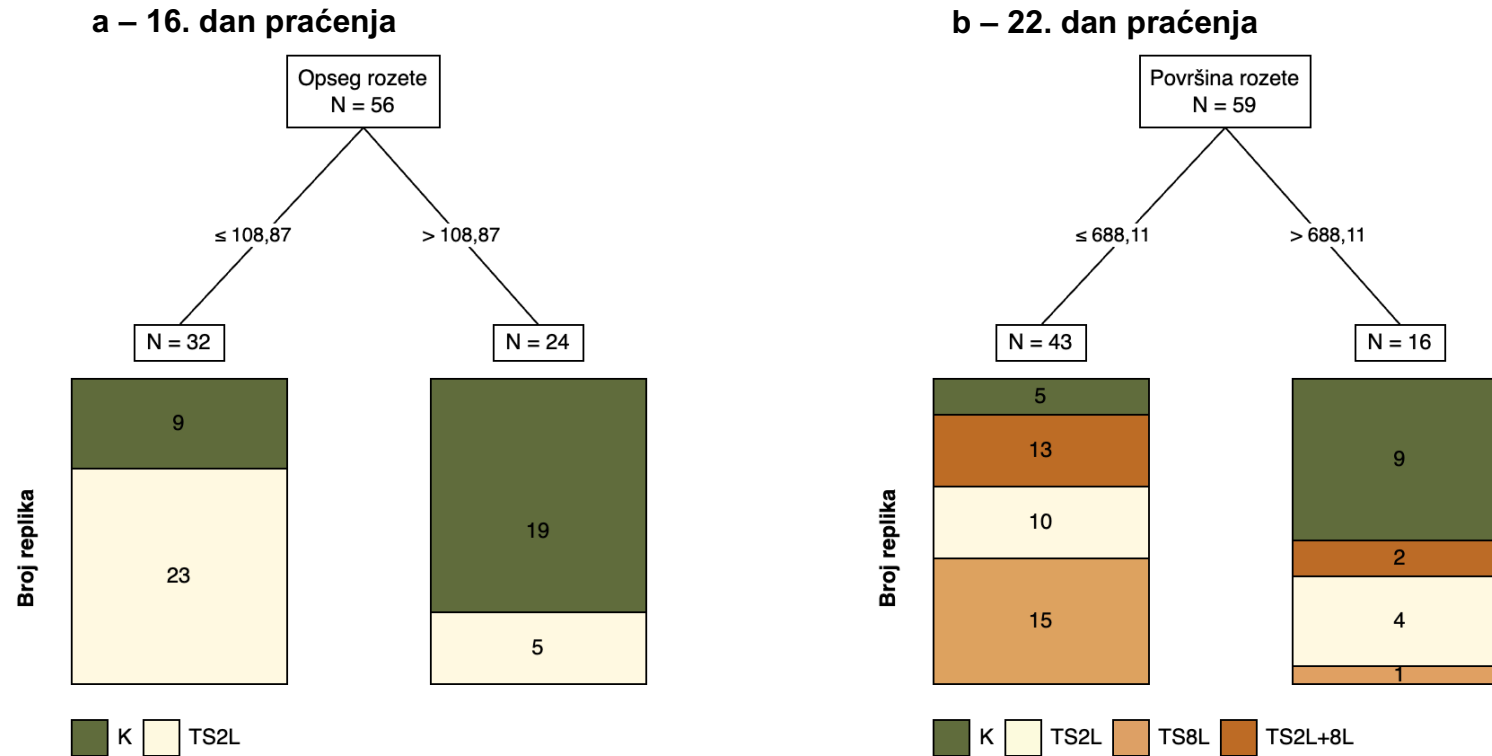


**oeBPM1**



**Slika 13.** Stabla odlučivanja za morfološke parametre u linije s prekomjernom ekspresijom gena *BPM1* (*oeBPM1*) praćene (a) 19. dana, odnosno (b) 21. dana. Čvorovi prikazuju varijable na temelju kojih je došlo do najbolje raspodjele podataka (površina rozete, površina konveksne ljuske) te ukupan broj bioloških replika (N). Između čvorova, prikazane su granične vrijednosti varijable na temelju kojih je napravljena podjela podataka. Stupčasti grafikoni predstavljaju broj bioloških replika grupiranih u određenu skupinu – K (kontrolna skupina), TS2L (skupina izložena toplinskom tretmanu u razvojnom stadiju s dva prava lista), TS8L (skupina izložena toplinskom tretmanu u razvojnom stadiju s osam pravih listova) i TS2L+8L (skupina izložena toplinskom tretmanu u dva razvojna stadija – s dva i osam pravih listova).

*amiR-bpm*

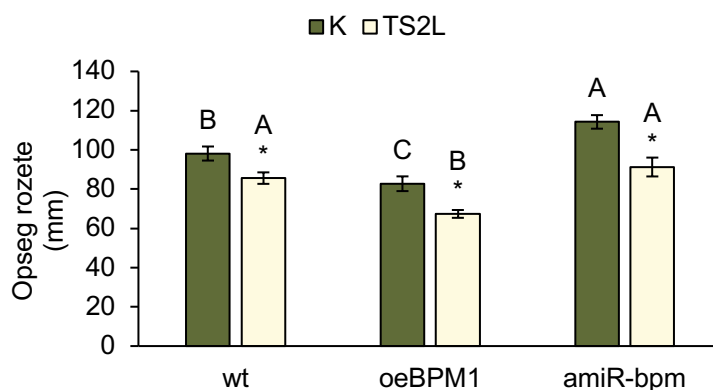


**Slika 14.** Stabla odlučivanja za morfološke parametre u linije sa smanjenom ekspresijom gena *BPM1*, *4*, *5* i *6* (*amiR-bpm*) praćene **(a)** 16. dana, odnosno **(b)** 22. dana. Čvorovi prikazuju varijable na temelju kojih je došlo do najbolje raspodjele podataka (opseg i površina rozete) te ukupan broj bioloških replika (N). Između čvorova, prikazane su granične vrijednosti varijable na temelju kojih je napravljena podjela podataka. Stupčasti grafikoni predstavljaju broj bioloških replika grupiranih u određenu skupinu – K (kontrolna skupina), TS2L (skupina izložena toplinskom tretmanu u razvojnom stadiju s dva prava lista), TS8L (skupina izložena toplinskom tretmanu u razvojnom stadiju s osam pravih listova) i TS2L+8L (skupina izložena toplinskom tretmanu u dva razvojna stadija – s dva i osam pravih listova).

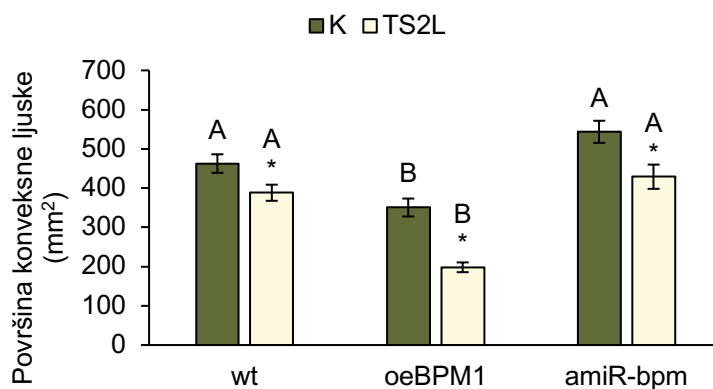
Pomoću stabla odlučivanja, identificirala sam morfološke parametre koji su omogućili razdvajanje različitih skupina linija s promijenjenom ekspresijom gena *BPM* (*oeBPM1*, *amiR-bpm*) u određenim danima praćenja. U daljnjoj analizi međusobno sam usporedila odgovor na toplinski stres između linija *oeBPM1* i *amiR-bpm* te divljeg tipa. Usporedba se temeljila na morfološkim parametrima i danima praćenja izdvojenim prema modelima stabla za linije *oeBPM1* i *amiR-bpm*. Rezultati su, u tekstu koji slijedi, radi lakšeg praćenja i interpretacije prikazani kronološkim redoslijedom, prema danima praćenja.

Budući da se 16. dana praćenja opseg rozete izdvojio kao dobar pokazatelj razlika između kontrolnih (K) i tretiranih biljaka (TS2L) sa smanjenom ekspresijom gena *BPM1*, 4, 5 i 6 (*amiR-bpm*), napravila sam usporedbu podataka za obje linije s promijenjenom ekspresijom gena *BPM* (*oeBPM1*, *amiR-bpm*) s onima divljeg tipa. Pokazalo se da treći dan nakon tretmana biljke linije *amiR-bpm* imaju značajno manji opseg rozete u odnosu na kontrolne biljke (Slika 15). Također, usporedba kontrolnih i tretiranih biljaka linije *oeBPM1* te biljaka divljeg tipa pokazala je da izlaganje povišenoj temperaturi dovodi do smanjenja opsega rozete. Usporedba kontrolnih biljaka različitih genskih pozadina pokazala je da biljke linije *amiR-bpm* imaju značajno veći opseg rozete 16. dana u odnosu na biljke linije *oeBPM1* i divljeg tipa, dok su biljke linije *oeBPM1* imale značajno manji opseg rozete u odnosu na divlji tip.

Površina konveksne ljuste 19. dana praćenja pokazala se također kao dobar morfološki pokazatelj tretmana povišenom temperaturom u stadiju s dva lista. Tretirane biljke (TS2L) obje linije (*oeBPM1*, *amiR-bpm*) te divljeg tipa imale su značajno manju površinu konveksne ljuste šest dana nakon tretmana u odnosu na pripadajuće kontrolne biljke (K) (Slika 16). S obzirom na različitu gensku pozadinu, površinu konveksne ljuste kontrolnih biljaka linija *oeBPM1* i *amiR-bpm* te divljeg tipa usporedila sam međusobno. Ustanovila sam da biljke linije *amiR-bpm* i divljeg tipa imaju značajno veću površinu konveksne ljuste u odnosu na biljke linije *oeBPM1*. Međutim, između kontrolnih biljaka linije *amiR-bpm* i divljeg tipa nisam utvrdila značajnu razliku u površini konveksne ljuste.

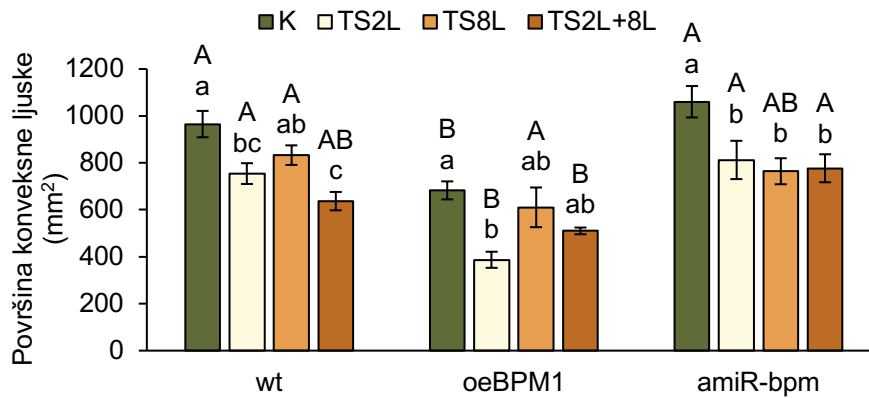


**Slika 15.** Opseg rozete biljaka uročnjaka (*Arabidopsis thaliana*) divljeg tipa (wt), linije s prekomjernom ekspresijom gena *BPM1* (*oeBPM1*) te linije sa smanjenom ekspresijom gena *BPM1*, 4, 5 i 6 (*amiR-bpm*) izloženih temperaturi od 40 °C tijekom šest sati u razvojnom stadiju s dva prava lista (TS2L). Kontrolne skupine (K) svake linije rasle su tijekom pokusa na 24 °C. Rezultati su prikazani za 16. dan praćenja, što je za biljke TS2L bilo tri dana nakon tretmana, te su izraženi kao srednja vrijednost najmanje deset bioloških replika ± standardna pogreška. Odgovor kontrolnih i tretiranih biljaka (K i TS2L) unutar pojedine linije (wt, *oeBPM1* ili *amiR-bpm*) analiziran je Studentovim *t*-testom; značajne razlike ( $p \leq 0,05$ ) obilježene su zvjezdicom (\*). Međusobna usporedba odgovora kontrolnih (K), odnosno tretiranih (TS2L) biljaka različitih linija (wt, *oeBPM1* i *amiR-bpm*) provedena je jednosmjernom analizom varijance i *post hoc* testom Tukey HSD; značajne razlike ( $p \leq 0,05$ ) obilježene su različitim velikim slovima.



**Slika 16.** Površina konveksne ljuške biljaka uročnjaka (*Arabidopsis thaliana*) divljeg tipa (wt), linije s prekomjernom ekspresijom gena *BPM1* (*oeBPM1*) te linije sa smanjenom ekspresijom gena *BPM1*, 4, 5 i 6 (*amiR-bpm*) izloženih temperaturi od 40 °C tijekom šest sati u razvojnom stadiju s dva prava lista (TS2L). Kontrolne skupine (K) svake linije rasle su tijekom pokusa na 24 °C. Rezultati su prikazani za 19. dan praćenja, što je za biljke TS2L bilo šest dana nakon tretmana, te su izraženi kao srednja vrijednost najmanje deset bioloških replika ± standardna pogreška. Odgovor kontrolnih i tretiranih biljaka (K i TS2L) unutar pojedine linije (wt, *oeBPM1* ili *amiR-bpm*) analiziran je Studentovim *t*-testom; značajne razlike ( $p \leq 0,05$ ) obilježene su zvjezdicom (\*). Međusobna usporedba odgovora kontrolnih (K), odnosno tretiranih (TS2L) biljaka različitih linija (wt, *oeBPM1* i *amiR-bpm*) provedena je jednosmjernom analizom varijance i *post hoc* testom Tukey HSD; značajne razlike ( $p \leq 0,05$ ) obilježene su različitim velikim slovima.

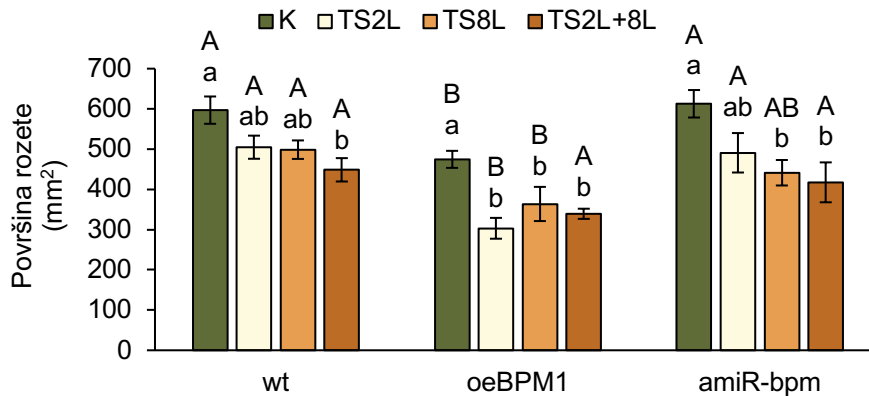
Osim 19. dana, površina konveksne ljuske istaknula se kao koristan pokazatelj učinka tretmana i 21. dana prilikom praćenja oporavka biljaka nakon tretmana u stadiju s dva lista (TS2L) te učinka tretmana na biljke u stadiju s osam listova (TS8L), odnosno u oba stadija (TS2L+8L). Rezultati su pokazali da je površina konveksne ljuske kod biljaka koje su se oporavljale nakon tretmana u stadiju s dva lista (TS2L) i dalje manja u odnosu na kontrolne biljke (K), neovisno o istraživanoj liniji (Slika 17). S druge strane, biljke koje su bile izložene toplinskom tretmanu u stadiju s osam listova (TS8L) ili u oba razvojna stadija (TS2L+8L), pokazale su različiti odgovor na tretman, a koji je ovisio o njihovoj genskoj pozadini. Kod biljaka divljeg tipa tretiranih u oba razvojna stadija (TS2L+8L) zabilježeno je značajno smanjenje površine konveksne ljuske jedan dan nakon ponovljenog tretmana, dok istovremeno biljke tretirane samo u stadiju s osam listova (TS8L) nisu pokazale značajne razlike u odnosu na kontrolne biljke (K). Biljke linije *oeBPM1* tretirane u stadiju s osam listova (TS8L) nisu se značajno razlikovale od kontrolnih biljaka (K). Također, značajna razlika nije uočena niti usporedbom kontrolnih biljaka i biljaka iz skupine TS2L+8L, iako se površina konveksne ljuske u tretiranih biljaka smanjila za 25%. Zanimljivo, sve tretirane skupine linije *amiR-bpm* (TS2L, TS8L, TS2L+8L) pokazale su značajno manju površinu konveksne ljuske u usporedbi s kontrolnim biljkama (K). Kao i 19. dana praćenja, usporedba kontrolnih biljaka pokazala je da biljke linije *amiR-bpm* te divljeg tipa imaju značajno veću površinu konveksne ljuske 21. dana u odnosu na liniju *oeBPM1*. Između kontrolnih biljaka linije *amiR-bpm* te divljeg tipa nije zabilježena značajna razlika.



**Slika 17.** Površina konveksne ljuške biljaka uročnjaka (*Arabidopsis thaliana*) divljeg tipa (wt), linije s prekomjernom ekspresijom gena *BPM1* (*oeBPM1*) te linije sa smanjenom ekspresijom gena *BPM1*, 4, 5 i 6 (*amiR-bpm*) izloženih temperaturi od 40 °C tijekom šest sati u različitim razvojnim stadijima: s dva prava lista (TS2L), osam pravih listova (TS8L) ili u oba stadija – s dva te osam pravih listova (TS2L+8L). Kontrolne skupine (K) svake linije rasle su tijekom pokusa na 24 °C. Rezultati su prikazani za 21. dan praćenja, što je za biljke TS2L bilo osam dana nakon tretmana, a za biljke T8L i TS2L+8L jedan dan nakon tretmana. Rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti najmanje deset bioloških replika ± standardna pogreška. Odgovor kontrolnih i tretiranih biljaka (K, TS2L, TS8L i TS2L+8L) unutar pojedine linije (wt, *oeBPM1* ili *amiR-bpm*) analiziran je jednosmjernom analizom varijance i *post hoc* testom Tukey HSD; značajne razlike ( $p \leq 0,05$ ) obilježene su različitim malim slovima. Međusobna usporedba odgovora kontrolnih (K), odnosno tretiranih (TS2L, TS8L ili TS2L+8L) biljaka različitih linija (wt, *oeBPM1* i *amiR-bpm*) provedena je jednosmjernom analizom varijance i *post hoc* testom Tukey HSD; značajne razlike ( $p \leq 0,05$ ) obilježene su različitim velikim slovima.

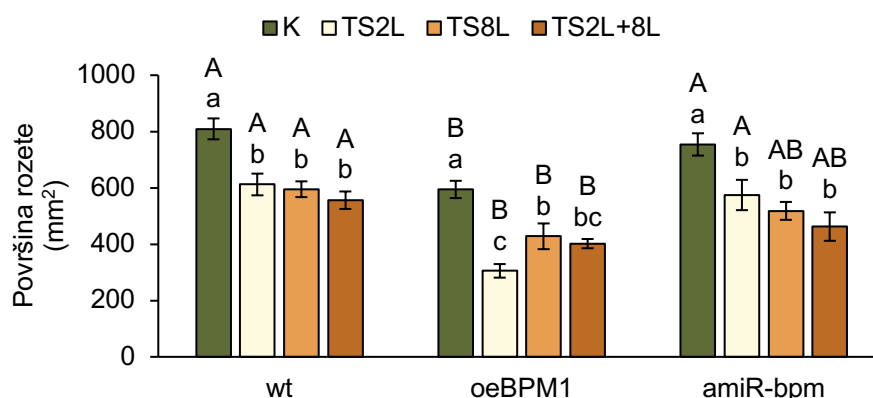
Uz površinu konveksne ljuške, 21. dana praćenja primijećene su i značajne razlike u površini rozete između tretiranih i kontrolnih biljaka linija *oeBPM1* i *amiR-bpm* te divljeg tipa (Slika 18). Biljke divljeg tipa pokazale su najveću osjetljivost nakon tretmana u oba razvojna stadija (TS2L+8L) u odnosu na kontrolne biljke (K). Istovremeno, biljke tretirane u stadiju s dva lista (TS2L) ili u stadiju s osam listova (TS8L) nisu pokazale značajne razlike u površini rozete u usporedbi s kontrolnim biljkama (K), odnosno s biljkama tretiranim u oba stadija (TS2L+8L). Približno sličan obrazac zabilježen je i kod linije *amiR-bpm*. Naime, biljke tretirane u stadiju s osam listova (TS8L) te biljke tretirane u oba razvojna stadija (TS2L+8L) imale su značajno manju površinu rozete u odnosu na kontrolne biljke (K). Međutim, iako se površina rozete biljaka tretiranih u ranijem stadiju (TS2L) smanjila za 20% u odnosu na kontrolne biljke, nije zabilježena značajna razlika u odnosu na kontrolne biljke i biljke iz skupina TS8L i TS2L+8L. Sve tretirane skupine linije *oeBPM1*, neovisno o razvojnom stadiju u kojem su biljke izložene povišenoj temperaturi (TS2L, TS8L, TS2L+8L), pokazale su značajno manju površine rozete u odnosu na kontrolne biljke (K). Usporedba kontrolnih biljaka pokazala je da biljke linije *amiR-bpm* te divljeg tipa imaju značajno veću površinu rozete 21. dana u odnosu na liniju

*oeBPM1* (Slika 18). Između kontrolnih biljaka linije *amiR-bpm* te divljeg tipa nije zabilježena značajna razlika.



**Slika 18.** Površina rozete biljaka uročnjaka (*Arabidopsis thaliana*) divljeg tipa (wt), linije s prekomjernom ekspresijom gena *BPM1* (*oeBPM1*) te linije sa smanjenom ekspresijom gena *BPM1*, 4, 5 i 6 (*amiR-bpm*) izloženih temperaturi od 40 °C tijekom šest sati u različitim razvojnim stadijima: s dva prava lista (TS2L), osam pravih listova (TS8L) ili u oba stadija – s dva te osam pravih listova (TS2L+8L). Kontrolne skupine (K) svake linije rasle su tijekom pokusa na 24 °C. Rezultati su prikazani za 21. dan praćenja, što je za biljke TS2L bilo osam dana nakon tretmana, a za biljke T8L i TS2L+8L jedan dan nakon tretmana. Rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti najmanje deset bioloških replika ± standardna pogreška. Odgovor kontrolnih i tretiranih biljaka (K, TS2L, TS8L i TS2L+8L) unutar pojedine linije (wt, *oeBPM1* ili *amiR-bpm*) analiziran je jednosmjernom analizom varijance i *post hoc* testom Tukey HSD; značajne razlike ( $p \leq 0,05$ ) obilježene su različitim malim slovima. Međusobna usporedba odgovora kontrolnih (K), odnosno tretiranih (TS2L, TS8L ili TS2L+8L) biljaka različitih linija (wt, *oeBPM1* i *amiR-bpm*) provedena je jednosmjernom analizom varijance i *post hoc* testom Tukey HSD; značajne razlike ( $p \leq 0,05$ ) obilježene su različitim velikim slovima.

Površina rozete biljaka pokazala se kao dobar pokazatelj učinka toplinskog tretmana i 22. dana praćenja (Slika 19). Neovisno o razvojnom stadiju u kojem su biljke izložene povišenoj temperaturi, sve tretirane skupine (TS2L, TS8L, TS2L+8L) linije *amiR-bpm* i divljeg tipa pokazale su značajno manju površine rozete u odnosu na kontrolne biljke (K). Sličan obrazac zabilježen je i kod linije *oeBPM1*. Naime, sve tretirane biljke pokazale su značajno smanjenje površine rozete u odnosu na kontrolne biljke. Međutim, biljke tretirane u ranijem stadiju (TS2L) pokazale su se osjetljivijima u odnosu na biljke tretirane u kasnijem stadiju (TS8L). Pri tome se biljke tretirane u oba stadija (TS2L+8L) nisu značajno razlikovale od prethodno spomenutih skupina. Usporedba kontrolnih biljaka pokazala je da biljke linije *amiR-bpm* te divljeg tipa imaju značajno veću površinu rozete 22. dana u odnosu na liniju *oeBPM1* (Slika 19). Između kontrolnih biljaka linije *amiR-bpm* te divljeg tipa nije zabilježena značajna razlika.



**Slika 19.** Površina rozete biljaka uročnjaka (*Arabidopsis thaliana*) divljeg tipa (wt), linije s prekomjernom ekspresijom gena *BPM1* (*oeBPM1*) te linije sa smanjenom ekspresijom gena *BPM1*, 4, 5 i 6 (*amiR-bpm*) izloženih temperaturi od 40 °C tijekom šest sati u različitim razvojnim stadijima: s dva prava lista (TS2L), osam pravih listova (TS8L) ili u oba stadija – s dva te osam pravih listova (TS2L+8L). Kontrolne skupine (K) svake linije rasle su tijekom pokusa na 24 °C. Rezultati su prikazani za 22. dan praćenja, što je za biljke TS2L bilo devet dana nakon tretmana, a za biljke T8L i TS2L+8L dva dana nakon tretmana. Rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti najmanje deset bioloških replika ± standardna pogreška. Odgovor kontrolnih i tretiranih biljaka (K, TS2L, TS8L i TS2L+8L) unutar pojedine linije (wt, *oeBPM1* ili *amiR-bpm*) analiziran je jednosmjernom analizom varijance i *post hoc* testom Tukey HSD; značajne razlike ( $p \leq 0,05$ ) obilježene su različitim malim slovima. Međusobna usporedba odgovora kontrolnih (K), odnosno tretiranih (TS2L, TS8L ili TS2L+8L) biljaka različitih linija (wt, *oeBPM1* i *amiR-bpm*) provedena je jednosmjernom analizom varijance i *post hoc* testom Tukey HSD; značajne razlike ( $p \leq 0,05$ ) obilježene su različitim velikim slovima.

### **Linije s promijenjenom ekspresijom gena *DMS3***

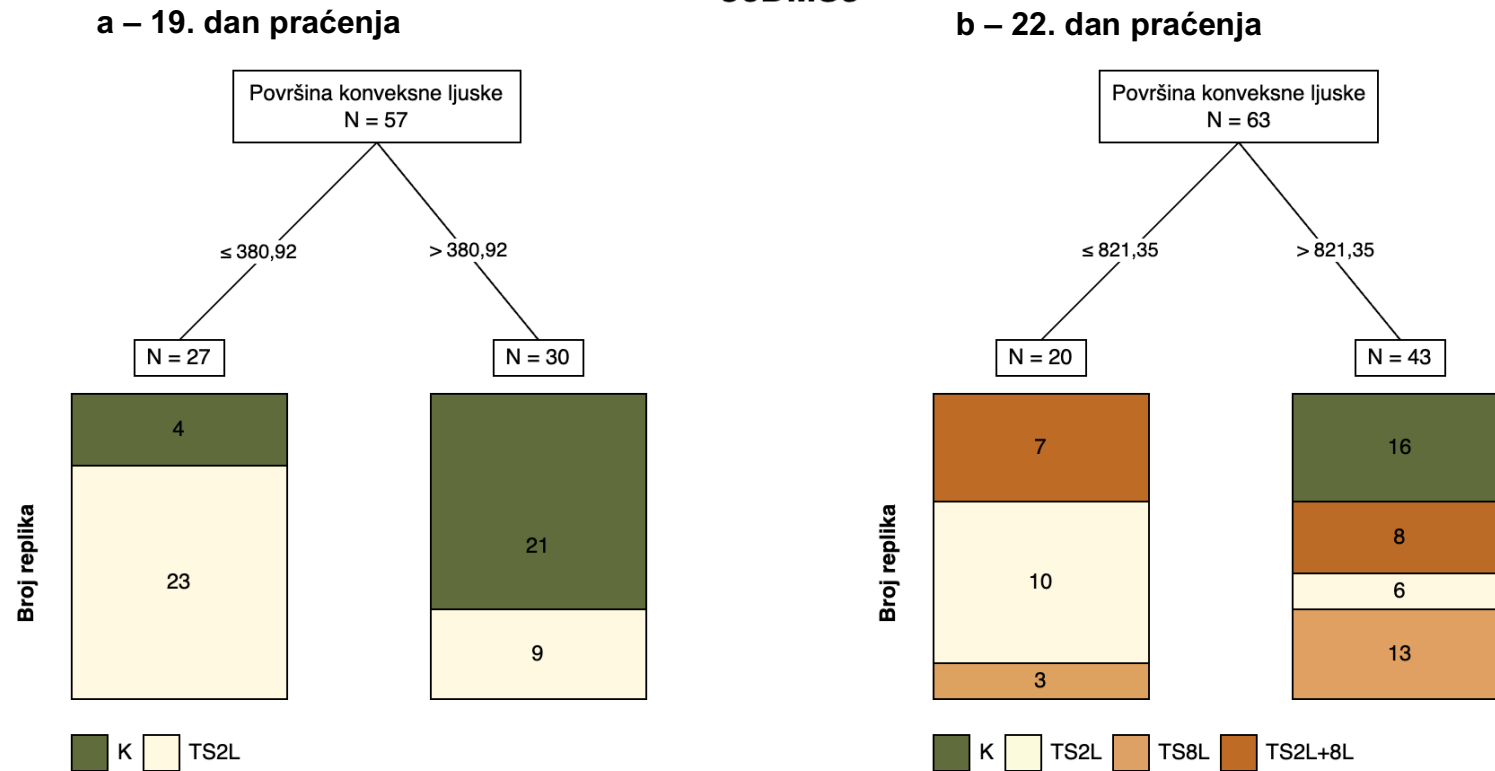
Usporedba točnosti klasifikacije modela generiranih za liniju *oeDMS3* izdvojila je 19. i 22. dan praćenja kao modele s najvećom točnosti – 60% odnosno 54,54% (Prilog 5). Model za 19. dan pokazao je odvajanje biljaka tretiranih u stadiju s dva lista (TS2L) od kontrolnih biljaka (K) na temelju površine konveksne ljuske (Slika 20a), pri čemu se većina tretiranih biljaka šest dana nakon tretmana izdvojila u grupu koja ima površinu konveksne ljuske manju ili jednaku 380,92 mm<sup>2</sup>, dok je većina kontrolnih biljaka bila u grupi koja ima površinu konveksne ljuske veću od 380,92 mm<sup>2</sup>. Dakle, tretman biljaka linije *oeDMS3* u stadiju s dva lista (TS2L) u prvim danima nakon stresa uzrokovao je smanjenje površine konveksne ljuske. Model za 22. dan uspješno je grupirao biljke tretirane u stadiju s dva lista (TS2L) i kontrolne biljke (K) prema površini konveksne ljuske (Slika 20b). Za kontrolne biljke bila je karakteristična površina konveksne ljuske iznad 821,35 mm<sup>2</sup>, dok je za biljke tretirane u stadiju s dva lista devet dana nakon oporavka bila značajna površina manja ili jednaka 821,35 mm<sup>2</sup>. Model se nije pokazao



točnim prilikom grupiranja biljaka tretiranih u stadiju s osam listova (TS8L) i biljaka tretiranih u oba stadija (TS2L+8L). Iz toga proizlazi da je površina konveksne ljuske biljaka iz skupine TS2L bila manja u usporedbi s kontrolnim biljkama i devet dana nakon tretmana. S druge strane, model nije precizno mogao razlučiti razlike između skupina TS2L i TS2L+8L, kao ni između skupina K i TS8L. Dakle, tretman u ranijem stadiju (TS2L) uzrokuje dugoročne promjene u površini konveksne ljuske linije *oeDMS3*, dok tretman u kasnijem stadiju (TS8L) nema izraženiji učinak na površinu konveksne ljuske.

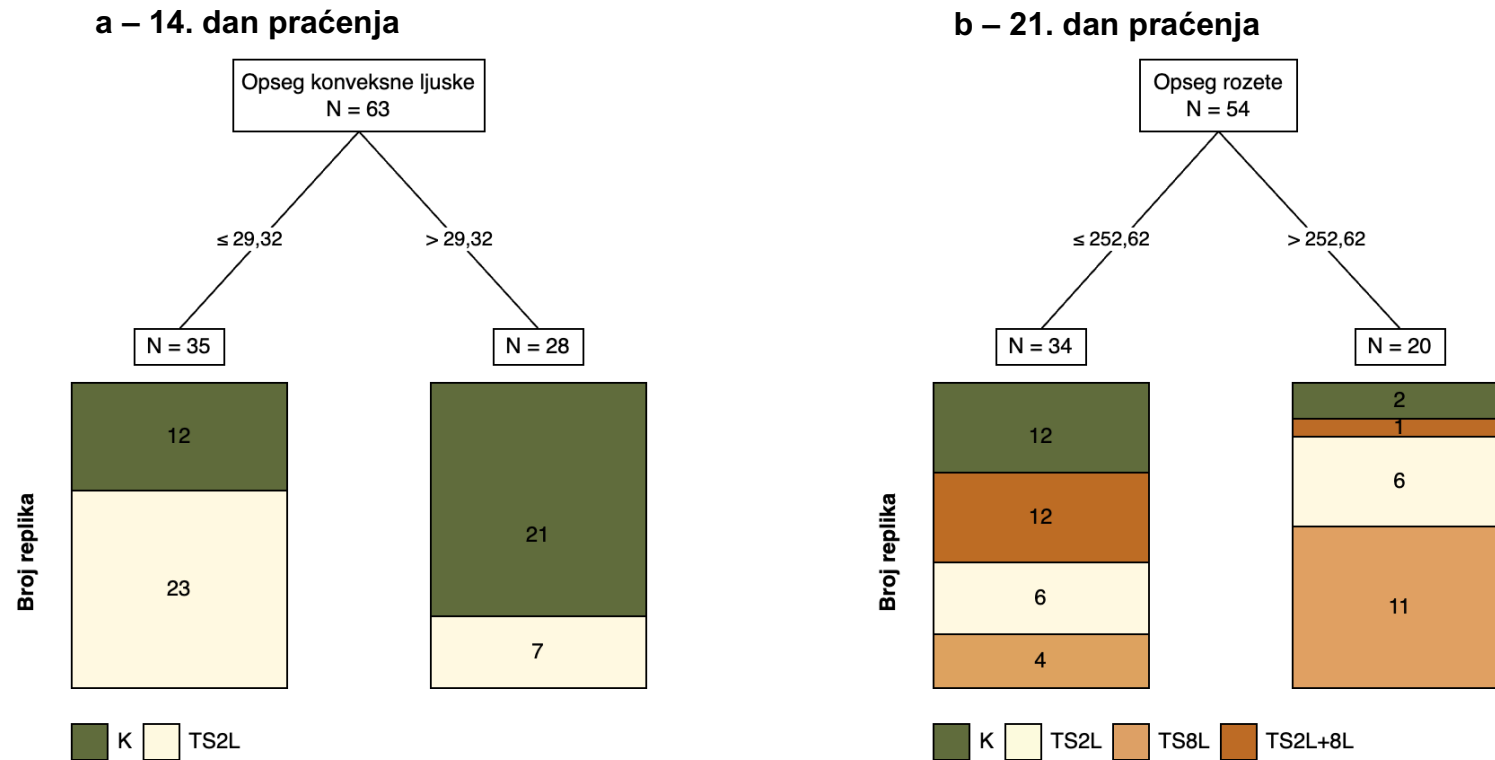
U odnosu na liniju *oeDMS3*, usporedba točnosti klasifikacije modela generiranih za liniju *dms3-1* pokazala je da su modeli generirani za 14. i 21. dan praćenja imali najveću točnost – 64,28% odnosno 40% (Prilog 5). Model za 14. dan pokazao je razdvajanje biljaka tretiranih u stadiju s dva lista (TS2L) od kontrolnih biljaka (K) na temelju opsega konveksne ljuske (Slika 21a). Većina tretiranih biljaka imala je jedan dan nakon tretmana opseg konveksne ljuske manji ili jednak 29,32 mm, dok je većina kontrolnih biljaka imala opseg ljuske veći od 29,32 mm. Drugim riječima, izlaganje biljaka u stadiju s dva lista (TS2L) dovelo je do smanjenja opsega konveksne ljuske biljaka linije *dms3-1*. Model za 21. dan grupirao je biljke linije *dms3-1* u dvije skupine na temelju opsega rozete (Slika 21b), pri čemu su kontrolne biljke te biljke tretirane u ranijem stadiju (TS2L), odnosno biljke tretirane u oba razvojna stadija (TS2L+8L) imale opseg rozete manji ili jednak 252,62 mm. S druge strane, za biljke tretirane u stadiju s osam listova (TS8L) karakterističan je bio opseg veći od 252,62 mm. Iz toga proizlazi da je toplinski tretman djelovao poticajno na rast biljaka iz skupine koje su bile tretirane u kasnijem razvojnom stadiju (TS8L) u odnosu na kontrolnu skupinu te skupine TS2L i TS2L+8L.

*oeDMS3*



**Slika 20.** Stabla odlučivanja za morfološke parametre u linije s prekomjernom ekspresijom gena *DMS3* (*oeDMS3*) praćene (a) 19. dana, odnosno (b) 22. dana. Čvorovi prikazuju varijablu na temelju koje je došlo do najbolje raspodjele podataka (površina konveksne ljuske) te ukupan broj bioloških replika (N). Između čvorova, prikazane su granične vrijednosti varijable na temelju kojih je napravljena podjela podataka. Stupčasti grafikoni predstavljaju broj bioloških replika grupiranih u određenu skupinu – K (kontrolna skupina), TS2L (skupina izložena toplinskom tretmanu u razvojnom stadiju s dva prava lista), TS8L (skupina izložena toplinskom tretmanu u razvojnom stadiju s osam pravih listova) i TS2L+8L (skupina izložena toplinskom tretmanu u dva razvojna stadija – s dva i osam pravih listova).

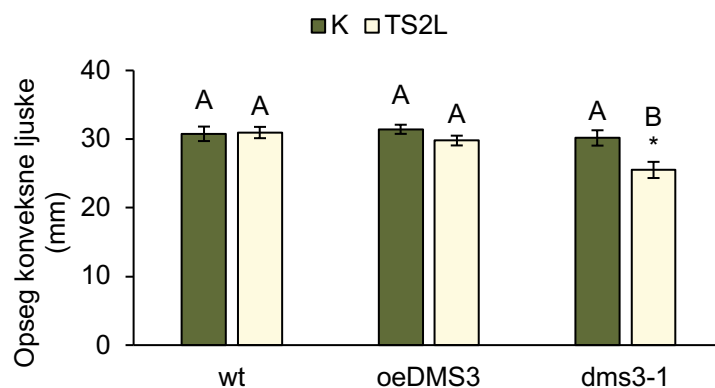
**dms3-1**



**Slika 21.** Stabla odlučivanja za morfološke parametre u linije s mutiranim genom *DMS3* (*dms3-1*) praćene (a) 14. dana, odnosno (b) 21. dana. Čvorovi prikazuju varijable na temelju kojih je došlo do najbolje raspodjele podataka (opseg konveksne ljuske, opseg rozete) te ukupan broj bioloških replika (N). Između čvorova, prikazane su granične vrijednosti varijable na temelju kojih je napravljena podjela podataka. Stupčasti grafikoni predstavljaju broj bioloških replika grupiranih u određenu skupinu – K (kontrolna skupina), TS2L (skupina izložena toplinskom tretmanu u razvojnom stadiju s dva prava lista), TS8L (skupina izložena toplinskom tretmanu u razvojnom stadiju s osam pravih listova) i TS2L+8L (skupina izložena toplinskom tretmanu u dva razvojna stadija – s dva i osam pravih listova).

U daljnjoj analizi međusobno sam usporedila odgovor na toplinski stres između linija s promijenjenom ekspresijom gena *DMS3* (*oeDMS3* i *dms3-1*) te divljeg tipa. Usporedba se temeljila na morfološkim parametrima i danima praćenja izdvojenim prema modelima stabla za linije *oeDMS3* i *dms3-1*, a rezultati su prikazani kronološki.

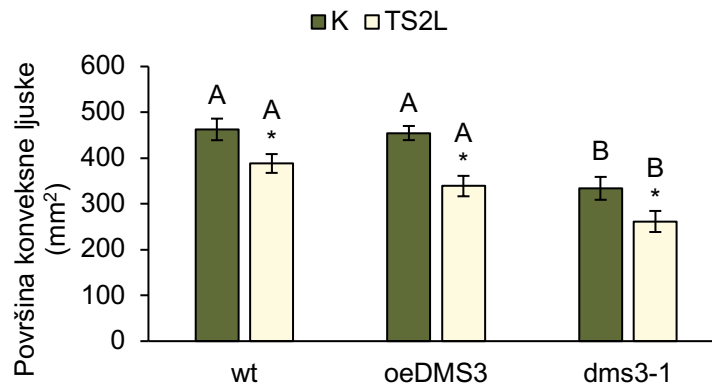
Opseg konveksne ljuske izmjeren 14. dana praćenja istaknuo se kao dobar morfološki pokazatelj za procjenu učinka toplinskog tretmana u stadiju s dva lista (TS2L) kod biljaka linije *dms3-1*. Naime, tretirane biljke linije *dms3-1* imale su jedan dan nakon tretmana značajno manji opseg konveksne ljuske u odnosu na kontrolne biljke (Slika 22). Međutim, usporedbom kontrolnih i tretiranih biljaka linije *oeDMS3*, odnosno biljaka divljeg tipa nije dokazana značajna razlika u opsegu konveksne ljuske između tih grupa biljaka. Također, usporedba genskih pozadina, odnosno kontrolnih biljaka istraživanih linija pokazala je da ne postoji značajna razlika u opsegu konveksne ljuske 14. dana između linija *oeDMS3* i *dms3-1* te divljeg tipa (Slika 22).



**Slika 22.** Opseg konveksne ljuske biljaka uročnjaka (*Arabidopsis thaliana*) divljeg tipa (wt), linije s prekomjernom ekspresijom gena *DMS3* (*oeDMS3*) te linije s mutiranim genom *DMS3* (*dms3-1*) izloženih temperaturi od 40 °C tijekom šest sati u razvojnom stadiju s dva prava lista (TS2L). Kontrolne skupine (K) svake linije rasle su tijekom pokusa na 24 °C. Rezultati su prikazani za 14. dan praćenja, što je za biljke TS2L bilo jedan dan nakon tretmana, te su izraženi kao srednja vrijednost najmanje deset bioloških replika ± standardna pogreška. Odgovor kontrolnih i tretiranih biljaka (K i TS2L) unutar pojedine linije (wt, *oeDMS3* ili *dms3-1*) analiziran je Studentovim *t*-testom; značajne razlike ( $p \leq 0,05$ ) obilježene su zvjezdicom (\*). Međusobna usporedba odgovora kontrolnih (K), odnosno tretiranih (TS2L) biljaka različitih linija (wt, *oeDMS3* i *dms3-1*) provedena je jednosmjernom analizom varijance i *post hoc* testom Tukey HSD; značajne razlike ( $p \leq 0,05$ ) obilježene su različitim velikim slovima.

Površina konveksne ljuske 19. dana praćenja pokazala se također kao dobar morfološki pokazatelj tretmana povišenom temperaturom u stadiju s dva lista (TS2L) (Slika 23). Neovisno o genskoj pozadini, tretirane biljke su šest dana nakon tretmana pokazale značajno manju

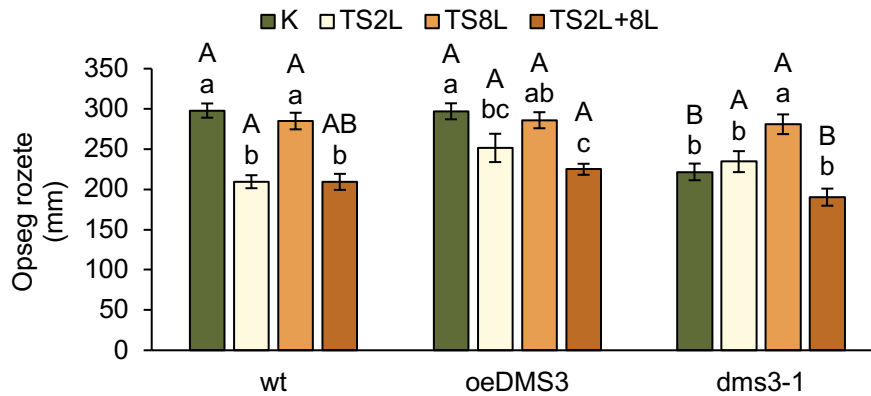
površinu konveksne ljske u odnosu na kontrolne biljke. Usporedba kontrolnih biljaka linija *oeDMS3* i *dms3-1* te divljeg tipa pokazala je da biljke linije *dms3-1* imaju značajno manju površinu u odnosu na druge dvije skupine. Istovremeno, nije zabilježena značajna razlika u površini konveksne ljske između biljaka linije *oeDMS3* i divljeg tipa.



**Slika 23.** Površina konveksne ljske biljaka uročnjaka (*Arabidopsis thaliana*) divljeg tipa (wt), linije s prekomjernom ekspresijom gena *DMS3* (*oeDMS3*) te linije s mutiranim genom *DMS3* (*dms3-1*) izloženih temperaturi od 40 °C tijekom šest sati u razvojnog stadiju s dva prava lista (TS2L). Kontrolne skupine (K) svake linije rasle su tijekom pokusa na 24 °C. Rezultati su prikazani za 19. dan praćenja, što je za biljke TS2L bilo šest dana nakon tretmana, te su izraženi kao srednja vrijednost najmanje deset bioloških replika ± standardna pogreška. Odgovor kontrolnih i tretiranih biljaka (K i TS2L) unutar pojedine linije (wt, *oeDMS3* ili *dms3-1*) analiziran je Studentovim *t*-testom; značajne razlike ( $p \leq 0,05$ ) obilježene su zvjezdicom (\*). Međusobna usporedba odgovora kontrolnih (K), odnosno tretiranih (TS2L) biljaka različitih linija (wt, *oeDMS3* i *dms3-1*) provedena je jednosmjernom analizom varijance i *post hoc* testom Tukey HSD; značajne razlike ( $p \leq 0,05$ ) obilježene su različitim velikim slovima.

Od analiziranih parametara, opseg rozete izdvojio se kao dobar pokazatelj učinka toplinskog tretmana 21. dana praćenja, odnosno dana kada pratimo oporavak biljaka nakon tretmana provedenog u stadiju s dva lista (TS2L) te učinak tretmana na biljke tretirane u stadiju s osam listova (TS8L) odnosno u oba razvojna stadija (TS2L+8L) (Slika 24). Biljke linije *oeDMS3* i divljeg tipa iz skupine tretirane u stadiju s dva lista (TS2L) te skupine tretirane u oba razvojna stadija (TS2L+8L) imale su značajno manji opseg rozete u odnosu na kontrolne biljke (K), a kod divljeg tipa i u odnosu na biljke tretirane u stadiju s osam listova (TS8L). Biljke linije *dms3-1* tretirane u stadiju s osam listova (TS8L) izdvojile su se od drugih skupina, ali i linija. Konkretno, samo su biljke linije *dms3-1* (TS8L) pokazale pozitivan odgovor na povišenu temperaturu kroz značajno povećanje opsega rozete u usporedbi s drugim skupinama (K, TS2L, TS2L+8L). Usporedba kontrolnih biljaka pokazala je kako su biljke linije *dms3-1* imale manji

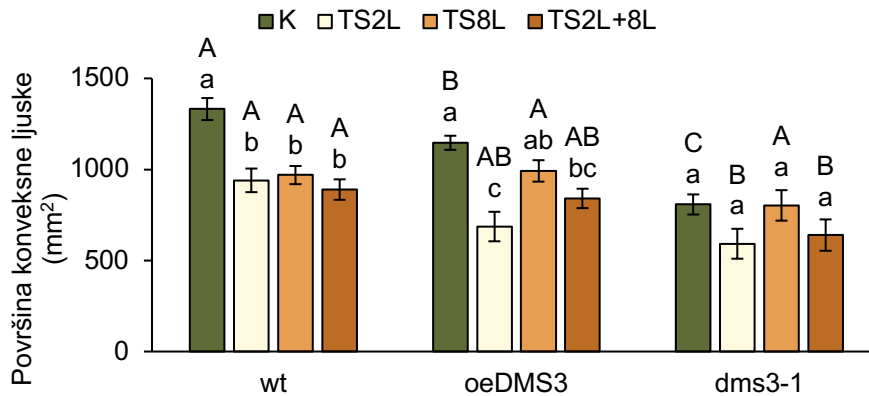
opseg rozete u odnosu na biljke linije *oeDMS3* i divljeg tipa (Slika 24). Istovremeno, nije zabilježena značajna razlika u opsegu rozete između biljaka linije *oeDMS3* i divljeg tipa.



**Slika 24.** Opseg rozete biljaka uročnjaka (*Arabidopsis thaliana*) divljeg tipa (wt), linije s prekomjernom ekspresijom gena *DMS3* (*oeDMS3*) te linije s mutiranim genom *DMS3* (*dms3-1*) izloženih temperaturi od 40 °C tijekom šest sati u različitim razvojnim stadijima: s dva prava lista (TS2L), osam pravih listova (TS8L) ili u oba stadija – s dva te osam pravih listova (TS2L+8L). Kontrolne skupine (K) svake linije rasle su tijekom pokusa na 24 °C. Rezultati su prikazani za 21. dan praćenja, što je za biljke TS2L bilo osam dana nakon tretmana, a za biljke TS8L i TS2L+8L jedan dan nakon tretmana. Rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti najmanje deset bioloških replika ± standardna pogreška. Odgovor kontrolnih i tretiranih biljaka (K, TS2L, TS8L i TS2L+8L) unutar pojedine linije (wt, *oeDMS3* ili *dms3-1*) analiziran je jednosmjernom analizom varijance i *post hoc* testom Tukey HSD; značajne razlike ( $p \leq 0,05$ ) obilježene su različitim malim slovima. Međusobna usporedba odgovora kontrolnih (K), odnosno tretiranih (TS2L, TS8L ili TS2L+8L) biljaka različitih linija (wt, *oeDMS3* i *dms3-1*) provedena je jednosmjernom analizom varijance i *post hoc* testom Tukey HSD; značajne razlike ( $p \leq 0,05$ ) obilježene su različitim velikim slovima.

Za praćenje učinka tretmana na rast biljaka 22. dana, površina konveksne ljuske pokazala se najosjetljivijim parametrom (Slika 25). Neovisno o razvojnom stadiju u kojem je primijenjen toplinski tretman, sve tretirane skupine (TS2L, TS8L, TS2L+8L) divljeg tipa imale su značajno manju površinu ljuske u odnosu na kontrolne biljke (K). Analiza je pokazala da biljke linije *oeDMS3* tretirane u stadiju s dva lista (TS2L) te biljke tretirane u oba stadija (TS2L+8L) imaju značajno manju površinu ljuske u odnosu na kontrolne biljke (K). Istovremeno, biljke tretirane u stadiju s osam listova (TS8L) nisu se razlikovale od kontrolnih biljaka (K) i druge dvije tretirane skupine (TS2L, TS2L+8L). Zanimljivo, kod linije *dms3-1* nije utvrđena statistički značajna razlika između kontrolnih i tretiranih biljaka. Unatoč tome što nije zabilježena statistički značajna razlika u odnosu na kontrolne biljke, treba napomenuti da se površina konveksne ljuske skupina TS2L i TS2L+8L smanjila za 27%, odnosno 21%. Usporedba genskih pozadina pokazala je da je i 22. dana praćenja linija *dms3-1* imala najmanju površinu konveksne

ljuske u usporedbi s linijom *oeDMS3* i divljim tipom (Slika 25). U usporedbi s divljim tipom, manja površina zabilježena je i kod linije *oeDMS3*.



**Slika 25.** Površina konveksne ljuske biljaka uročnjaka (*Arabidopsis thaliana*) divljeg tipa (wt), linije s prekomjernom ekspresijom gena *DMS3* (*oeDMS3*) te linije s mutiranim genom *DMS3* (*dms3-1*) izloženih temperaturi od 40 °C tijekom šest sati u različitim razvojnim stadijima: s dva prava lista (TS2L), osam pravih listova (TS8L) ili u oba stadija – s dva te osam pravih listova (TS2L+8L). Kontrolne skupine (K) svake linije rasle su tijekom pokusa na 24 °C. Rezultati su prikazani za 22. dan praćenja, što je za biljke TS2L bilo devet dana nakon tretmana, a za biljke T8L i TS2L+8L dva dana nakon tretmana. Rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti najmanje deset bioloških replika ± standardna pogreška. Odgovor kontrolnih i tretiranih biljaka (K, TS2L, TS8L i TS2L+8L) unutar pojedine linije (wt, *oeDMS3* ili *dms3-1*) analiziran je jednosmjernom analizom varijance i *post hoc* testom Tukey HSD; značajne razlike ( $p \leq 0,05$ ) obilježene su različitim malim slovima. Međusobna usporedba odgovora kontrolnih (K), odnosno tretiranih (TS2L, TS8L ili TS2L+8L) biljaka različitih linija (wt, *oeDMS3* i *dms3-1*) provedena je jednosmjernom analizom varijance i *post hoc* testom Tukey HSD; značajne razlike ( $p \leq 0,05$ ) obilježene su različitim velikim slovima.

#### 4.1.2. Fluorescencija klorofila *a*

Za razliku od morfoloških parametara, fluorescencija klorofila *a* biljaka uzgajanih od stadija klijanaca do stadija sjemenki mjerena je u četiri vremenske točke te je uključivala analizu vrijednosti jednog parametra – maksimalnog kvantnog prinosa fotosustava II ( $F_v/F_m$ ). Zbog toga sam za analizu učinka toplinskog tretmana i genske pozadine na parametar  $F_v/F_m$  odabrala dvosmjernu analizu varijance kako bih utvrdila koja od dviju navedenih varijabli značajno doprinosi utvrđenim razlikama u vrijednostima  $F_v/F_m$ . Zasebna analiza varijance provedena je za svaku vremensku točku (Tablica 7).

**Tablica 7.** Sažetak dvosmjerne analize varijance koji prikazuje učinke genske pozadine (G), toplinskog tretmana (TS) te njihove interakcije (G×TS) na maksimalni kvantni prinos fotosustava II ( $F_v/F_m$ ) u uročnjaka (*Arabidopsis thaliana*) s promijenjenom ekspresijom gena *BPM*, odnosno gena *DMS3*. Parametar  $F_v/F_m$  izmjeren je u četiri različita dana praćenja biljaka. Prikazane su F-vrijednosti, a rezultati na koje se odnosi  $p > 0,05$  nisu bili značajni (<sup>ns</sup>),  $p \leq 0,05$  odnosi se na značajne razlike (\*),  $p \leq 0,01$  na vrlo značajne (\*\*) te  $p \leq 0,001$  na iznimno značajne (\*\*\*)).

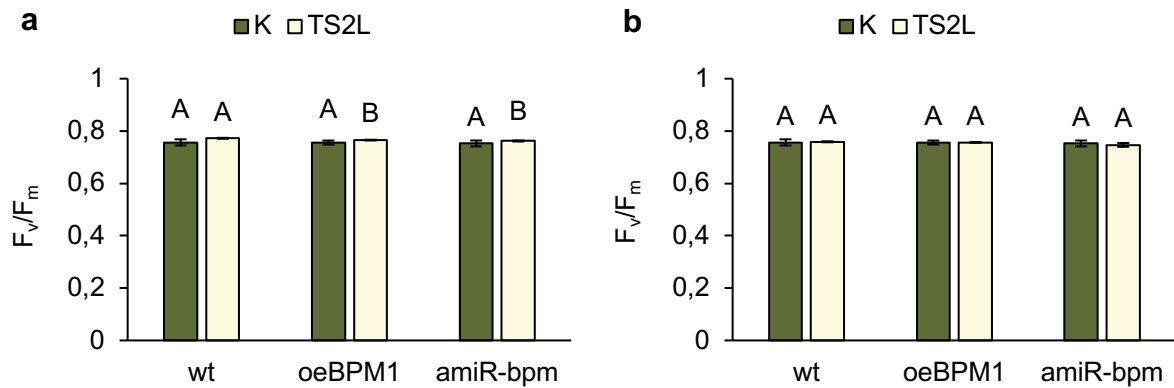
Dan	Linije <i>BPM</i>			Linije <i>DMS3</i>		
	G	TS	G×TS	G	TS	G×TS
13.	4,60*	3,87 <sup>ns</sup>	0,04 <sup>ns</sup>	6,86**	1,33 <sup>ns</sup>	0,91 <sup>ns</sup>
15.	0,61 <sup>ns</sup>	0,02 <sup>ns</sup>	0,14 <sup>ns</sup>	7,14**	2,08*	0,76 <sup>ns</sup>
20.	1,17 <sup>ns</sup>	5,56**	1,53 <sup>ns</sup>	2,99 <sup>ns</sup>	4,52**	1,14 <sup>ns</sup>
22.	0,29 <sup>ns</sup>	1,04 <sup>ns</sup>	0,26 <sup>ns</sup>	2,43 <sup>ns</sup>	1,51 <sup>ns</sup>	0,87 <sup>ns</sup>

Prva vremenska točka, odnosno 13. dan praćenja, odnosi se na mjerenje fluorescencije klorofila *a* odmah nakon izlaganja povišenoj temperaturi biljaka u stadiju s dva lista (TS2L). Analiza dvosmjerne varijance pokazala je da je 13. dana na omjer  $F_v/F_m$  u linijama s promijenjenom ekspresijom gena *BPM* značajno utjecala genska pozadina (Tablica 7). Daljnja analiza pokazala je da tretirane biljke linija *oeBPM1* i *amiR-bpm* imaju značajno niže vrijednosti parametra  $F_v/F_m$  u odnosu na divlji tip (Slika 26a). Analiza druge vremenske točke, a koja se odnosi na mjerenje fluorescencije klorofila *a* dva dana nakon izlaganja biljaka toplinskom stresu (15. dan praćenja), nije pokazala značajne promjene u parametru  $F_v/F_m$  s obzirom na gensku pozadinu, odnosno toplinski tretman (Slika 26b).

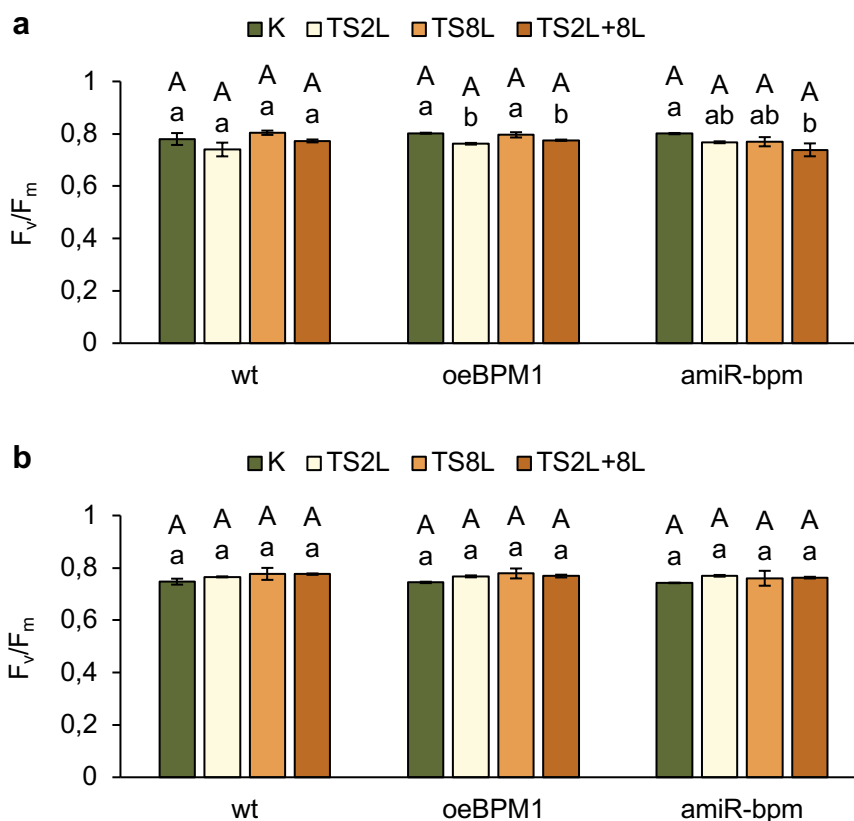
Treća vremenska točka, odnosno 20. dan praćenja, odnosi se na mjerenje fluorescencije klorofila *a* odmah nakon izlaganja biljaka u stadiju osam listova (TS8L) povišenoj temperaturi, odnosno biljaka koje su toplinskom tretmanu bile izložene u oba razvojna stadija (TS2L+8L). Također, fluorescencija je mjerena u biljaka koje su bile izložene toplinskom tretmanu prije sedam dana (TS2L). Odgovor na povišenu temperaturu razlikovao se s obzirom na gensku pozadinu (Tablica 7). Linija *oeBPM1* imala je značajno niže vrijednosti parametra  $F_v/F_m$  u biljaka koje su toplinskom tretmanu bile izložene u oba razvojna stadija (TS2L+8L) te u biljaka koje su bile izložene toplinskom tretmanu prije sedam dana (TS2L) (Slika 27a). S druge strane, linija *amiR-bpm* pokazala je značajno smanjenje vrijednosti parametra  $F_v/F_m$  nakon izlaganja biljaka u stadiju osam listova (TS8L). Kod divljeg tipa nisu uočene značajne promjene u vrijednostima. Dva dana nakon izlaganja povišenoj temperaturi (22. dan praćenja), nije bilo



značajnih promjena u parametru  $F_v/F_m$  s obzirom na gensku pozadinu, odnosno toplinski tretman (Slika 27b).



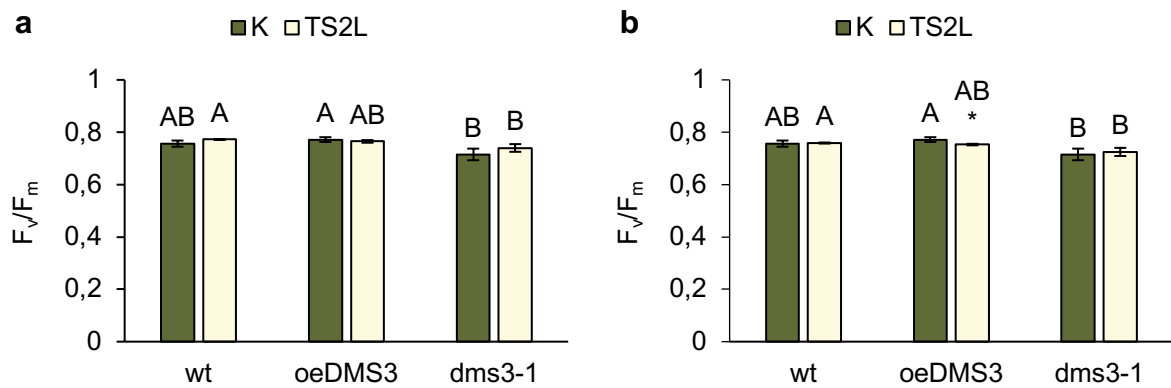
**Slika 26.** Maksimalni kvantni prinos fotosustava II ( $F_v/F_m$ ) izmjeren (a) odmah i (b) dva dana nakon izlaganja biljaka uročnjaka (*Arabidopsis thaliana*) u razvojnem stadiju s dva prava lista (TS2L) temperaturi od 40 °C tijekom šest sati. Kontrolne skupine (K) rasle su tijekom pokusa na 24 °C. Fluorescencija je izmjerena u biljaka divljeg tipa (wt), linije s prekomjernom ekspresijom gena *BPM1* (*oeBPM1*) te linije sa smanjenom ekspresijom gena *BPM1*, 4, 5 i 6 (*amiR-bpm*). Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost najmanje deset bioloških replika  $\pm$  standardna pogreška. Odgovor kontrolnih i tretiranih biljaka (K i TS2L) unutar pojedine linije (wt, *oeBPM1* ili *amiR-bpm*) analiziran je Studentovim *t*-testom te nisu zabilježene značajne razlike ( $p \leq 0,05$ ). Međusobna usporedba odgovora kontrolnih (K), odnosno tretiranih (TS2L) biljaka različitih linija (wt, *oeBPM1* i *amiR-bpm*) provedena je jednosmjernom analizom varijance i *post hoc* testom Tukey HSD; značajne razlike ( $p \leq 0,05$ ) obilježene su različitim velikim slovima.



**Slika 27.** Maksimalni kvantni prinos fotosustava II ( $F_v/F_m$ ) izmjeren (**a**) odmah i (**b**) dva dana nakon izlaganja biljaka uročnjaka (*Arabidopsis thaliana*) u razvojnem stadiju s osam pravih listova (TS8L), odnosno u oba razvojna stadija (TS2L+8L) temperaturi od 40 °C tijekom šest sati. Fluorescencija je izmjerena i u biljaka koje su toplinskom tretmanu bile izložene toplinskom tretmanu prije sedam dana (TS2L). Kontrolne skupine (K) rasle su tijekom pokusa na 24 °C. Istraživane su biljke divljeg tipa (wt), linije s prekomjernom ekspresijom gena *BPM1* (*oeBPM1*) te linije sa smanjenom ekspresijom gena *BPM1*, 4, 5 i 6 (*amiR-bpm*). Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost najmanje deset bioloških replika  $\pm$  standardna pogreška. Odgovor kontrolnih i tretiranih biljaka (K, TS2L, TS8L i TS2L+8L) unutar pojedine linije (wt, *oeBPM1* ili *amiR-bpm*) analiziran je jednosmjernom analizom varijance i *post hoc* testom Tukey HSD; značajne razlike ( $p \leq 0,05$ ) obilježene su različitim malim slovima. Međusobna usporedba odgovora kontrolnih (K), odnosno tretiranih (TS2L, TS8L ili TS2L+8L) biljaka različitih linija (wt, *oeBPM1* i *amiR-bpm*) provedena je jednosmjernom analizom varijance i *post hoc* testom Tukey HSD; značajne razlike ( $p \leq 0,05$ ) obilježene su različitim velikim slovima.

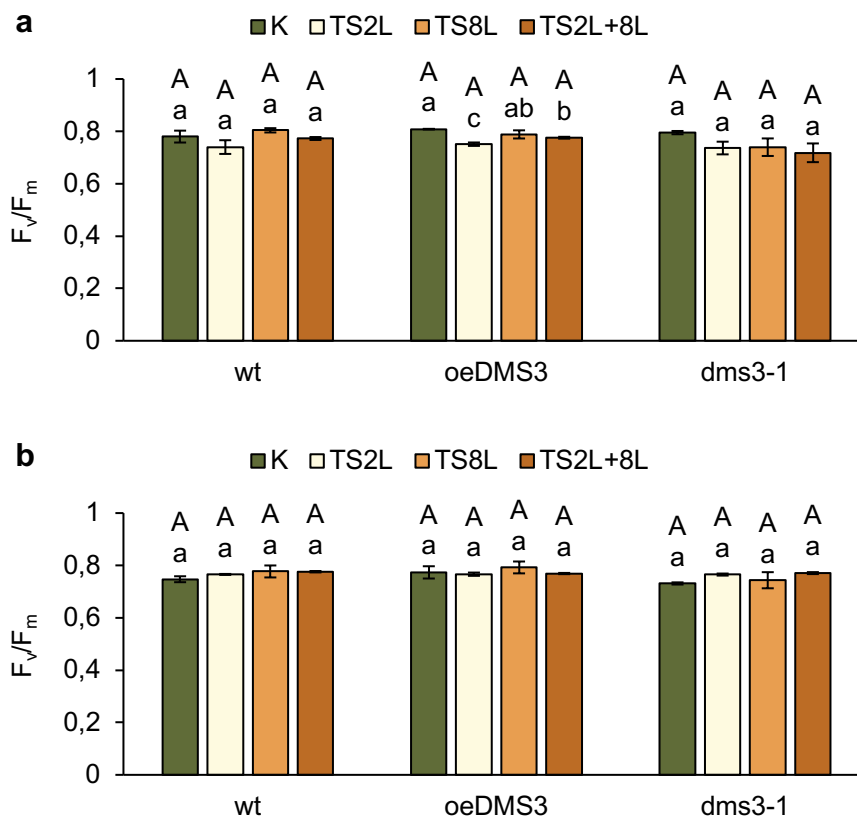
Na parametar  $F_v/F_m$ , analiziran 13. dana praćenja u linijama s promijenjenom ekspresijom gena *DMS3*, značajno je utjecala genska pozadina (Tablica 7). Naime, i kontrolne (K) i tretirane (TS2L) biljke linije *dms3-1* imale su značajno niže vrijednosti parametra  $F_v/F_m$  u odnosu na biljke divljeg tipa i linije *oeDMS3* (Slika 28a). Pri tome su se kontrolne biljke linije *dms3-1* značajno razlikovale od biljaka linije *oeDMS3*, a tretirane biljke od biljaka divljeg tipa.

Identičan trend uočen je i nakon dva dana, odnosno 15. dana praćenja (Slika 28b). Također, u toj vremenskoj točki zabilježeno je značajno smanjenje vrijednosti parametra  $F_v/F_m$  u tretiranih biljaka (TS2L) linije *oeDMS3* u odnosu na kontrolne biljke (K).



**Slika 28.** Maksimalni kvantni prinos fotosustava II ( $F_v/F_m$ ) izmjeren (a) odmah i (b) dva dana nakon izlaganja biljaka uročnjaka (*Arabidopsis thaliana*) u razvojnom stadiju s dva prava lista (TS2L) temperaturi od 40 °C tijekom šest sati. Kontrolne skupine (K) rasle su tijekom pokusa na 24 °C. Fluorescencija je izmjerena u biljaka divljeg tipa (wt), linije s prekomjernom ekspresijom gena *DMS3* (*oeDMS3*) te linije s mutiranim genom *DMS3* (*dms3-1*). Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost najmanje deset bioloških replika  $\pm$  standardna pogreška. Odgovor kontrolnih i tretiranih biljaka (K i TS2L) unutar pojedine linije (wt, *oeDMS3* ili *dms3-1*) analiziran je Studentovim *t*-testom; značajne razlike ( $p \leq 0,05$ ) obilježene su zvjezdicom (\*). Međusobna usporedba odgovora kontrolnih (K), odnosno tretiranih (TS2L) biljaka različitih linija (wt, *oeDMS3* i *dms3-1*) provedena je jednosmjernom analizom varijance i *post hoc* testom Tukey HSD; značajne razlike ( $p \leq 0,05$ ) obilježene su različitim velikim slovima.

U trećoj vremenskoj točki, odnosno 20. dana praćenja, promjene su uočene zbog učinka toplinskog tretmana (Tablica 7). Pri tome je linija *oeDMS3* imala značajno niže vrijednosti parametra  $F_v/F_m$  u biljaka koje su toplinskom tretmanu bile izložene u oba razvojna stadija (TS2L+8L) te u biljaka koje su bile izložene toplinskom tretmanu prije sedam dana (TS2L) (Slika 29a). Istovremeno, u biljaka divljeg tipa i linije *dms3-1* nisu uočene značajne razlike. Dva dana nakon izlaganja povišenoj temperaturi (22. dana praćenja), nije bilo značajnih promjena u parametru  $F_v/F_m$  s obzirom na gensku pozadinu, odnosno toplinski tretman (Slika 29b).

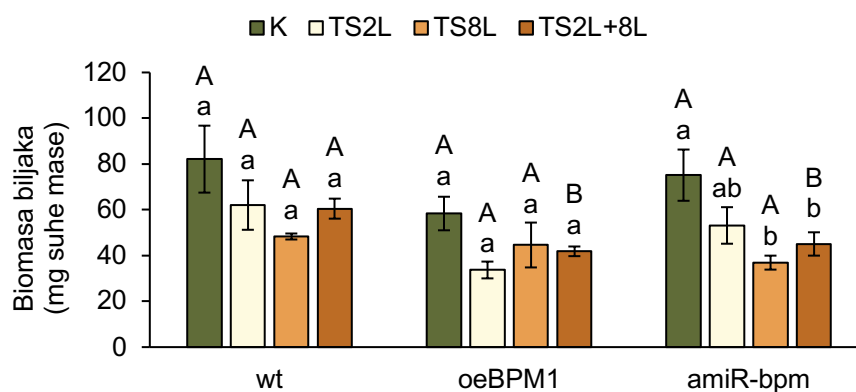


**Slika 29.** Maksimalni kvantni prinos fotosustava II ( $F_v/F_m$ ) izmjeren (a) odmah i (b) dva dana nakon izlaganja biljaka uročnjaka (*Arabidopsis thaliana*) u razvojnom stadiju s osam pravih listova (TS8L), odnosno u oba razvojna stadija (TS2L+8L) temperaturi od 40 °C tijekom šest sati. Fluorescencija je izmjerena i u biljaka koje su bile izložene toplinskom tretmanu prije sedam dana (TS2L). Kontrolne skupine (K) rasle su tijekom pokusa na 24 °C. Istraživane su biljke divljeg tipa (wt), linije s prekomjernom ekspresijom gena *DMS3* (*oeDMS3*) te linije s mutiranim genom *DMS3* (*dms3-1*). Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost najmanje deset bioloških replika  $\pm$  standardna pogreška. Odgovor kontrolnih i tretiranih biljaka (K, TS2L, TS8L i TS2L+8L) unutar pojedine linije (wt, *oeDMS3* ili *dms3-1*) analiziran je jednosmjernom analizom varijance i *post hoc* testom Tukey HSD; značajne razlike ( $p \leq 0,05$ ) obilježene su različitim malim slovima. Međusobna usporedba odgovora kontrolnih (K), odnosno tretiranih (TS2L, TS8L ili TS2L+8L) biljaka različitih linija (wt, *oeDMS3* i *dms3-1*) provedena je jednosmjernom analizom varijance i *post hoc* testom Tukey HSD; značajne razlike ( $p \leq 0,05$ ) obilježene su različitim velikim slovima.

#### 4.1.3. Biomasa biljaka

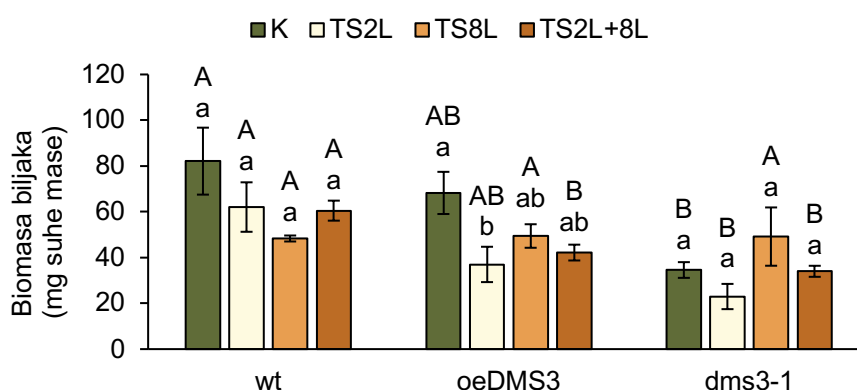
Na biomasu biljaka s promijenjenom ekspresijom gena *BPM*, izmjerenu kao suha masa 29. dana pokusa, utjecali su toplinski tretman ( $F = 7,18$ ,  $p \leq 0,001$ ) i genska pozadina biljke ( $F = 5,09$ ,  $p \leq 0,01$ ) prema rezultatima dvosmjerne analize varijance. U liniji *oeBPM1* i divljem tipu nisu zabilježene značajne promjene u biomasu tretiranih biljaka (TS2L, TS8L, TS2L+8L) u odnosu na kontrolne biljke (K) (Slika 30). Međutim, iako nije dokazan statistički značajan učinak

toplinskog tretmana, zabilježila sam manju biomasu tretiranih biljaka linije *oeBPM1* i divljeg tipa. Najveći učinak na biomasu linije *oeBPM1* zabilježen je nakon tretmana u stadiju s dva lista (TS2L), pri čemu je biomasa bila 42% manja u odnosu na kontrolne vrijednosti. Tretman u stadiju s osam listova (TS8L) i tretman u oba stadija (TS2L+8L) uzrokovali su pad biomase za 24%, odnosno 28%. Kod divljeg tipa je najveći učinak zabilježen nakon tretmana u stadiju s osam listova (TS8L) te je zabilježeno smanjenje biomase za 41% u odnosu na kontrolu. Skupine TS2L i TS2L+8L imale su 24%, odnosno 26% manju biomasu u odnosu na kontrolne biljke. U biljaka linije *amiR-bpm* zabilježen je statistički značajan učinak tretmana. Biljke iz skupina TS8L i TS2L+8L imale su značajno manju biomasu u odnosu na kontrolne biljke. S druge strane, iako je u biljaka iz skupine TS2L biomasa bila manja za 29% u usporedbi s kontrolom, promjena nije bila značajno različita od kontrolnih biljaka te biljaka iz skupina TS8L i TS2L+8L. Usporedba biomase kontrolnih biljaka s promijenjenom ekspresijom gena *BPM* i divljeg tipa nije pokazala značajne razlike.



**Slika 30.** Biomasa biljaka, prikazana kao suha masa, uročnjaka (*Arabidopsis thaliana*) divljeg tipa (wt), linije s prekomjernom ekspresijom gena *BPM1* (*oeBPM1*) te linije sa smanjenom ekspresijom gena *BPM1*, 4, 5 i 6 (*amiR-bpm*) izloženih temperaturi od 40 °C tijekom šest sati u različitim razvojnim stadijima: s dva prava lista (TS2L), osam pravih listova (TS8L) ili u oba stadija – s dva te osam pravih listova (TS2L+8L). Kontrolne skupine (K) svake linije rasle su tijekom pokusa na 24 °C. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost najmanje tri biološke replike ± standardna pogreška. Odgovor kontrolnih i tretiranih biljaka (K, TS2L, TS8L i TS2L+8L) unutar pojedine linije (wt, *oeBPM1* ili *amiR-bpm*) analiziran je jednosmjernom analizom varijance i *post hoc* testom Tukey HSD; značajne razlike ( $p \leq 0,05$ ) obilježene su različitim malim slovima. Međusobna usporedba odgovora kontrolnih (K), odnosno tretiranih (TS2L, TS8L ili TS2L+8L) biljaka različitih linija (wt, *oeBPM1* i *amiR-bpm*) provedena je jednosmjernom analizom varijance i *post hoc* testom Tukey HSD; značajne razlike ( $p \leq 0,05$ ) obilježene su različitim velikim slovima.

Na biomasu biljaka u linija s promijenjenom ekspresijom gena *DMS3* značajno su utjecali toplinski tretman ( $F = 3,28, p \leq 0,05$ ) i genska pozadina ( $F = 9,34, p \leq 0,001$ ). Biomasa biljaka linije *oeDMS3* bila je značajno manja nakon tretmana u stadiju s dva lista (TS2L) u odnosu na kontrolne biljke (Slika 31). Biljke tretirane u stadiju s osam listova (TS8L) te biljke tretirane u oba stadija (TS2L+8L) nisu se značajno razlikovale od kontrolnih biljaka, unatoč zabilježenom smanjenju biomase od 28%, odnosno 36%. U liniji *dms3-1* nisu uočene statistički značajne promjene u biomasi između kontrolnih i tretiranih biljaka, neovisno o razvojnem stadiju u kojem je primijenjena povišena temperatura (TS2L, TS8L, TS2L+8L). Međutim, u biljaka iz skupine TS2L biomasa se smanjila za 34% u odnosu na kontrolne vrijednosti, dok se u biljaka iz skupine TS8L biomasa povećala za 42%. Usporedba biomase biljaka prikupljenih od kontrolnih linija s promijenjenom ekspresijom gena *DMS3* i divljeg tipa pokazala je da linija *dms3-1* ima značajno manju biomasu u odnosu na biljke divljeg tipa (Slika 31). Linija *oeDMS3* nije se značajno razlikovala od linije *dms3-1* i divljeg tipa.

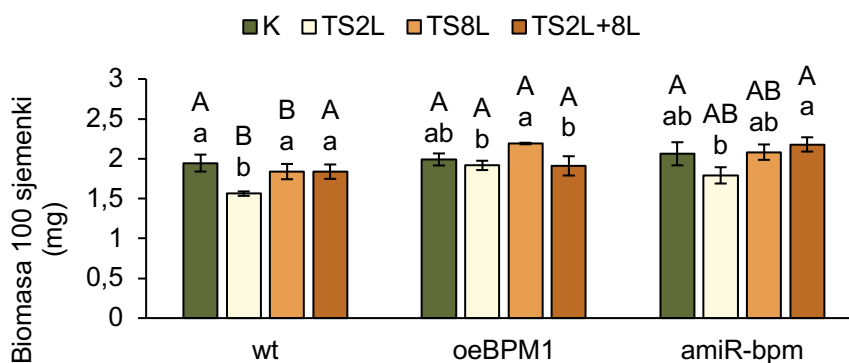


**Slika 31.** Biomasa biljaka, prikazana kao suha masa, uročnjaka (*Arabidopsis thaliana*) divljeg tipa (wt), linije s prekomjernom ekspresijom gena *DMS3* (*oeDMS3*) te linije s mutiranim genom *DMS3* (*dms3-1*) izloženih temperaturi od 40 °C tijekom šest sati u različitim razvojnim stadijima: s dva prava lista (TS2L), osam pravih listova (TS8L) ili u oba stadija – s dva te osam pravih listova (TS2L+8L). Kontrolne skupine (K) svake linije rasle su tijekom pokusa na 24 °C. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost najmanje tri biološke replike ± standardna pogreška. Odgovor kontrolnih i tretiranih biljaka (K, TS2L, TS8L i TS2L+8L) unutar pojedine linije (wt, *oeDMS3* ili *dms3-1*) analiziran je jednosmjernom analizom varijance i *post hoc* testom Tukey HSD; značajne razlike ( $p \leq 0,05$ ) obilježene su različitim malim slovima. Međusobna usporedba odgovora kontrolnih (K), odnosno tretiranih (TS2L, TS8L ili TS2L+8L) biljaka različitih linija (wt, *oeDMS3* i *dms3-1*) provedena je jednosmjernom analizom varijance i *post hoc* testom Tukey HSD; značajne razlike ( $p \leq 0,05$ ) obilježene su različitim velikim slovima.

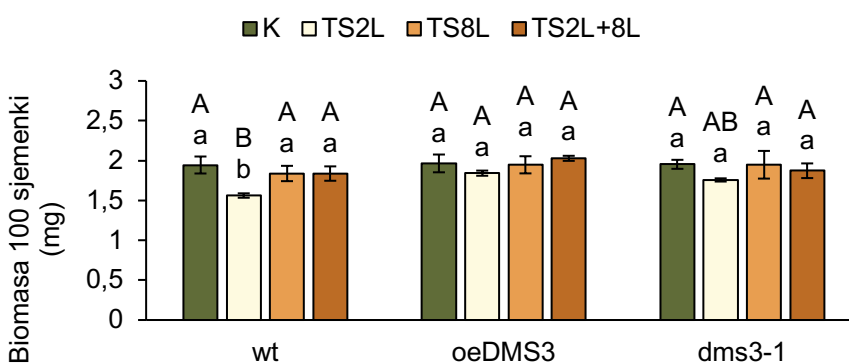
#### 4.1.4. Biomasa i klijavost sjemenki

Na biomasu sjemenki u linijama s promijenjenom ekspresijom gena *BPM* utjecali su toplinski tretman ( $F = 5,63$ ,  $p \leq 0,01$ ) i genska pozadina ( $F = 7,63$ ,  $p \leq 0,01$ ). U usporedbi s kontrolom (K), značajno manja biomasa sjemenki izmjerena je u divljem tipu kod biljaka iz skupine TS2L koje su toplinskom stresu bile izložene u razvojnom stadiju s dva lista (Slika 32). U usporedbi s kontrolom (K), nisu zabilježene značajne promjene u biomasu sjemenki kod biljaka koje su bile tretirane u razvojnom stadiju s osam listova (TS8L) te onih koje su bile tretirane u oba stadija – s dva i osam listova (TS2L+8L). S druge strane, sjemenke prikupljene od kontrolnih biljaka (K) linije *oeBPM1* nisu se značajno razlikovale od tretiranih skupina. Međutim, biomasa sjemenki prikupljenih od biljaka koje su bile tretirane u stadiju s dva lista (TS2L) te onih koje su bile tretirane u oba stadija (TS2L+8L) bila je značajno manja u odnosu na sjemenke prikupljene od biljaka tretiranih u stadiju s osam listova (TS8L). Kod linije *amiR-bpm*, sjemenke prikupljene od kontrolnih biljaka (K) te biljaka tretiranih u stadiju s osam listova (TS8L) nisu se značajno razlikovale od preostale dvije tretirane skupine (TS2L, TS2L+8L). Ali je biomasa sjemenki prikupljenih od biljaka koje su bile tretirane u stadiju s dva lista (TS2L) bila značajno manja u odnosu na sjemenke prikupljene od biljaka tretiranih u oba stadija (TS2L+8L). Usporedba biomase sjemenki prikupljenih od kontrolnih biljaka s promijenjenom ekspresijom gena *BPM* i divljeg tipa nije pokazala značajne razlike (Slika 32).

Na biomasu sjemenki u linija s promijenjenom ekspresijom gena *DMS3* značajno je utjecao toplinski tretman ( $F = 4,04$ ,  $p \leq 0,05$ ). Značajno manja biomasa sjemenki izmjerena je u divljem tipu kod biljaka koje su toplinskom stresu bile izložene u razvojnom stadiju s dva lista (TS2L) (Slika 33). Međutim, nisu zabilježene značajne razlike u biomasu sjemenki prikupljenih od kontrolnih (K) i tretiranih biljaka linija *oeDMS3* i *dms3-1*, neovisno o stadiju kad je povišena temperatura primijenjena (TS2L, TS8L, TS2L+8L). Također, usporedba biomase sjemenki prikupljenih od kontrolnih biljaka s promijenjenom ekspresijom gena *DMS3* i divljeg tipa nije pokazala značajne razlike (Slika 33).



**Slika 32.** Biomasa sjemenki uročnjaka (*Arabidopsis thaliana*) prikupljenih od biljaka divljeg tipa (wt), linije s prekomjernom ekspresijom gena *BPM1* (*oeBPM1*) te linije sa smanjenom ekspresijom gena *BPM1*, 4, 5 i 6 (*amiR-bpm*) koje su bile izložene temperaturi od 40 °C tijekom šest sati u različitim razvojnim stadijima: s dva prava lista (TS2L), osam pravih listova (TS8L) ili u oba stadija – s dva te osam pravih listova (TS2L+8L). Kontrolne skupine (K) svake linije rasle su tijekom pokusa na 24 °C. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost tri biološke replike ± standardna pogreška. Odgovor kontrolnih i tretiranih biljka (K, TS2L, TS8L i TS2L+8L) unutar pojedine linije (wt, *oeBPM1* ili *amiR-bpm*) analiziran je jednosmjernom analizom varijance i *post hoc* testom Tukey HSD; značajne razlike ( $p \leq 0,05$ ) obilježene su različitim malim slovima. Međusobna usporedba odgovora kontrolnih (K), odnosno tretiranih (TS2L, TS8L ili TS2L+8L) biljaka različitih linija (wt, *oeBPM1* i *amiR-bpm*) provedena je jednosmjernom analizom varijance i *post hoc* testom Tukey HSD; značajne razlike ( $p \leq 0,05$ ) obilježene su različitim velikim slovima.



**Slika 33.** Biomasa sjemenki uročnjaka (*Arabidopsis thaliana*) prikupljenih od biljaka divljeg tipa (wt), linije s prekomjernom ekspresijom gena *DMS3* (*oeDMS3*) te linije s mutiranim genom *DMS3* (*dms3-1*) koje su bile izložene temperaturi od 40 °C tijekom šest sati u različitim razvojnim stadijima: s dva prava lista (TS2L), osam pravih listova (TS8L) ili u oba stadija – s dva te osam pravih listova (TS2L+8L). Kontrolne skupine (K) svake linije rasle su tijekom pokusa na 24 °C. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost tri biološke replike ± standardna pogreška. Odgovor kontrolnih i tretiranih biljka (K, TS2L, TS8L i TS2L+8L) unutar pojedine linije (wt, *oeDMS3* ili *dms3-1*) analiziran je jednosmjernom analizom varijance i *post hoc* testom Tukey HSD; značajne razlike ( $p \leq 0,05$ ) obilježene su različitim malim slovima. Međusobna usporedba odgovora kontrolnih (K), odnosno tretiranih (TS2L, TS8L ili TS2L+8L) biljaka različitih linija (wt, *oeDMS3* i *dms3-1*) provedena je jednosmjernom analizom varijance i *post hoc* testom Tukey HSD; značajne razlike ( $p \leq 0,05$ ) obilježene su različitim velikim slovima.

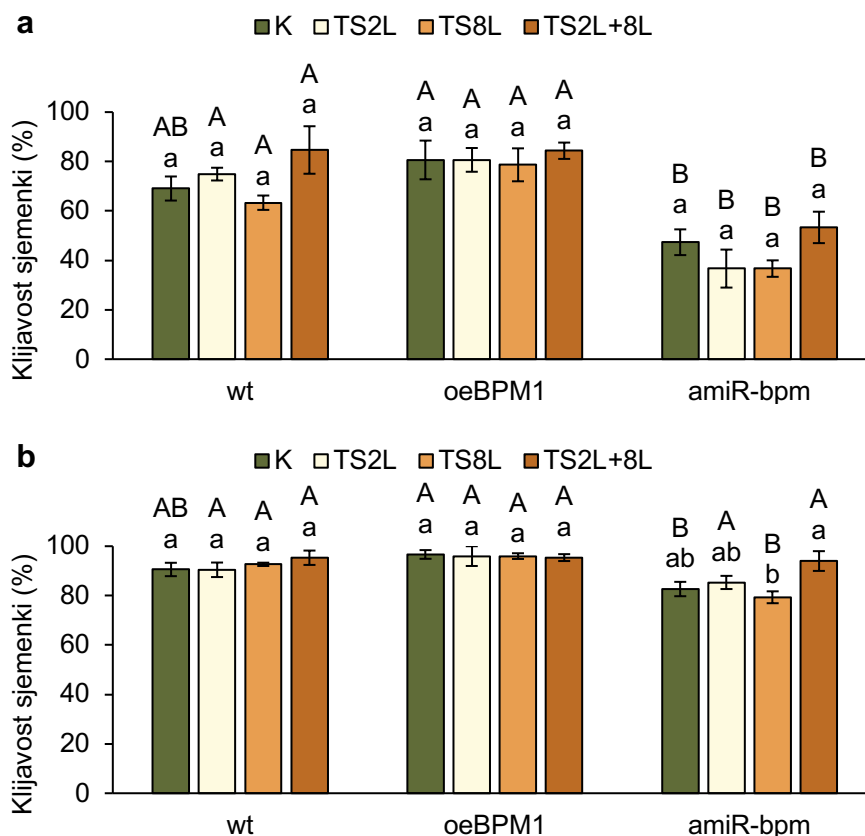


S obzirom na to da je klijavost sjemenki praćena tijekom pet dana (Prilog 6), dvosmjernu analizu varijance provela sam za svaki pojedini dan kako bih utvrdila kako genska pozadina i toplinski tretman utječu na klijanje. Na temelju rezultata dvosmjerne analize varijance (Tablica 8) izdvojila sam dane u kojima je dokazan znaćajan učinak pozadine i/ili tretmana kako bih međusobno usporedila i grafićki prikazala klijavost linija s promijenjenom ekspresijom gena *BPM*, odnosno *DMS3* i divljeg tipa.

**Tablica 8.** Sažetak dvosmjerne analize varijance koji prikazuje učinke genske pozadine (G), toplinskog tretmana (TS) te njihove interakcije (G×TS) na klijanje sjemenki uročnjaka (*Arabidopsis thaliana*) s promijenjenom ekspresijom gena *BPM*, odnosno gena *DMS3*. Klijanje je praćeno tijekom pet dana. Prikazane su F-vrijednosti, a rezultati na koje se odnosi  $p > 0,05$  nisu bili znaćajni (<sup>ns</sup>),  $p \leq 0,05$  odnosi se na znaćajne razlike (\*),  $p \leq 0,01$  na vrlo znaćajne (\*\*) te  $p \leq 0,001$  na iznimno znaćajne (\*\*\*)

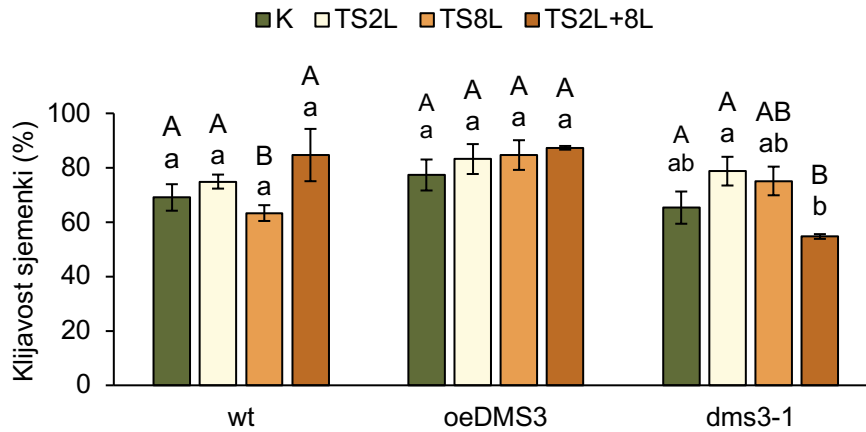
Dan	Linije <i>BPM</i>			Linije <i>DMS3</i>		
	G	TS	G×TS	G	TS	G×TS
1.	45,94 <sup>***</sup>	1,26 <sup>ns</sup>	0,67 <sup>ns</sup>	8,56 <sup>**</sup>	1,36 <sup>ns</sup>	3,44 <sup>*</sup>
2.	16,66 <sup>***</sup>	2,71 <sup>*</sup>	1,83 <sup>ns</sup>	3,28 <sup>ns</sup>	1,04 <sup>ns</sup>	0,79 <sup>ns</sup>
3.	7,50 <sup>*</sup>	1,85 <sup>ns</sup>	1,50 <sup>ns</sup>	2,56 <sup>ns</sup>	1,65 <sup>ns</sup>	1,31 <sup>ns</sup>
4.	7,83 <sup>*</sup>	1,05 <sup>ns</sup>	1,87 <sup>ns</sup>	2,05 <sup>ns</sup>	1,36 <sup>ns</sup>	1,79 <sup>ns</sup>
5.	9,35 <sup>***</sup>	1,18 <sup>ns</sup>	2,22 <sup>ns</sup>	1,71 <sup>ns</sup>	1,16 <sup>ns</sup>	1,53 <sup>ns</sup>

Razlike u klijavosti sjemenki linija s promijenjenom ekspresijom gena *BPM* bile su najistaknutije tijekom prvog i drugog dana klijanja. Prvog dana klijanja razlike u klijavosti uočene su zahvaljujući analizi razlićitih genskih pozadina (Tablica 8). U skladu s time, prvog dana klijanja nije zamijećena znaćajna razlika u klijavosti između kontrolnih (K) i tretiranih skupina (TS2L, TS8L, TS2L+8L), neovisno o genskoj pozadini (Slika 34a). No, sjemenke prikupljene od kontrolnih biljaka linije *amiR-bpm* imale su nižu klijavost u odnosu na kontrolne sjemenke linije *oeBPM1*. Drugog dana klijanja uočena je znaćajna razlika u klijavosti sjemenki linije *amiR-bpm* s obzirom na toplinski tretman i gensku pozadinu (Tablica 8). Sjemenke prikupljene od biljaka tretiranih u stadiju s osam listova (TS8L) imale su nižu klijavost u usporedbi sa sjemenkama prikupljenim od biljaka tretiranih u oba razvojna stadija (TS2L+8L) (Slika 34b). Također, usporedba genskih pozadina pokazala je da kontrolne sjemenke linije *amiR-bpm* imaju nižu klijavost u odnosu na liniju *oeBPM1*. Tijekom iduća tri dana sjemenke linije *amiR-bpm* prikupljene od biljaka tretiranih u stadiju s osam listova (TS8L) imale su nižu klijavost u odnosu na odgovarajuće sjemenke linije *oeBPM1* i divljeg tipa (Prilog 6).



**Slika 34.** Klijavost sjemenki uročnjaka (*Arabidopsis thaliana*) (a) prvog i (b) drugog dana. Sjemenke su prikupljene od biljaka divljeg tipa (wt), linije s prekomjernom ekspresijom gena *BPM1* (*oeBPM1*) te linije sa smanjenom ekspresijom gena *BPM1*, 4, 5 i 6 (*amiR-bpm*), izloženih temperaturi od 40 °C tijekom šest sati u različitim razvojnim stadijima: s dva prava lista (TS2L), osam pravih listova (TS8L) ili u oba stadija – s dva te osam pravih listova (TS2L+8L). Kontrolne skupine (K) svake linije rasle su tijekom pokusa na 24 °C. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost tri biološke replike ± standardna pogreška. Odgovor kontrolnih i tretiranih biljaka (K, TS2L, TS8L i TS2L+8L) unutar pojedine linije (wt, *oeBPM1* ili *amiR-bpm*) analiziran je jednosmjernom analizom varijance i *post hoc* testom Tukey HSD; značajne razlike ( $p \leq 0,05$ ) obilježene su različitim malim slovima. Međusobna usporedba odgovora kontrolnih (K), odnosno tretiranih (TS2L, TS8L ili TS2L+8L) biljaka različitih linija (wt, *oeBPM1* i *amiR-bpm*) provedena je jednosmjernom analizom varijance i *post hoc* testom Tukey HSD; značajne razlike ( $p \leq 0,05$ ) obilježene su različitim velikim slovima.

Linije s promijenjenom ekspresijom gena *DMS3* pokazale su značajne razlike u klijavosti samo prvog dana klijanja (Slika 35). Sjemenke linije *dms3-1* prikupljene od tretiranih biljaka u oba razvojna stadija (TS2L+8L) imale su nižu klijavost od sjemenki biljaka tretiranih u stadiju s dva lista (TS2L). Kontrolne sjemenke (K) i sjemenke prikupljene od biljaka tretiranih u stadiju s osam listova (TS8L) nisu se značajno razlikovale od skupina TS2L i TS2L+8L. Između sjemenki različitih skupina linije *oeDMS3* i divljeg tipa nije uočena značajna razlika. Usporedbom kontrolnih sjemenki linija s promijenjenom ekspresijom gena *DMS3* i divljeg tipa, nisu uočene značajne razlike.



**Slika 35.** Klijavost sjemenki uročnjaka (*Arabidopsis thaliana*) prvog dana. Sjemenke su prikupljene od biljaka divljeg tipa (wt), linije s prekomjernom ekspresijom gena *DMS3* (*oeDMS3*) te linije s mutiranim genom *DMS3* (*dms3-1*), izloženih temperaturi od 40 °C tijekom šest sati u različitim razvojnim stadijima: s dva prava lista (TS2L), osam pravih listova (TS8L) ili u oba stadija – s dva te osam pravih listova (TS2L+8L). Kontrolne skupine (K) svake linije rasle su tijekom pokusa na 24 °C. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost tri biološke replike ± standardna pogreška. Odgovor kontrolnih i tretiranih biljaka (K, TS2L, TS8L i TS2L+8L) unutar pojedine linije (wt, *oeDMS3* ili *dms3-1*) analiziran je jednosmjernom analizom varijance i *post hoc* testom Tukey HSD; značajne razlike ( $p \leq 0,05$ ) obilježene su različitim malim slovima. Međusobna usporedba odgovora kontrolnih (K), odnosno tretiranih (TS2L, TS8L ili TS2L+8L) biljaka različitih linija (wt, *oeDMS3* i *dms3-1*) provedena je jednosmjernom analizom varijance i *post hoc* testom Tukey HSD; značajne razlike ( $p \leq 0,05$ ) obilježene su različitim velikim slovima.

## 4.2. Fiziološke, biokemijske i molekularne promjene u stadiju klijanaca

Učinak toplinskog tretmana i genske pozadine na fiziološke, biokemijske i molekularne parametre detaljno je istražen u klijanacima linija s promijenjenom ekspresijom gena *BPM* (*oeBPM1*, *amiR-bpm*) i gena *DMS3* (*oeDMS3*, *dms3-1*) te divljem tipu. Ukoliko nije naglašeno drugačije, učinak je analiziran u dvije vremenske točke – odmah nakon izlaganja povišenoj temperaturi (prva vremenska točka) te nakon 24-satnog oporavka (druga vremenska točka). U obje točke, uz tretirane klijance, analizirani su i oni uzgajani u kontrolnim uvjetima.

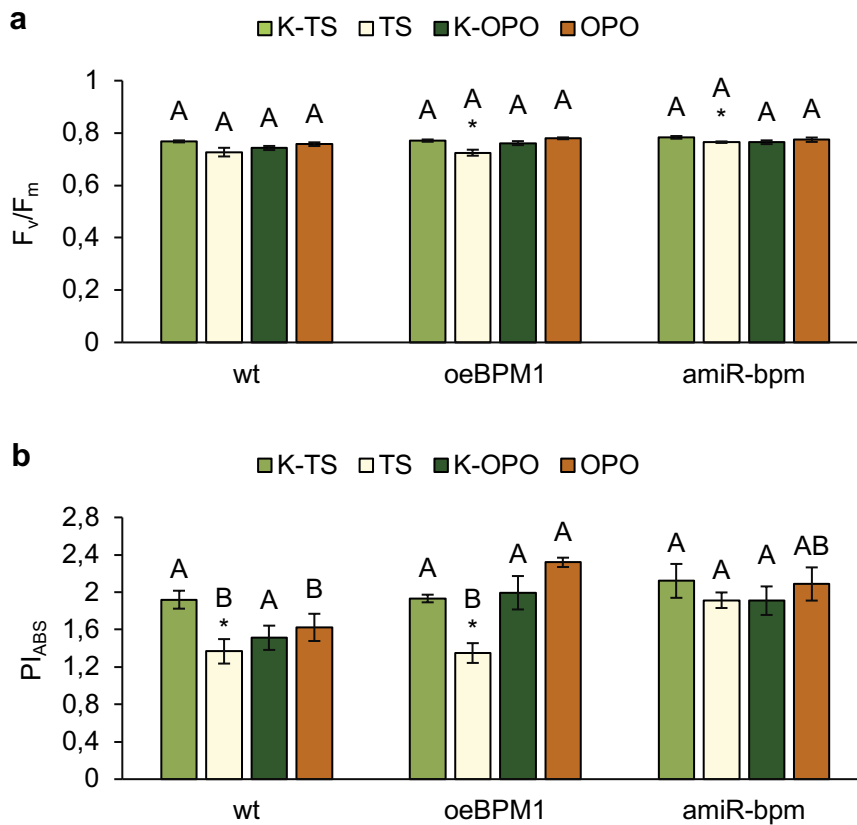
### 4.2.1. Fluorescencija klorofila *a*

Procjena učinka toplinskog tretmana i genske pozadine na fotosintetsku učinkovitost klijanaca uročnjaka s promijenjenom ekspresijom gena *BPM* i *DMS3* provedena je korištenjem JIP-testa. U ovom sam se radu fokusirala na analizu najvažnijih i najčešće korištenih parametara dobivenih JIP-testom:  $F_v/F_m$ ,  $PI_{ABS}$ ,  $ABS/RC$ ,  $TR_0/RC$ ,  $ET_0/RC$ ,  $DI_0/RC$  i  $RC/CS_0$ .

Dvosmjerna analiza varijance pokazala je da je na maksimalni kvantni prinos PSII ( $F_v/F_m$ ), izmjeren odmah nakon toplinskog tretmana (prva vremenska točka) u linijama s promijenjenom ekspresijom gena *BPM*, utjecao toplinski tretman ( $F = 23,6$ ,  $p \leq 0,0001$ ). Naime, nakon izlaganja povišenoj temperaturi značajno niže vrijednosti parametra  $F_v/F_m$  izmjerene su u tretiranim klijanacima (TS) linija *oeBPM1* i *amiR-bpm* (Slika 36a), dok promjene u vrijednostima  $F_v/F_m$  nisu zabilježene u klijanacima divljeg tipa. Nije bilo značajnih razlika u vrijednostima  $F_v/F_m$  između linija s promijenjenom ekspresijom gena *BPM*, neovisno jesu li klijanci bili kontrolni (K-TS) ili tretirani (TS), što znači da genska pozadina klijanaca nije utjecala na taj parametar. Nakon 24-satnog oporavka (druga vremenska točka) nije zabilježen značajan učinak toplinskog tretmana, genske pozadine te njihove interakcije na vrijednosti  $F_v/F_m$  u linijama s promijenjenom ekspresijom gena *BPM*.

Toplinski tretman ( $F = 22,83$ ,  $p \leq 0,0001$ ) i genska pozadina biljke ( $F = 7,14$ ,  $p \leq 0,01$ ) značajno su utjecali na indeks fotosintetske učinkovitosti ( $PI_{ABS}$ ), izmjeren u prvoj vremenskoj točki. Značajno niže vrijednosti  $PI_{ABS}$  izmjerene su u tretiranim klijanacima (TS) linije *oeBPM1* i klijanacima divljeg tipa nakon izlaganja toplinskom tretmanu (Slika 36b), dok u klijanacima linije *amiR-bpm* promjene nisu zabilježene. Usporedba genskih pozadina pokazala je značajno više vrijednosti  $PI_{ABS}$  u tretiranim klijanacima (TS) linije *amiR-bpm* u odnosu na liniju *oeBPM1* i

divlji tip. Međutim, značajne razlike u vrijednostima  $PI_{ABS}$  između kontrolnih klijanaca (K-TS) istraživanih linija nisu zabilježene.



**Slika 36.** (a) Maksimalni kvantni prinos fotosustava II ( $F_v/F_m$ ) i (b) indeks fotosintetske učinkovitosti ( $PI_{ABS}$ ) u klijancima uročnjaka (*Arabidopsis thaliana*) s prekomjernom ekspresijom gena *BPM1* (*oeBPM1*), sa smanjenom ekspresijom gena *BPM1*, 4, 5 i 6 (*amiR-bpm*) i klijancima divljeg tipa (wt). Klijanci su prikupljeni u dvije vremenske točke, odmah nakon izlaganja temperaturi od 37 °C tijekom šest sati (TS), i nakon oporavka na 24 °C u trajanju 24 h (OPO). Kontrolne skupine (K-TS i K-OPO) svake linije rasle su tijekom pokusa na 24 °C. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost pet bioloških replika ± standardna pogreška. Odgovor kontrolnih i tretiranih biljaka (K-TS i TS, odnosno K-OPO i OPO) unutar pojedine linije (wt, *oeBPM1* ili *amiR-bpm*) analiziran je Studentovim *t*-testom; značajne razlike ( $p \leq 0,05$ ) između K-TS i TS obilježene su zvjezdicom (\*). Između K-OPO i OPO nisu zabilježene značajne razlike. Međusobna usporedba odgovora kontrolnih (K-TS ili K-OPO), odnosno tretiranih (TS ili OPO) biljaka različitih linija (wt, *oeBPM1* i *amiR-bpm*) provedena je jednosmjernom analizom varijance i *post hoc* testom Tukey HSD; značajne razlike ( $p \leq 0,05$ ) obilježene su različitim velikim slovima.

U drugoj vremenskoj točki, dvosmjernom analizom varijance pokazao se značajnim samo učinak genske pozadine ( $F = 8,76$ ,  $p \leq 0,01$ ). Usporedbom kontrolnih (K-OPO) i tretiranih klijanaca (OPO) nisu uočene značajne promjene, neovisno o liniji. Usporedba genskih pozadina pokazala je značajno više vrijednosti  $PI_{ABS}$  u tretiranim klijancima (OPO) linije *oeBPM1* u

odnosu na divlji tip (Slika 36b). Linija *amiR-bpm* nije se značajno razlikovala od linije *oeBPMI* i divljeg tipa. Također, značajne razlike u vrijednostima  $PI_{ABS}$  nisu zabilježene između kontrolnih klijanaca (K-OPO) različitih linija.

Kako bih utvrdila uzrok promjena fotosintetske učinkovitosti, analizirala sam četiri glavna parametra koji se odnose na tok energije u fotosintetskom aparatu, a sadržani su u parametru  $PI_{ABS}$  – apsorpciju svjetlosti (fotona) po aktivnom RC (ABS/RC), protok uhvaćenih fotona po aktivnom RC ( $TR_0/RC$ ), prijenos elektrona po aktivnom RC ( $ET_0/RC$ ) te rasipanje energije po aktivnom RC ( $DI_0/RC$ ).

U prvoj vremenskoj točki na značajne promjene ABS/RC utjecali su tretman ( $F = 5,98$ ,  $p \leq 0,05$ ), genska pozadina ( $F = 4,93$ ,  $p \leq 0,05$ ), kao i njihova interakcija ( $F = 4,26$ ,  $p \leq 0,05$ ). Značajno povećanje vrijednosti ABS/RC zabilježeno je kod tretiranih klijanaca (TS) linije *oeBPMI* (Tablica 9). Naprotiv, značajne promjene nisu uočene u tretiranim klijancima (TS) linije *amiR-bpm* i klijancima divljeg tipa odmah nakon izlaganja povišenoj temperaturi. Usporedba genskih pozadina pokazala je da kontrolni klijanci (K-TS) linija *oeBPMI* i *amiR-bpm* imaju značajno niže vrijednosti ABS/RC u odnosu na divlji tip. Razlika nije uočena između tretiranih klijanaca (TS) linija *oeBPMI* i *amiR-bpm* te divljeg tipa. Na vrijednosti parametara  $TR_0/RC$  i  $ET_0/RC$  izmjerene u prvoj vremenskoj točki utjecala je interakcija tretmana i genske pozadine ( $TR_0/RC - F = 6,74$ ,  $p \leq 0,01$ ,  $ET_0/RC - F = 12,21$ ,  $p \leq 0,001$ ). Vrijednosti oba parametra značajno su se snizile u tretiranim klijancima (TS) divljeg tipa nakon izlaganja povišenoj temperaturi (Tablica 9). Međutim, značajne promjene nisu uočene između kontrolnih (K-TS) i tretiranih klijanaca (TS) linija *oeBPMI* i *amiR-bpm*. Usporedba genskih pozadina pokazala je da kontrolni klijanci (K-TS) linija *oeBPMI* i *amiR-bpm* imaju značajno niže vrijednosti  $TR_0/RC$  i  $ET_0/RC$  u odnosu na divlji tip. Između tretiranih klijanaca (TS) linija *oeBPMI* i *amiR-bpm* te divljeg tipa nisu uočene značajne razlike. Na parametar  $DI_0/RC$  značajno su utjecali tretman ( $F = 15,87$ ,  $p \leq 0,001$ ) i genska pozadina ( $F = 5,42$ ,  $p \leq 0,05$ ). Značajno povećanje vrijednosti  $DI_0/RC$  zabilježeno je u tretiranim klijancima (TS) linije *oeBPMI* i *amiR-bpm* u usporedbi s odgovarajućim kontrolama (Tablica 9). Značajne razlike nisu zabilježene usporedbom kontrolnih (K-TS) i tretiranih klijanaca (TS) divljeg tipa. Vezano uz usporedbu genskih pozadina, kontrolni klijanci (K-TS) linija *oeBPMI* i *amiR-bpm* imali su značajno niže vrijednosti  $DI_0/RC$  u odnosu na divlji tip. Međutim, usporedbom tretiranih klijanaca (TS) nisu zabilježene značajnije promjene između istraživanih linija.

Nakon 24-satnog oporavka, na parametar ABS/RC značajno je utjecala genska pozadina ( $F = 7,14$ ,  $p \leq 0,01$ ). Nisu zabilježene značajne razlike između kontrolnih (K-OPO) i tretiranih

klijanaca (OPO), neovisno o liniji (Tablica 9). Usporedbom kontrolnih klijanaca (K-OPO) linija *oeBPM1* i *amiR-bpm* te divljeg tipa također nisu zabilježene značajne promjene. Međutim, tretirani klijanci (OPO) linije *oeBPM1* imali su značajno nižu vrijednost ABS/RC u odnosu na klijance divljeg tipa. Tretirani klijanci (OPO) linije *amiR-bpm* nisu se značajno razlikovali od klijanaca *oeBPM1* i divljeg tipa. Dvosmjerna analiza varijance pokazala je da ne postoji značajan učinak tretmana, genske pozadine i njihove interakcije na parametre  $TR_0/RC$  i  $ET_0/RC$ , neovisno o istraživanoj liniji. S druge strane, na vrijednosti  $DI_0/RC$  značajno je utjecala genska pozadina ( $F = 8,80$ ,  $p \leq 0,01$ ). Sukladno tome, nisu zabilježene značajne razlike između kontrolnih (K-OPO) i tretiranih klijanaca (OPO), neovisno o liniji (Tablica 9). Usporedbom kontrolnih klijanaca (K-OPO) linija *oeBPM1* i *amiR-bpm* te divljeg tipa također nisu zabilježene značajne promjene u vrijednostima  $DI_0/RC$ . Ali, usporedba tretiranih klijanaca (OPO) pokazala je značajno niže vrijednosti  $DI_0/RC$  u klijancima linija *oeBPM1* i *amiR-bpm* u odnosu na divlji tip.

Analiza gustoće aktivnih RC po osvijetljenoj površini lista ( $RC/CS_0$ ) nije pokazala značajan učinak toplinskog tretmana, genske pozadine niti njihove interakcije na linije s promijenjenom ekspresijom gena *BPM* u prvoj vremenskoj točki (Tablica 9). Međutim, nakon 24-satnog oporavka zabilježen je značajan učinak genske pozadine ( $F = 3,91$ ,  $p \leq 0,05$ ). Slijedom toga, značajne promjene nisu uočene usporedbom kontrolnih (K-OPO) i tretiranih klijanaca (OPO), neovisno o liniji. Usporedba genskih pozadina pokazala je da kontrolni klijanci (K-OPO) linija *oeBPM1* i *amiR-bpm* imaju značajno više vrijednosti  $RC/CS_0$  u odnosu na divlji tip. Između tretiranih klijanaca (OPO) nisu uočene značajne razlike.

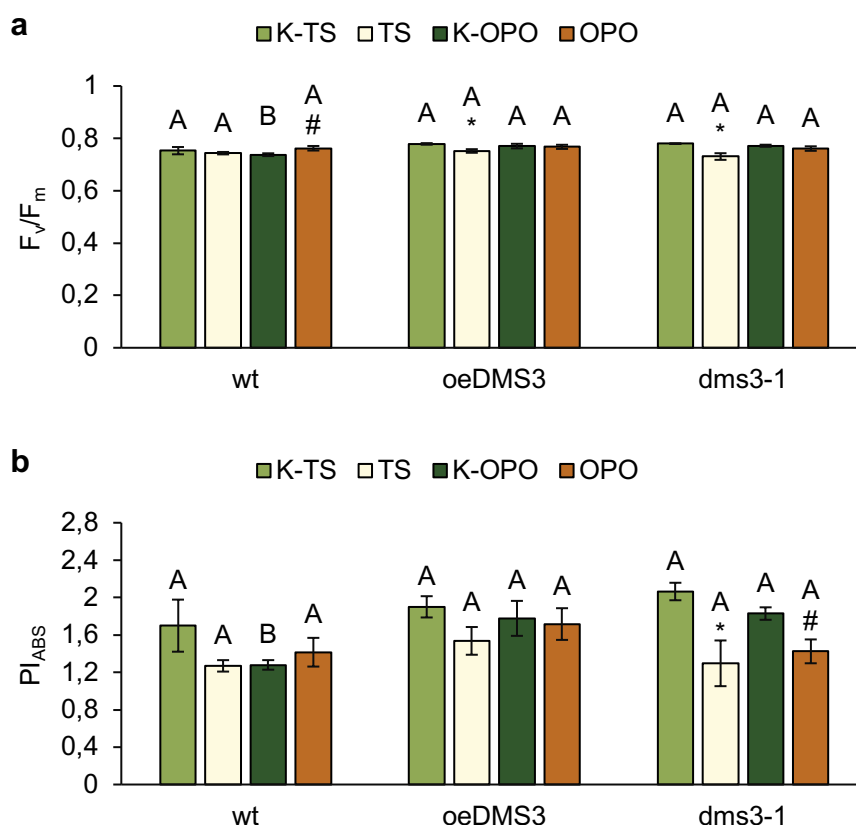
**Tablica 9.** ApSORpcija svjetlosti (ABS/RC), protok uhvaćenih fotona (TR<sub>0</sub>/RC), prijenos elektrona (ET<sub>0</sub>/RC) i rasipanje energije po reakcijskom centru (DI<sub>0</sub>/RC), te gustoća aktivnih reakcijskih centara po osvjetljenoj površini lista (RC/CS<sub>0</sub>) u klijancima uročnjaka (*Arabidopsis thaliana*) s prekomjernom ekspresijom gena *BPM1* (*oeBPM1*), sa smanjenom ekspresijom gena *BPM1*, 4, 5 i 6 (*amiR-bpm*) i klijancima divljeg tipa (wt). Klijanci su prikupljeni u dvije vremenske točke, odmah nakon izlaganja temperaturi od 37 °C tijekom šest sati (TS), i nakon oporavka na 24 °C u trajanju 24 sata (OPO). Kontrolne skupine (K-TS i K-OPO) svake linije rasle su tijekom pokusa na 24 °C. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost pet bioloških replika ± standardna pogreška. Odgovor kontrolnih i tretiranih biljka (K-TS i TS, odnosno K-OPO i OPO) unutar pojedine linije (wt, *oeBPM1* ili *amiR-bpm*) analiziran je Studentovim *t*-testom; značajne razlike ( $p \leq 0,05$ ) između K-TS i TS obilježene su zvjezdicom (\*). Između K-OPO i OPO nisu zabilježene značajne razlike. Međusobna usporedba odgovora kontrolnih (K-TS ili K-OPO), odnosno tretiranih (TS ili OPO) biljaka različitih linija (wt, *oeBPM1* i *amiR-bpm*) provedena je jednosmjernom analizom varijance i *post hoc* testom Tukey HSD; značajne razlike ( $p \leq 0,05$ ) obilježene su različitim velikim slovima.

LINIJA	SKUPINA	ABS/RC	TR <sub>0</sub> /RC	ET <sub>0</sub> /RC	DI <sub>0</sub> /RC	RC/CS <sub>0</sub>
wt	K-TS	3,02 ± 0,03 A	2,32 ± 0,02 A	1,47 ± 0,02 A	0,70 ± 0,02 A	5288,47 ± 150,67 A
	TS	3,00 ± 0,14 A	2,17 ± 0,06 A*	1,28 ± 0,04 A*	0,83 ± 0,09 A	5088,06 ± 373,57 A
	K-OPO	2,94 ± 0,10 A	2,18 ± 0,06 A	1,29 ± 0,06 A	0,76 ± 0,05 A	4177,21 ± 229,02 B
	OPO	2,91 ± 0,08 A	2,20 ± 0,05 A	1,30 ± 0,08 A	0,71 ± 0,03 A	4692,58 ± 320,20 A
<i>oeBPM1</i>	K-TS	2,69 ± 0,09 B	2,08 ± 0,07 B	1,26 ± 0,05 B	0,62 ± 0,02 B	4867,89 ± 173,40 A
	TS	3,11 ± 0,08 A*	2,25 ± 0,04 A	1,37 ± 0,04 A	0,86 ± 0,05 A*	5068,62 ± 194,80 A
	K-OPO	2,70 ± 0,08 A	2,06 ± 0,05 A	1,28 ± 0,04 A	0,65 ± 0,04 A	4924,31 ± 191,84 A
	OPO	2,62 ± 0,03 B	2,04 ± 0,03 A	1,29 ± 0,02 A	0,58 ± 0,01 B	5142,25 ± 115,58 A
<i>amiR-bpm</i>	K-TS	2,73 ± 0,04 B	2,14 ± 0,02 B	1,30 ± 0,02 B	0,59 ± 0,02 B	4857,66 ± 179,73 A
	TS	2,80 ± 0,03 A	2,14 ± 0,02 A	1,33 ± 0,01 A	0,66 ± 0,02 A*	4984,62 ± 67,48 A
	K-OPO	2,74 ± 0,01 A	2,09 ± 0,03 A	1,28 ± 0,04 A	0,64 ± 0,02 A	4710,71 ± 127,24 A
	OPO	2,70 ± 0,08 AB	2,09 ± 0,07 A	1,29 ± 0,05 A	0,61 ± 0,03 B	4515,83 ± 261,46 A



U linijama s promijenjenom ekspresijom gena *DMS3*, toplinski tretman značajno je utjecao ( $F = 13,69$ ,  $p \leq 0,01$ ) na vrijednosti  $F_v/F_m$  izmjerene u prvoj vremenskoj točki. Značajno niže vrijednosti  $F_v/F_m$  izmjerene su u tretiranim klijanacima (TS) linija *oeDMS3* i *dms3-1* nakon izlaganja toplinskom stresu (Slika 37a). Promjene u vrijednostima  $F_v/F_m$  nakon izlaganja povišenoj temperaturi nisu zabilježene u tretiranim klijanacima (TS) divljeg tipa. Genska pozadina klijanaca nije prouzročila značajne promjene u vrijednostima  $F_v/F_m$  između linija s promijenjenom ekspresijom gena *DMS3*, neovisno jesu li u pitanju bili kontrolni (K-TS) ili tretirani klijaneci (TS). Nakon 24-satnog oporavka zabilježen je značajan učinak toplinskog tretmana ( $F = 3,34$ ,  $p \leq 0,05$ ) i genske pozadine ( $F = 3,72$ ,  $p \leq 0,05$ ). Više vrijednosti  $F_v/F_m$  uočene su u tretiranim klijanacima (OPO) divljeg tipa u odnosu na kontrolne klijance (K-OPO). U linijama *oeDMS3* i *dms3-1* nije zabilježena značajna razlika između kontrolnih (K-OPO) i tretiranih klijanaca (OPO). Usporedba genskih pozadina pokazala je da kontrolni klijanci (K-OPO) divljeg tipa imaju niže vrijednosti  $F_v/F_m$  u odnosu na klijance linija *oeDMS3* i *dms3-1*. Međutim, razlika nije uočena između tretiranih klijanaca (OPO).

Na parametar  $PI_{ABS}$  izmjeren u prvoj vremenskoj točki također je značajno utjecao toplinski tretman ( $F = 10,94$ ,  $p \leq 0,01$ ). Značajno niže vrijednosti  $PI_{ABS}$  izmjerene su u tretiranim klijanacima (TS) linije *dms3-1* nakon izlaganja toplinskom stresu u odnosu na kontrolne klijance (K-TS) (Slika 37b). Naprotiv, u tretiranim klijanacima (TS) linije *oeDMS3* nisu zabilježene značajne promjene. Iako promjene nisu bile značajne niti u tretiranim klijanacima (TS) divljeg tipa, treba istaknuti da se vrijednost  $PI_{ABS}$  smanjila za 25% u usporedbi s odgovarajućom kontrolom (K-TS). Genska pozadina klijanaca nije prouzročila značajne promjene u vrijednostima  $PI_{ABS}$  između linija s promijenjenom ekspresijom gena *DMS3*, neovisno jesu li u pitanju bili kontrolni (K-TS) ili tretirani klijaneci (TS). U drugoj vremenskoj točki, dvosmjerna analiza varijance pokazala je značajnim učinak tretmana ( $F = 3,91$ ,  $p \leq 0,05$ ) i genske pozadine ( $F = 4,23$ ,  $p \leq 0,05$ ). Značajno niže vrijednosti  $PI_{ABS}$  izmjerene su u tretiranim klijanacima (OPO) linije *dms3-1*, ali ne i u tretiranim klijanacima (OPO) linije *oeDMS3* i divljeg tipa. Usporedba genskih pozadina pokazala je značajno više vrijednosti  $PI_{ABS}$  u kontrolnim klijanacima (K-OPO) linija *oeDMS3* i *dms3-1* u odnosu na divlji tip. Značajne promjene u vrijednostima  $PI_{ABS}$  nisu zabilježene između tretiranih klijanaca (OPO).



**Slika 37.** (a) Maksimalni kvantni prinos fotosustava II ( $F_v/F_m$ ) i (b) indeks fotosintetske učinkovitosti ( $PI_{ABS}$ ) u klijancima uročnjaka (*Arabidopsis thaliana*) s prekomjernom ekspresijom gena *DMS3* (*oeDMS3*), s mutiranim genom *DMS3* (*dms3-1*) i klijancima divljeg tipa (wt). Klijanci su prikupljeni u dvije vremenske točke, odmah nakon izlaganja temperaturi od 37 °C tijekom šest sati (TS), i nakon oporavka na 24 °C u trajanju 24 sata (OPO). Kontrolne skupine (K-TS i K-OPO) svake linije rasle su tijekom pokusa na 24 °C. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost pet bioloških replika  $\pm$  standardna pogreška. Odgovor kontrolnih i tretiranih biljka (K-TS i TS, odnosno K-OPO i OPO) unutar pojedine linije (wt, *oeDMS3* ili *dms3-1*) analiziran je Studentovim *t*-testom; značajne razlike ( $p \leq 0,05$ ) između K-TS i TS obilježene su zvjezdicom (\*), a između K-OPO i OPO ljestvama (#). Međusobna usporedba odgovora kontrolnih (K-TS ili K-OPO), odnosno tretiranih (TS ili OPO) biljaka različitih linija (wt, *oeDMS3* i *dms3-1*) provedena je jednosmjernom analizom varijance i *post hoc* testom Tukey HSD; značajne razlike ( $p \leq 0,05$ ) obilježene su različitim velikim slovima.

U prvoj vremenskoj točki, samo je genska pozadina imala učinak na promjene u parametrima ABS/RC ( $F = 10,34$ ,  $p \leq 0,0001$ ),  $TR_0/RC$  ( $F = 14,1$ ,  $p \leq 0,0001$ ) i  $ET_0/RC$  ( $F = 5,71$ ,  $p \leq 0,01$ ). Slijedom toga, nisu zabilježene značajne razlike u vrijednostima ABS/RC,  $TR_0/RC$  i  $ET_0/RC$  između kontrolnih (K-TS) i tretiranih klijanaca (TS), neovisno o liniji (Tablica 10). Također, usporedba genskih pozadina pokazala je da ne postoji značajna razlika u vrijednostima ABS/RC,  $TR_0/RC$  i  $ET_0/RC$  između kontrolnih klijanaca (K-TS) linija *oeDMS3* i *dms3-1* te divljeg tipa. Naprotiv, tretirani klijanci (TS) linije *oeDMS3* i *dms3-1* imali su niže vrijednosti ABS/RC i  $TR_0/RC$  u odnosu na tretirane klijance (TS) divljeg tipa. Također, tretirani klijanci

(TS) linije *dms3-1* imali su niže vrijednosti  $ET_0/RC$  u odnosu na divlji tip. Linija *oeDMS3* nije pokazala značajne razlike u vrijednostima  $ET_0/RC$  u odnosu na liniju *dms3-1* i divlji tip. S druge strane, na parametar  $DI_0/RC$  značajno je utjecao tretman ( $F = 7,09$ ,  $p \leq 0,05$ ). Značajno povećanje vrijednosti  $DI_0/RC$  zabilježeno je u tretiranim klijancima (TS) linije *dms3-1* u usporedbi s odgovarajućom kontrolom (K-TS) (Tablica 10). Značajne promjene nisu zabilježene usporedbom kontrolnih (K-TS) i tretiranih klijanaca (TS) linije *oeDMS3*, odnosno divljeg tipa. Genska pozadina klijanaca nije prouzročila značajne promjene u vrijednostima  $DI_0/RC$  između linija s promijenjenom ekspresijom gena *DMS3*, neovisno jesu li u pitanju bili kontrolni (K-TS) ili tretirani klijanci (TS).

Nakon 24-satnog oporavka, sva četiri parametra bila su pod utjecajem tretmana ( $ABS/RC - F = 18,99$ ,  $p \leq 0,0001$ ;  $TR_0/RC - F = 30,18$ ,  $p \leq 0,0001$ ;  $ET_0/RC - F = 45,38$ ,  $p \leq 0,0001$ ;  $DI_0/RC - F = 7,29$ ,  $p \leq 0,05$ ) i genske pozadine ( $ABS/RC - F = 8,92$ ,  $p \leq 0,001$ ;  $TR_0/RC - F = 11,96$ ,  $p \leq 0,001$ ;  $ET_0/RC - F = 6,89$ ,  $p \leq 0,01$ ;  $DI_0/RC - F = 11,05$ ,  $p \leq 0,001$ ). Sniženje vrijednosti  $ABS/RC$  zabilježeno je u tretiranih klijancima (OPO) linije *dms3-1* i divljeg tipa u usporedbi s odgovarajućom kontrolom (K-OPO) (Tablica 10). Međutim, nisu uočene značajne promjene usporedbom kontrolnih (K-OPO) i tretiranih klijanaca (OPO) linije *oeDMS3*. Značajno sniženje vrijednosti  $TR_0/RC$  i  $ET_0/RC$  zabilježeno je u svih tretiranih klijanaca (OPO), neovisno o liniji. Naprotiv, parametar  $DI_0/RC$  značajno je porastao samo u tretiranim klijancima (OPO) divljeg tipa, dok između kontrolnih (K-OPO) i tretiranih klijanaca (OPO) linije *oeDM3*, odnosno *dms3-1*, nisu uočene značajne razlike. Usporedba genskih pozadina pokazala je da kontrolni klijanci (K-OPO) linije *oeDMS3* imaju niže vrijednosti  $ABS/RC$ ,  $TR_0/RC$  i  $ET_0/RC$  u odnosu na klijance divljeg tipa. Linija *dms3-1* nije se značajno razlikovala u spomenutim parametrima od linije *oeDMS3* i divljeg tipa. Također, tretirani klijanci (OPO) linije *oeDMS3*, ali i linije *dms3-1* imali su niže vrijednosti  $ABS/RC$  i  $TR_0/RC$  u usporedbi s tretiranim klijancima (OPO) divljeg tipa. U tretiranim klijancima (OPO) linije *dms3-1* zabilježene su značajno niže vrijednosti  $ET_0/RC$  u usporedbi s divlji tipom. S druge strane, tretirani klijanci (OPO) linije *oeDMS3* nisu pokazali značajne promjene u vrijednostima  $ET_0/RC$  u odnosu na liniju *dms3-1* i divlji tip. Analiza parametra  $DI_0/RC$  pokazala je kako kontrolni klijanci (K-OPO) linija *oeDMS3* i *dms3-1* imaju niže vrijednosti  $DI_0/RC$  u odnosu na klijance divljeg tipa. Naprotiv, između tretiranih klijanaca (OPO) istraživanih linija nije zabilježena značajna razlika.

Na parametar  $RC/CS_0$  izmjeren u prvoj vremenskoj točki značajan je bio učinak interakcije tretmana i genske pozadine ( $F = 3,66$ ,  $p \leq 0,05$ ). Tretirani klijanci (TS) linije *oeDMS3* imali su

više vrijednosti  $RC/CS_0$  u odnosu na kontrolne klijance (K-TS) (Tablica 10). Istovremeno, tretirani klijanci (TS) linije *dms3-1* imali su niže vrijednosti  $RC/CS_0$  u usporedbi s odgovarajućom kontrolom (K-TS). Između kontrolnih (K-TS) i tretiranih klijanaca (TS) divljeg tipa nije uočena značajna razlika. Usporedba genskih pozadina pokazala je da tretirani klijanci (TS) linije *oeDMS3* imaju značajno više vrijednosti  $RC/CS_0$  u odnosu na liniju *dms3-1* i divlji tip. Nadalje, tretirani klijanci (TS) linije *dms3-1* imali su niže vrijednosti  $RC/CS_0$  i u odnosu na klijance divljeg tipa. Razlika nije uočena usporedbom kontrolnih klijanaca (K-TS). U drugoj vremenskoj točki nije zabilježen značajan učinak tretmana, genske pozadine i njihove interakcije na parametar  $RC/CS_0$ .

**Tablica 10.** Apsorpcija svjetlosti (ABS/RC), protok uhvaćenih fotona (TR<sub>0</sub>/RC), prijenos elektrona (ET<sub>0</sub>/RC) i rasipanje energije po reakcijskom centru (DI<sub>0</sub>/RC), te gustoća aktivnih reakcijskih centara po osvijetljenoj površini lista (RC/CS<sub>0</sub>) u klijancima uročnjaka (*Arabidopsis thaliana*) s prekomjernom ekspresijom gena *DMS3* (*oeDMS3*), s mutiranim genom *DMS3* (*dms3-1*) i klijancima divljeg tipa (wt). Klijanci su prikupljeni u dvije vremenske točke, odmah nakon izlaganja temperaturi od 37 °C tijekom šest sati (TS), i nakon oporavka na 24 °C u trajanju 24 sata (OPO). Kontrolne skupine (K-TS i K-OPO) svake linije rasle su tijekom pokusa na 24 °C. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost pet bioloških replika ± standardna pogreška. Odgovor kontrolnih i tretiranih biljaka (K-TS i TS, odnosno K-OPO i OPO) unutar pojedine linije (wt, *oeDMS3* ili *dms3-1*) analiziran je Studentovim *t*-testom; značajne razlike ( $p \leq 0,05$ ) između K-TS i TS obilježene su zvjezdicom (\*), a između K-OPO i OPO ljestvama (#). Međusobna usporedba odgovora kontrolnih (K-TS ili K-OPO), odnosno tretiranih (TS ili OPO) biljaka različitih linija (wt, *oeDMS3* i *dms3-1*) provedena je jednosmjernom analizom varijance i *post hoc* testom Tukey HSD; značajne razlike ( $p \leq 0,05$ ) obilježene su različitim velikim slovima.

LINIJA	SKUPINA	ABS/RC	TR <sub>0</sub> /RC	ET <sub>0</sub> /RC	DI <sub>0</sub> /RC	RC/CS <sub>0</sub>
wt	K-TS	2,99 ± 0,11 A	2,24 ± 0,05 A	1,35 ± 0,04 A	0,75 ± 0,07 A	4938,84 ± 435,37 A
	TS	3,05 ± 0,03 A	2,26 ± 0,03 A	1,29 ± 0,02 A	0,78 ± 0,02 A	5236,01 ± 162,22 B
	K-OPO	3,17 ± 0,04 A	2,34 ± 0,03 A	1,38 ± 0,02 A	0,83 ± 0,02 A	6083,87 ± 321,77 A
	OPO	2,87 ± 0,06 A#	2,18 ± 0,03 A#	1,21 ± 0,05 A#	0,68 ± 0,04 A#	5189,43 ± 294,70 A
<i>oeDMS3</i>	K-TS	2,70 ± 0,05 A	2,10 ± 0,05 A	1,24 ± 0,03 A	0,60 ± 0,01 A	5200,10 ± 226,99 A
	TS	2,78 ± 0,08 B	2,09 ± 0,04 B	1,21 ± 0,03 AB	0,69 ± 0,04 A	5941,18 ± 90,15 A*
	K-OPO	2,81 ± 0,08 B	2,16 ± 0,04 B	1,28 ± 0,03 B	0,65 ± 0,04 B	5779,56 ± 160,14 A
	OPO	2,62 ± 0,06 B	2,01 ± 0,05 B#	1,15 ± 0,04 AB#	0,61 ± 0,02 A	5175,03 ± 232,66 A
<i>dms3-1</i>	K-TS	2,70 ± 0,03 A	2,09 ± 0,02 A	1,22 ± 0,06 A	0,60 ± 0,01 A	5405,92 ± 51,98 A
	TS	2,76 ± 0,06 B	2,01 ± 0,04 B	1,11 ± 0,07 B	0,75 ± 0,04 A*	4774,03 ± 216,14 C*
	K-OPO	2,91 ± 0,12 AB	2,20 ± 0,05 AB	1,29 ± 0,03 AB	0,64 ± 0,02 B	5292,16 ± 419,71 A
	OPO	2,60 ± 0,04 B#	1,97 ± 0,02 B#	1,05 ± 0,03 B#	0,62 ± 0,03 A	4681,93 ± 214,48 A

#### 4.2.2. Sadržaj fotosintetskih pigmenata

Na sadržaj klorofila *a* (Chl *a*) izmjeren u prvoj vremenskoj točki u linijama s promijenjenom ekspresijom gena *BPM* utjecala je interakcija toplinskog tretmana i genske pozadine ( $F = 4,41$ ,  $p \leq 0,05$ ). Značajno niži sadržaj Chl *a* izmjeren je u tretiranim klijancima (TS) linije *oeBPMI* nakon izlaganja toplinskom stresu (Tablica 11). Promjene u sadržaju Chl *a* nisu zabilježene u tretiranim klijancima (TS) linije *amiR-bpm* i tretiranim klijancima (TS) divljeg tipa nakon toplinskog tretmana. Usporedba genskih pozadina pokazala je značajno viši sadržaj Chl *a* u kontrolnim klijancima (K-TS) linije *oeBPMI* u odnosu na liniju *amiR-bpm*. Divlji tip nije se značajno razlikovao u odnosu na linije *oeBPMI* i *amiR-bpm*. Također, nije zapažena razlika između tretiranih klijanaca (TS) istraživanih linija. Dvosmjerna analiza varijance pokazala je kako nema značajnog učinka tretmana, genske pozadine i njihove interakcije na sadržaj Chl *a* nakon 24 sata oporavka.

Sadržaj klorofila *b* (Chl *b*) nije se promijenio pod utjecajem toplinskog tretmana, genske pozadine i njihove interakcije niti u jednoj od analiziranih vremenskih točaka (Tablica 11).

Dvosmjerna analiza varijance pokazala je značajan učinak interakcije tretmana i genske pozadine ( $F = 4,38$ ,  $p \leq 0,05$ ) na sadržaj ukupnih karotenoida (Cars) u prvoj vremenskoj točki. Zabilježen je značajni pad sadržaja Cars u tretiranim klijancima (TS) linije *oeBPMI* i divljeg tipa u odnosu na odgovarajuću kontrolu (K-TS) (Tablica 11). Promjena u sadržaju Cars nije zabilježena u tretiranim klijancima (TS) linije *amiR-bpm* nakon izlaganja povišenoj temperaturi. Usporedba genskih pozadina pokazala je kako kontrolni klijanci (K-TS) linije *oeBPMI* imaju značajno viši sadržaj Cars u odnosu na liniju *amiR-bpm*. Divlji tip nije se razlikovao od spomenutih linija. Također, nije uočena značajna razlika između tretiranih klijanaca (TS) istraživanih linija. Nakon 24-satnog oporavka nije zabilježen značajni utjecaj tretmana, genske pozadine i njihove interakcije na sadržaj Cars.

U prvoj vremenskoj točki, parametar Chl *a*/Chl *b* pokazao je ovisnost o interakciji tretmana i genske pozadine ( $F = 4,95$ ,  $p \leq 0,05$ ). U tretiranim klijancima (TS) linije *amiR-bpm* uočena je viša vrijednost Chl *a*/Chl *b* u odnosu na kontrolne klijance (K-TS) (Tablica 11). Naprotiv, značajne razlike nisu uočene u liniji *oeBPMI* i divljem tipu. Usporedba genskih pozadina pokazala je suprotan trend vrijednosti parametra Chl *a*/Chl *b* između kontrolnih (K-TS) i tretiranih klijanaca (TS). Naime, u kontrolnim uvjetima, linija *amiR-bpm* imala je nižu vrijednost Chl *a*/Chl *b* u odnosu na divlji tip. S druge strane, tretirani klijanci (TS) linije *amiR-bpm* imali su više vrijednosti Chl *a*/Chl *b* u odnosu na divlji tip. U oba slučaja, klijanci

linije *oeBPM1* nisu se razlikovali od linije *amiR-bpm* i divljeg tipa. U drugoj vremenskoj točki, tj. nakon oporavka, na vrijednosti Chl *a*/Chl *b* značajno je utjecao samo toplinski tretman ( $F = 2,33$ ,  $p \leq 0,05$ ). U tretiranim klijancima (OPO) linija *oeBPM1* i *amiR-bpm* uočene su niže vrijednosti Chl *a*/Chl *b* u odnosu na odgovarajuću kontrolu (K-OPO) (Tablica 11). Promjene nisu uočene usporedbom kontrolnih (K-OPO) i tretiranih klijanaca (OPO) divljeg tipa. Također, promjene nisu uočene niti usporedbom genskih pozadina, neovisno radi li se o kontrolnim (K-OPO) ili tretiranim klijancima (OPO).

Sadržaj Chl *a* i Cars izmjeren u prvoj vremenskoj točki u linijama s promijenjenom ekspresijom gena *DMS3* nije se promijenio pod utjecajem toplinskog tretmana, genske pozadine i njihove interakcije niti u jednoj od analiziranih vremenskih točaka (Tablica 12). Nasuprot tome, sadržaj Chl *b* izmjeren u prvoj vremenskoj točki pokazao je ovisnost o toplinskim tretmanu ( $F = 3,23$ ,  $p \leq 0,05$ ). Značajno viši sadržaj Chl *b* izmjeren je u tretiranim klijancima (TS) linije *oeDMS3* u usporedbi s kontrolom (K-TS) (Tablica 12). Razlika nije uočena između kontrolnih (K-TS) i tretiranih klijanaca (TS) linije *dms3-1*, odnosno divljeg tipa. Promjene nisu uočene niti usporedbom genskih pozadina, neovisno radi li se o kontrolnim (K-TS) ili tretiranim klijancima (TS). Također, nakon 24-satnog oporavka nije zabilježen značajan utjecaj tretmana, genske pozadine i njihove interakcije na sadržaj Chl *b*.

U prvoj vremenskoj točki, na parametar Chl *a*/Chl *b* značajno su utjecali toplinski tretman ( $F = 5,78$ ,  $p \leq 0,05$ ) i genska pozadina ( $F = 4,82$ ,  $p \leq 0,05$ ). Značajno niže vrijednosti Chl *a*/Chl *b* zabilježene su u tretiranim klijancima (TS) linije *oeDMS3* u odnosu na kontrolu (K-TS) (Tablica 12). U usporedbi s odgovarajućim kontrolama, izlaganje povišenoj temperaturi nije prouzročilo promjene u vrijednostima Chl *a*/Chl *b* u tretiranim klijancima (TS) linije *dms3-1* i divljeg tipa. Međutim, tretirani klijanci (TS) linije *dms3-1* imali su značajno niže vrijednosti Chl *a*/Chl *b* u odnosu na klijance divljeg tipa. Tretirani klijanci (TS) linije *oeDMS3* nisu se razlikovali od spomenutih linija. Također, nije uočena razlika između kontrolnih klijanaca (K-TS) istraživanih linija. Nakon 24-satnog oporavka nije zabilježen značaj utjecaj tretmana, genske pozadine i njihove interakcije na parametar Chl *a*/Chl *b*.

**Tablica 11.** Sadržaj klorofila *a* (Chl *a*), klorofila *b* (Chl *b*) i ukupnih karotenoida (Cars) te omjer klorofila *a* i *b* (Chl *a*/Chl *b*) u klijancima uročnjaka (*Arabidopsis thaliana*) s prekomjernom ekspresijom gena *BPM1* (*oeBPM1*), sa smanjenom ekspresijom gena *BPM1*, *4*, *5* i *6* (*amiR-bpm*) i klijancima divljeg tipa (*wt*). Klijanci su prikupljeni u dvije vremenske točke, odmah nakon izlaganja temperaturi od 37 °C tijekom šest sati (TS), i nakon 24-satnog oporavka na 24 °C (OPO). Kontrolne skupine (K-TS i K-OPO) svake linije rasle su tijekom pokusa na 24 °C. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost pet bioloških replika ± standardna pogreška. Odgovor kontrolnih i tretiranih biljka (K-TS i TS, odnosno K-OPO i OPO) unutar pojedine linije (*wt*, *oeBPM1* ili *amiR-bpm*) analiziran je Studentovim *t*-testom; značajne razlike ( $p \leq 0,05$ ) između K-TS i TS obilježene su zvjezdicom (\*), a između K-OPO i OPO ljestvama (#). Međusobna usporedba odgovora kontrolnih (K-TS ili K-OPO), odnosno tretiranih (TS ili OPO) biljaka različitih linija (*wt*, *oeBPM1* i *amiR-bpm*) provedena je jednosmjernom analizom varijance i *post hoc* testom Tukey HSD; značajne razlike ( $p \leq 0,05$ ) obilježene su različitim velikim slovima.

LINIJA	SKUPINA	Chl <i>a</i> ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	Chl <i>b</i> ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	Cars ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	Chl <i>a</i> /Chl <i>b</i>
<i>wt</i>	K-TS	356,45 ± 20,80 AB	84,41 ± 3,52 A	105,07 ± 3,40 AB	4,21 ± 0,13 A
	TS	313,18 ± 17,68 A	76,86 ± 1,93 A	86,84 ± 4,42 A*	3,82 ± 0,16 B
	K-OPO	305,22 ± 32,29 A	82,03 ± 11,51 A	88,08 ± 9,17 A	3,84 ± 0,27 A
	OPO	333,02 ± 16,18 A	92,31 ± 1,09 A	95,27 ± 4,06 A	3,82 ± 0,19 A
<i>oeBPM1</i>	K-TS	405,41 ± 21,87 A	99,92 ± 6,58 A	116,08 ± 4,64 A	4,08 ± 0,16 AB
	TS	331,89 ± 12,99 A*	84,97 ± 3,68 A	100,77 ± 3,97 A*	3,92 ± 0,11 AB
	K-OPO	357,97 ± 24,00 A	89,37 ± 5,99 A	104,69 ± 6,77 A	4,01 ± 0,05 A
	OPO	376,84 ± 25,17 A	98,78 ± 7,28 A	108,63 ± 5,95 A	3,82 ± 0,05 A#
<i>amiR-bpm</i>	K-TS	314,12 ± 22,23 B	82,97 ± 4,53 A	90,84 ± 5,94 B	3,78 ± 0,15 B
	TS	368,84 ± 34,23 A	86,87 ± 6,98 A	104,22 ± 9,82 A	4,23 ± 0,11 A*
	K-OPO	326,65 ± 9,45 A	83,57 ± 6,10 A	97,56 ± 0,62 A	4,25 ± 0,07 A
	OPO	328,29 ± 25,87 A	83,95 ± 6,50 A	97,00 ± 8,25 A	3,92 ± 0,10 A#



**Tablica 12.** Sadržaj klorofila *a* (Chl *a*), klorofila *b* (Chl *b*) i ukupnih karotenoida (Cars) te omjer klorofila *a* i *b* (Chl *a*/Chl *b*) u klijancima uročnjaka (*Arabidopsis thaliana*) s prekomjernom ekspresijom gena *DMS3* (*oeDMS3*), s mutiranim genom *DMS3* (*dms3-1*) i klijancima divljeg tipa (wt). Klijanci su prikupljeni u dvije vremenske točke, odmah nakon izlaganja temperaturi od 37 °C tijekom šest sati (TS), i nakon 24-satnog oporavka na 24 °C (OPO). Kontrolne skupine (K-TS i K-OPO) svake linije rasle su tijekom pokusa na 24 °C. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost pet bioloških replika ± standardna pogreška. Odgovor kontrolnih i tretiranih biljka (K-TS i TS, odnosno K-OPO i OPO) unutar pojedine linije (wt, *oeDMS3* ili *dms3-1*) analiziran je Studentovim *t*-testom; značajne razlike ( $p \leq 0,05$ ) između K-TS i TS obilježene su zvjezdicom (\*). Između K-OPO i OPO nisu zabilježene značajne razlike. Međusobna usporedba odgovora kontrolnih (K-TS ili K-OPO), odnosno tretiranih (TS ili OPO) biljaka različitih linija (wt, *oeDMS3* i *dms3-1*) provedena je jednosmjernom analizom varijance i *post hoc* testom Tukey HSD; značajne razlike ( $p \leq 0,05$ ) obilježene su različitim velikim slovima.

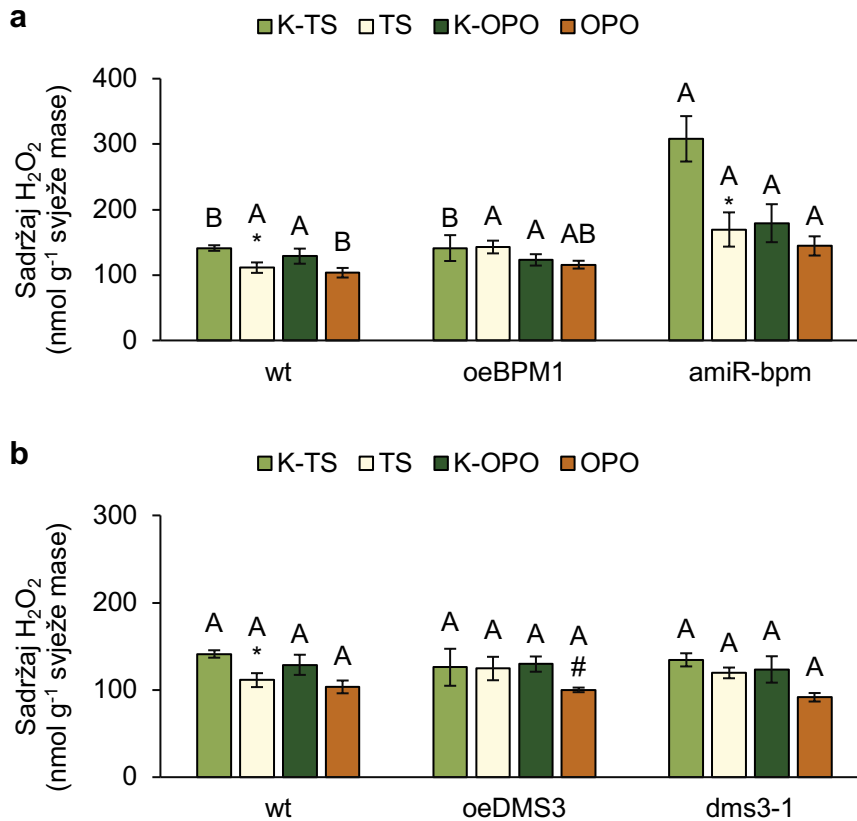
LINIJA	SKUPINA	Chl <i>a</i> ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	Chl <i>b</i> ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	Cars ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	Chl <i>a</i> /Chl <i>b</i>
wt	K-TS	214,60 ± 5,28 A	57,96 ± 2,58 A	63,40 ± 1,83 A	3,72 ± 0,09 A
	TS	216,70 ± 8,51 A	58,95 ± 3,54 A	66,39 ± 2,63 A	3,70 ± 0,11 A
	K-OPO	227,14 ± 12,54 A	66,42 ± 3,30 A	67,04 ± 3,21 A	3,42 ± 0,07 A
	OPO	230,69 ± 14,21 A	64,34 ± 2,53 A	71,56 ± 4,95 A	3,58 ± 0,12 A
<i>oeDMS3</i>	K-TS	214,13 ± 2,41 A	57,39 ± 0,51 A	61,16 ± 0,11 A	3,71 ± 0,03 A
	TS	227,83 ± 6,23 A	64,58 ± 1,37 A*	66,39 ± 2,02 A	3,53 ± 0,07 AB*
	K-OPO	200,26 ± 9,12 A	56,47 ± 1,97 A	60,15 ± 3,04 A	3,54 ± 0,08 A
	OPO	208,14 ± 4,91 A	59,63 ± 1,75 A	63,23 ± 1,59 A	3,50 ± 0,07 A
<i>dms3-1</i>	K-TS	237,73 ± 13,55 A	65,97 ± 2,98 A	66,30 ± 1,86 A	3,60 ± 0,07 A
	TS	204,04 ± 18,69 A	61,18 ± 3,92 A	59,79 ± 4,13 A	3,31 ± 0,10 B
	K-OPO	219,81 ± 11,32 A	63,55 ± 3,43 A	62,61 ± 2,47 A	3,46 ± 0,08 A
	OPO	218,10 ± 3,41 A	63,86 ± 2,21 A	63,16 ± 0,97 A	3,43 ± 0,09 A

### 4.2.3. Sadržaj vodikovog peroksida

Na sadržaj H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> izmjeren u prvoj vremenskoj točki u linijama s promijenjenom ekspresijom gena *BPM* utjecali su toplinski tretman ( $F = 10,64$ ,  $p \leq 0,01$ ) i genska pozadina biljke ( $F = 17,20$ ,  $p \leq 0,0001$ ), kao i njihova interakcija ( $F = 6,37$ ,  $p \leq 0,01$ ). Značajno niži sadržaj H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> izmjeren je u klijancima (TS) linije *amiR-bpm* i klijancima (TS) divljeg tipa nakon izlaganja toplinskom stresu (Slika 38a), dok u klijancima (TS) linije *oeBPM1* nisu uočene značajne promjene u sadržaju H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Usporedba genskih pozadina pokazala je značajno viši sadržaj H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u kontrolnim klijancima (K-TS) linije *amiR-bpm* u odnosu na liniju *oeBPM1* i divlji tip. S druge strane, u tretiranim klijancima (TS) nisu zabilježene značajne razlike s obzirom na gensku pozadinu. Prema dvosmjernoj analizi varijance, na sadržaj H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> izmjeren u drugoj vremenskoj točki, odnosno nakon oporavka, značajno je utjecala samo genska pozadina ( $F = 5,74$ ,  $p \leq 0,01$ ). Dakle, nakon 24 sata nisu zabilježene značajne promjene u sadržaju H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> između kontrolnih (K-OPO) i tretiranih klijanaca (OPO), neovisno o liniji (Slika 38a). Međutim, iako razlika nije bila statistički značajna, u tretiranim klijancima (OPO) divljeg tipa sadržaj H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bio je niži za 20% u odnosu na kontrolne klijance (K-OPO). Prema analizi varijance, nije zabilježena značajna razlika u kontrolnim klijancima (K-OPO) s obzirom na gensku pozadinu. No, u tretiranim klijancima (OPO) linije *amiR-bpm* zabilježen je značajno viši sadržaj H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u usporedbi s klijancima divljeg tipa. Tretirani klijanci (OPO) linije *oeBPM1* nisu pokazali značajnu razliku u sadržaju H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u usporedbi s linijom *amiR-bpm* i divljim tipom.

Sadržaj H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> izmjeren u prvoj vremenskoj točki u linijama s promijenjenom ekspresijom gena *DMS3* pokazao je ovisnost o toplinskim tretmanu ( $F = 2,51$ ,  $p \leq 0,05$ ). Značajno niži sadržaj H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> izmjeren je u tretiranim klijancima (TS) divljeg tipa u usporedbi s kontrolnim klijancima (K-TS). Nasuprot tome, tretirani klijanci (TS) linija *oeDMS3* i *dms3-1* nisu pokazali razliku u odnosu na odgovarajuću kontrolu (K-TS) (Slika 38b). Genska pozadina klijanaca nije prouzročila značajne promjene u sadržaju H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> između linija s promijenjenom ekspresijom gena *DMS3*, neovisno o tome jesu li klijanci bili kontrolni (K-TS) ili tretirani (TS). I u drugoj vremenskoj točki značajan je bio samo učinak toplinskog tretmana ( $F = 13,52$ ,  $p \leq 0,001$ ). Značajno niži sadržaj H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zabilježen je u tretiranim klijancima (OPO) linije *oeDMS3* u odnosu na kontrolne klijance (K-OPO) (Slika 38b). Značajne promjene u sadržaju H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nisu zabilježene u klijancima linije *dms3-1* kao ni u klijancima divljeg tipa. Iako nisu zabilježene značajne razlike, primijećeno je da su tretirani klijanci linije *dms3-1* imali 26% niži sadržaj H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, dok su tretirani klijanci divljeg tipa pokazali 20% niži sadržaj H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u usporedbi s

odgovarajućim kontrolama. Kao i u prvoj vremenskoj točki, genska pozadina klijanaca nije prouzročila značajne promjene u sadržaju  $H_2O_2$  između istraživanih linija.

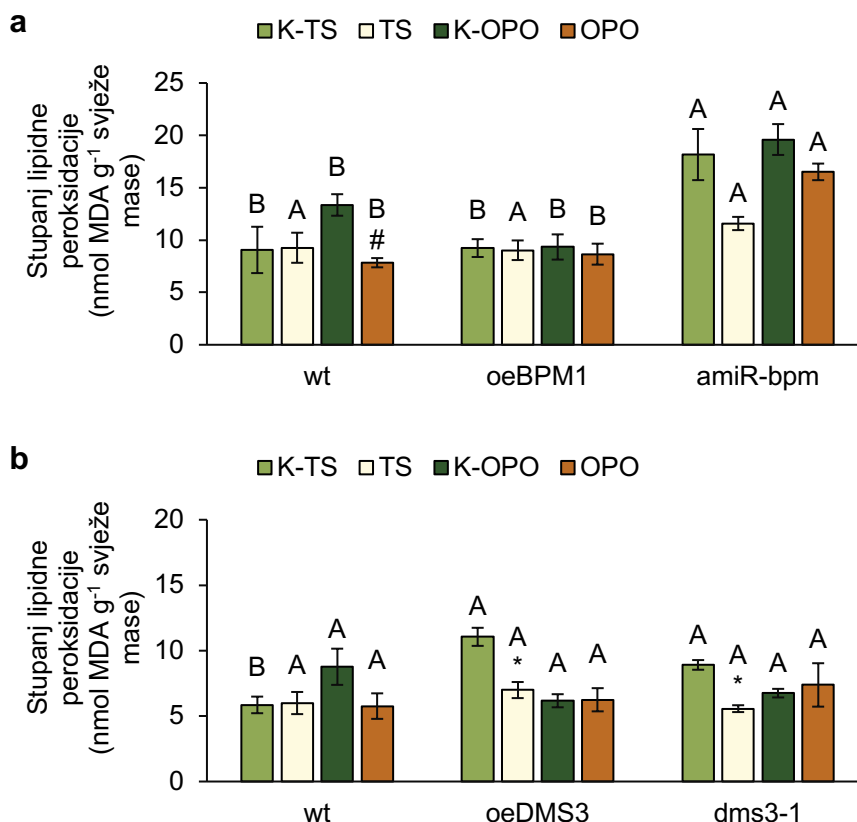


**Slika 38.** Sadržaj vodikovog peroksida ( $H_2O_2$ ) u klijancima uročnjaka (*Arabidopsis thaliana*) izloženih temperaturi od  $37\text{ }^\circ\text{C}$  tijekom šest sati. Istraživane su **(a)** linije s promijenjenom ekspresijom gena *BPM* – linija s prekomjernom ekspresijom gena *BPM1* (*oeBPM1*) i linija sa smanjenom ekspresijom gena *BPM1, 4, 5 i 6* (*amiR-bpm*), te **(b)** linije s promijenjenom ekspresijom gena *DMS3* – linija s prekomjernom ekspresijom gena *DMS3* (*oeDMS3*) i linija s mutiranim genom *DMS3* (*dms3-1*). Linije su uspoređivane s divljim tipom (wt). Klijanci su prikupljeni u dvije vremenske točke, prva – odmah nakon toplinskog tretmana (TS), a druga – nakon 24-satnog oporavka na  $24\text{ }^\circ\text{C}$  (OPO). Kontrolne skupine (K-TS i K-OPO) svake linije rasle su tijekom pokusa na  $24\text{ }^\circ\text{C}$ . Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost pet bioloških replika  $\pm$  standardna pogreška. Odgovor kontrolnih i tretiranih biljaka (K-TS i TS, odnosno K-OPO i OPO) unutar pojedine linije (wt, *oeBPM1*, *amiR-bpm*, *oeDMS3* ili *dms3-1*) analiziran je Studentovim *t*-testom; značajne razlike ( $p \leq 0,05$ ) između K-TS i TS obilježene su zvjezdicom (\*), a između K-OPO i OPO ljestvama (#). Međusobna usporedba odgovora kontrolnih (K-TS ili K-OPO), odnosno tretiranih (TS ili OPO) biljaka različitih linija (wt, *oeBPM1* i *amiR-bpm*, odnosno wt, *oeDMS3* i *dms3-1*) provedena je jednosmjernom analizom varijance i *post hoc* testom Tukey HSD; značajne razlike ( $p \leq 0,05$ ) obilježene su različitim velikim slovima.

#### 4.2.4. Stupanj lipidne peroksidacije

U prvoj vremenskoj točki u linijama s promijenjenom ekspresijom gena *BPM*, stupanj lipidne peroksidacije, izražen kao količina malondialdehida (MDA), pokazao je značajnu ovisnost o učinku genske pozadine ( $F = 8,79$ ,  $p \leq 0,01$ ). Prema tome, u prvoj vremenskoj točki nisu zabilježene značajne promjene u količini MDA između kontrolnih (K-TS) i tretiranih klijanaca (TS), neovisno o liniji (Slika 39a). Međutim, iako promjena nije bila statistički značajna, tretirani klijanci linije *amiR-bpm* (TS) imali su 36% manju količinu MDA u odnosu na kontrolne klijance (K-TS). Analizom genskih pozadina u kontrolnim klijancima (K-TS) linije *amiR-bpm* zabilježena je značajno viša količina MDA u usporedbi s linijom *oeBPM1* i divljim tipom. Usporedba tretiranih klijanaca (TS) linija *oeBPM1*, *amiR-bpm* i divljeg tipa nije pokazala značajne razlike. Na količinu MDA izmjerenu u drugoj vremenskoj točki u linijama s promijenjenom ekspresijom gena *BPM* utjecali su toplinski tretman ( $F = 12,36$ ,  $p \leq 0,01$ ) i genska pozadina ( $F = 41,49$ ,  $p \leq 0,0001$ ). Značajno niža količina MDA izmjerena je u tretiranim klijancima (OPO) divljeg tipa u odnosu na kontrolne klijance (K-OPO) (Slika 39a). Promjene u količini MDA nakon izlaganja povišenoj temperaturi nisu zabilježene u klijancima (OPO) linija *oeBPM1* i *amiR-bpm*. Usporedba genskih pozadina pokazala je značajno višu količinu MDA u kontrolnim (K-OPO) i tretiranim klijancima (OPO) linije *amiR-bpm* u odnosu na liniju *oeBPM1* i divlji tip.

Količina MDA izmjerena u prvoj vremenskoj točki u linijama s promijenjenom ekspresijom gena *DMS3* pokazala je ovisnost o toplinskom tretmanu ( $F = 24,26$ ,  $p \leq 0,0001$ ), genskoj pozadini ( $F = 13,32$ ,  $p \leq 0,001$ ) te njihovoj interakciji ( $F = 6,98$ ,  $p \leq 0,01$ ). Značajno niža količina MDA izmjerena je u tretiranim klijancima (TS) linija *oeDMS3* i *dms3-1*, dok tretirani klijanci (TS) divljeg tipa nisu pokazali razliku u odnosu na odgovarajuću kontrolu (K-TS) (Slika 39b). Usporedba učinka genskih pozadina pokazala je značajno višu količinu MDA u kontrolnim klijancima (K-TS) linija *oeDMS3* i *dms3-1* u odnosu na divlji tip. Tretirani klijanci (TS) nisu pokazali značajnu razliku u količini MDA s obzirom na gensku pozadinu. Nakon 24-satnog oporavka nije zabilježen značajan učinak toplinskog tretmana, genske pozadine te njihove interakcije na količinu MDA u linijama s promijenjenom ekspresijom gena *DMS3* (Slika 39b). Iako razlika nije bila statistički značajna, tretirani klijanci (OPO) divljeg tipa imali su 24 sata nakon tretmana 34% manju količinu MDA u odnosu na odgovarajuću kontrolu.

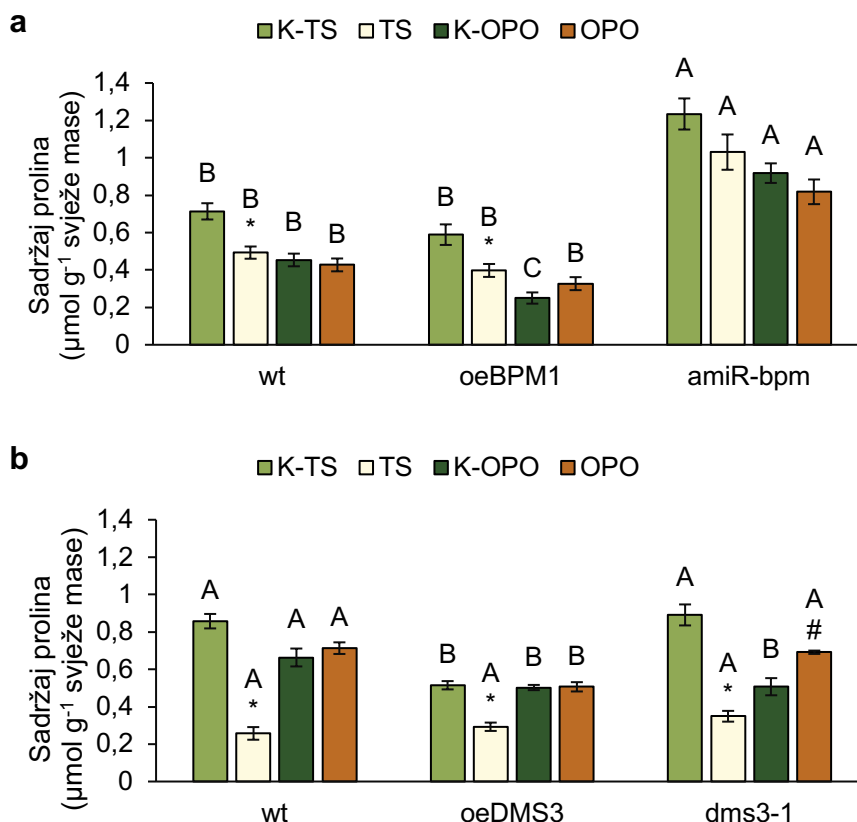


**Slika 39.** Stupanj lipidne peroksidacije u klijancima uročnjaka (*Arabidopsis thaliana*) izloženih temperaturi od 37 °C tijekom šest sati. Istraživane su (a) linije s promijenjenom ekspresijom gena *BPM* – linija s prekomjernom ekspresijom gena *BPM1* (*oeBPM1*) i linija sa smanjenom ekspresijom gena *BPM1*, 4, 5 i 6 (*amiR-bpm*), te (b) linije s promijenjenom ekspresijom gena *DMS3* – linija s prekomjernom ekspresijom gena *DMS3* (*oeDMS3*) i linija s mutiranim genom *DMS3* (*dms3-1*). Linije su uspoređivane s divljim tipom (wt). Klijanci su prikupljeni u dvije vremenske točke, prva – odmah nakon toplinskog tretmana (TS), a druga – nakon 24-satnog oporavka na 24 °C (OPO). Kontrolne skupine (K-TS i K-OPO) svake linije rasle su tijekom pokusa na 24 °C. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost pet bioloških replika ± standardna pogreška. Odgovor kontrolnih i tretiranih biljaka (K-TS i TS, odnosno K-OPO i OPO) unutar pojedine linije (wt, *oeBPM1*, *amiR-bpm*, *oeDMS3* ili *dms3-1*) analiziran je Studentovim *t*-testom; značajne razlike ( $p \leq 0,05$ ) između K-TS i TS obilježene su zvjezdicom (\*), a između K-OPO i OPO ljestvama (#). Međusobna usporedba odgovora kontrolnih (K-TS ili K-OPO), odnosno tretiranih (TS ili OPO) biljaka različitih linija (wt, *oeBPM1* i *amiR-bpm*, odnosno wt, *oeDMS3* i *dms3-1*) provedena je jednosmjernom analizom varijance i *post hoc* testom Tukey HSD; značajne razlike ( $p \leq 0,05$ ) obilježene su različitim velikim slovima.

#### 4.2.5. Sadržaj prolina

Na sadržaj prolina izmjeren u prvoj vremenskoj točki u linijama s promijenjenom ekspresijom gena *BPM* utjecali su toplinski tretman ( $F = 16,49$ ,  $p \leq 0,001$ ) i genska pozadina biljke ( $F = 60,90$ ,  $p \leq 0,0001$ ). Značajno niži sadržaj prolina izmjeren je u klijancima (TS) linije *oeBPM1* i klijancima (TS) divljeg tipa nakon izlaganja toplinskom tretmanu (Slika 40a). Promjene u sadržaju prolina nisu zabilježene u klijancima (TS) linije *amiR-bpm* nakon izlaganja povišenoj temperaturi. Usporedba genskih pozadina pokazala je značajno viši sadržaj prolina u kontrolnim (K-TS) i tretiranim klijancima (TS) linije *amiR-bpm* u odnosu na liniju *oeBPM1* i divlji tip. U drugoj vremenskoj točki značajnim se pokazao učinak genske pozadine ( $F = 94,03$ ,  $p \leq 0,0001$ ). Stoga nisu zabilježene značajne promjene u sadržaju prolina usporedbom kontrolnih (K-OPO) i tretiranih klijanaca (OPO), neovisno o liniji (Slika 40a). Iako porast nije bio značajan, u tretiranim klijancima (OPO) linije *oeBPM1* sadržaj prolina porastao je za 31%. Usporedba genskih pozadina pokazala je značajno viši sadržaj prolina u kontrolnim (K-OPO) i tretiranim klijancima (OPO) linije *amiR-bpm* u usporedbi s linijom *oeBPM1* i divljim tipom. Kontrolni klijanci (K-OPO) linije *oeBPM1* imali su značajno niži sadržaj prolina u odnosu na divlji tip.

Sadržaj prolina izmjeren u prvoj vremenskoj točki u linijama s promijenjenom ekspresijom gena *DMS3* pokazao je ovisnost o toplinskom tretmanu ( $F = 231,11$ ,  $p \leq 0,0001$ ), genskoj pozadini ( $F = 17,84$ ,  $p \leq 0,0001$ ) te njihovoj interakciji ( $F = 14,88$ ,  $p \leq 0,0001$ ). Značajno niži sadržaj prolina izmjeren je u tretiranim klijancima (TS) linija *oeDMS3* i *dms3-1* te u klijancima (TS) divljeg tipa u usporedbi s odgovarajućim kontrolama (K-TS) (Slika 40b). Usporedba genskih pozadina pokazala je značajno niži sadržaj prolina u kontrolnim klijancima (K-TS) linije *oeDMS3* u odnosu na liniju *dms3-1* i divlji tip. Tretirani klijanci (TS) nisu pokazali značajnu razliku u sadržaju prolina s obzirom na gensku pozadinu. I u drugoj vremenskoj točki značajan je bio učinak toplinskog tretmana ( $F = 7,81$ ,  $p \leq 0,05$ ), genske pozadine ( $F = 14,24$ ,  $p \leq 0,001$ ) i njihove interakcije ( $F = 3,52$ ,  $p \leq 0,05$ ). Značajno viši sadržaj prolina zabilježen je u tretiranim klijancima (OPO) linije *dms3-1* (Slika 40b). U usporedbi s odgovarajućim kontrolama (K-OPO), izlaganje povišenoj temperaturi nije prouzročilo promjene u sadržaju prolina u klijancima (OPO) linije *oeDMS3* i divljeg tipa. Međutim, klijanci (K-OPO) linija *oeDMS3* i *dms3-1* u kontrolnim uvjetima imali su značajno niži sadržaj prolina u odnosu na klijance (K-OPO) divljeg tipa. Također, tretirani klijanci (OPO) linije *oeDMS3* pokazali su značajno niži sadržaj prolina u odnosu na liniju *dms3-1* i divlji tip.



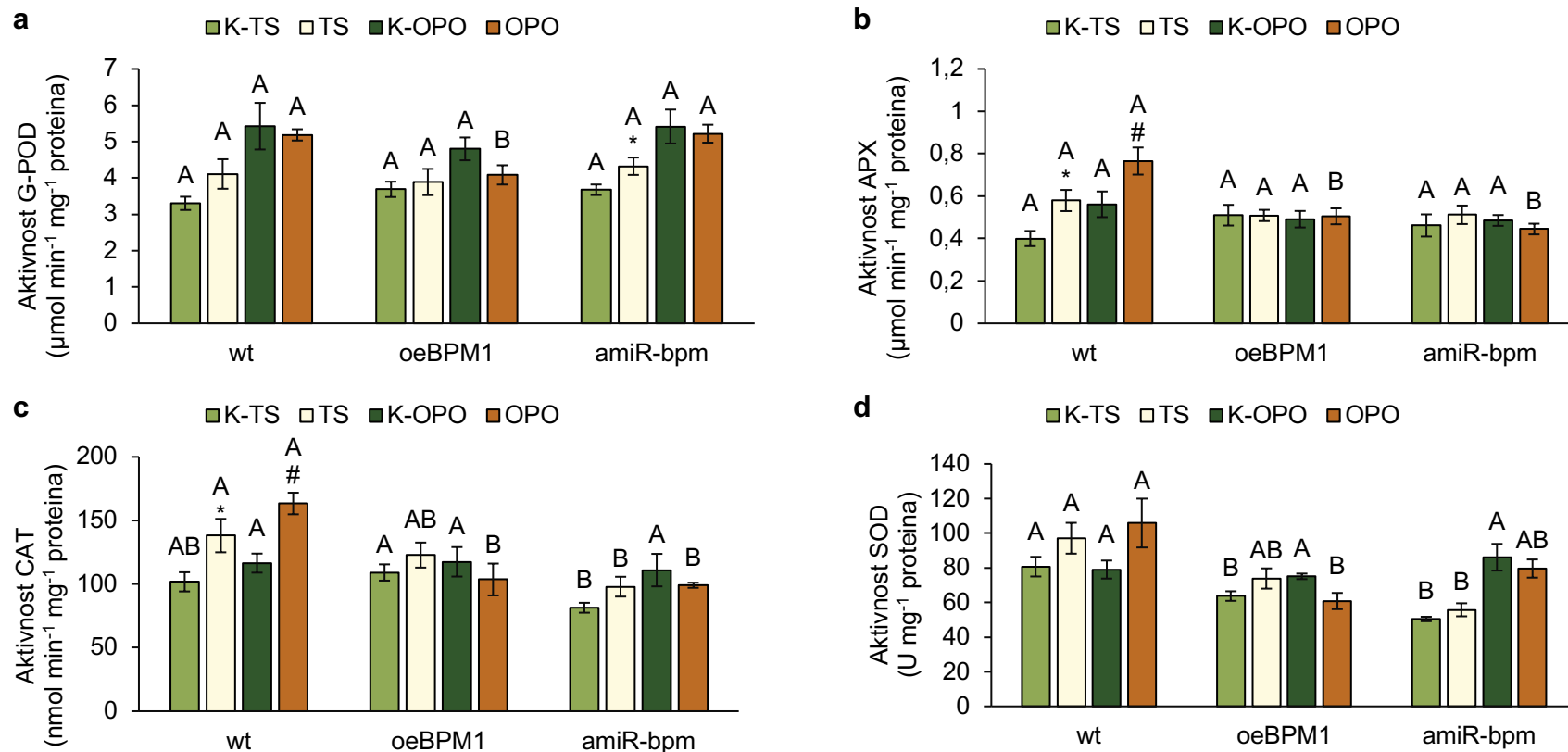
**Slika 40.** Sadržaj prolina u klijancima uročnjaka (*Arabidopsis thaliana*) izloženih temperaturi od 37 °C tijekom šest sati. Istraživane su (a) linije s promijenjenom ekspresijom gena *BPM* – linija s prekomjernom ekspresijom gena *BPM1* (*oeBPM1*) i linija sa smanjenom ekspresijom gena *BPM1*, 4, 5 i 6 (*amiR-bpm*), te (b) linije s promijenjenom ekspresijom gena *DMS3* – linija s prekomjernom ekspresijom gena *DMS3* (*oeDMS3*) i linija s mutiranim genom *DMS3* (*dms3-1*). Linije su uspoređivane s divljim tipom (wt). Klijanci su prikupljeni u dvije vremenske točke, prva – odmah nakon toplinskog tretmana (TS), a druga – nakon 24-satnog oporavka na 24 °C (OPO). Kontrolne skupine (K-TS i K-OPO) svake linije rasle su tijekom pokusa na 24 °C. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost pet bioloških replika ± standardna pogreška. Odgovor kontrolnih i tretiranih biljaka (K-TS i TS, odnosno K-OPO i OPO) unutar pojedine linije (wt, *oeBPM1*, *amiR-bpm*, *oeDMS3* ili *dms3-1*) analiziran je Studentovim *t*-testom; značajne razlike ( $p \leq 0,05$ ) između K-TS i TS obilježene su zvjezdicom (\*), a između K-OPO i OPO ljestvama (#). Međusobna usporedba odgovora kontrolnih (K-TS ili K-OPO), odnosno tretiranih (TS ili OPO) biljaka različitih linija (wt, *oeBPM1* i *amiR-bpm*, odnosno wt, *oeDMS3* i *dms3-1*) provedena je jednosmjernom analizom varijance i *post hoc* testom Tukey HSD; značajne razlike ( $p \leq 0,05$ ) obilježene su različitim velikim slovima.

#### 4.2.6. Aktivnost antioksidacijskih enzima

Na aktivnost G-POD izmjerenu u prvoj vremenskoj točki u linijama s promijenjenom ekspresijom gena *BPM* utjecao je toplinski tretman ( $F = 5,83$ ,  $p \leq 0,05$ ). Pri tome je značajno povećanje aktivnosti G-POD zabilježeno kod tretiranih klijanaca (TS) linije *amiR-bpm* (Slika 41a). Naprotiv, značajne promjene nisu uočene u klijancima (TS) linije *oeBPM1* i klijancima (TS) divljeg tipa odmah nakon izlaganja povišenoj temperaturi. Međutim, iako nije bila statistički značajna, u tretiranih klijanaca divljeg tipa aktivnost G-POD porasla je za 24% u odnosu na kontrolu. Usporedba genskih pozadina pokazala je da ne postoji razlika u aktivnosti G-POD unutar kontrolnih (K-TS) ili tretiranih klijanaca (TS), neovisno o istraživanoj liniji. Na aktivnost APX izmjerenu u prvoj vremenskoj točki također je utjecao samo tretman ( $F = 4,54$ ,  $p \leq 0,05$ ), dok su na aktivnost CAT utjecali tretman ( $F = 10,0$ ,  $p \leq 0,01$ ) i genska pozadina ( $F = 7,32$ ,  $p \leq 0,01$ ). Aktivnost oba enzima značajno je porasla u klijancima (TS) divljeg tipa nakon izlaganja povišenoj temperaturi (Slika 41b, c). Međutim, značajne promjene nisu uočene između kontrolnih (K-TS) i tretiranih klijanaca (TS) linija *oeBPM1* i *amiR-bpm*, iako je aktivnost enzima CAT u liniji *amiR-bpm* porasla za 20%. Vezano uz usporedbu genskih pozadina, analiza aktivnosti APX nije pokazala značajne razlike usporedbom kontrolnih (K-TS) ili tretiranih klijanaca (TS) istraživanih linija. S druge strane, u kontrolnim klijancima (K-TS) linije *amiR-bpm* izmjerena je značajno niža aktivnost CAT u usporedbi s klijancima linije *oeBPM1*, dok se kontrolni klijanci (K-TS) divljeg tipa nisu razlikovali od klijanaca linija *oeBPM1* i *amiR-bpm*. Zanimljivo, tretirani klijanci (TS) linije *amiR-bpm* imali su značajno nižu aktivnost CAT u odnosu na klijance divljeg tipa. Aktivnost CAT izmjerena u liniji *oeBPM1* nije se razlikovala od aktivnosti izmjerene u liniji *amiR-bpm* i divljem tipu. Na aktivnost enzima SOD značajno je utjecala genska pozadina ( $F = 22,81$ ,  $p \leq 0,0001$ ). Sukladno tome, nisu uočene značajne razlike usporedbom kontrolnih (K-TS) i tretiranih klijanaca (TS), neovisno o istraživanoj liniji (Slika 41d). Međutim, iako promjena nije bila značajna, aktivnost enzima SOD porasla je 20% u tretiranim klijancima divljeg tipa u odnosu na kontrolnu vrijednost. Usporedba genskih pozadina pokazala je da kontrolni klijanci (K-TS) linija *oeBPM1* i *amiR-bpm* imaju značajno nižu aktivnost SOD u odnosu na klijance divljeg tipa. Kod tretiranih klijanaca (TS), značajno niža aktivnost zabilježena je kod klijanaca linije *amiR-bpm* u odnosu na divlji tip. Linija *oeBPM1* nije bila značajno različita u odnosu na liniju *amiR-bpm* i divlji tip. Nakon 24-satnog oporavka, na aktivnost G-POD i SOD značajno je utjecala samo genska pozadina (G-POD –  $F = 3,53$ ,  $p \leq 0,05$ ; SOD –  $F = 5,41$ ,  $p \leq 0,05$ ). Nisu zabilježene značajne



razlike u aktivnosti spomenutih enzima između kontrolnih (K-OPO) i tretiranih klijanaca (OPO), neovisno o liniji, iako su tretirani klijanci divljeg tipa imali 34% višu aktivnost u usporedbi s kontrolnim klijancima (Slika 41a, d). Usporedbom kontrolnih klijanaca (K-OPO) linija *oeBPM1* i *amiR-bpm* te divljeg tipa također nisu zabilježene značajne promjene u aktivnosti G-POD i SOD. Međutim, tretirani klijanci (OPO) linije *oeBPM1* imali su značajno nižu aktivnost oba enzima u odnosu na klijance divljeg tipa. Također, aktivnost G-POD u tretiranim klijancima (OPO) linije *oeBPM1* bila je niža u odnosu na liniju *amiR-bpm*, dok se aktivnost SOD u tretiranim klijancima (OPO) linije *amiR-bpm* nije razlikovala od klijanaca *oeBPM1* i divljeg tipa. Aktivnosti APX i CAT značajno je ovisila o genskoj pozadini (APX –  $F = 10,78$ ,  $p \leq 0,001$ ; CAT –  $F = 5,52$ ,  $p \leq 0,05$ ) te interakciji tretmana i pozadine (APX –  $F = 3,91$ ,  $p \leq 0,05$ ; CAT –  $F = 4,72$ ,  $p \leq 0,05$ ). Aktivnost oba enzima bila je značajno veća u tretiranim klijancima (OPO) divljeg tipa u usporedbi s kontrolnim klijancima (K-OPO) (Slika 41b, c). Međutim, značajne promjene nisu uočene između kontrolnih (K-OPO) i tretiranih klijanaca (OPO) linija *oeBPM1* i *amiR-bpm*. Također, usporedbom kontrolnih klijanaca (K-OPO) linija *oeBPM1* i *amiR-bpm* te divljeg tipa također nisu zabilježene značajne promjene u aktivnosti APX i CAT. Tretirani klijanci (OPO) linija *oeBPM1* i *amiR-bpm* imali su značajno nižu aktivnost oba enzima u odnosu na klijance divljeg tipa.

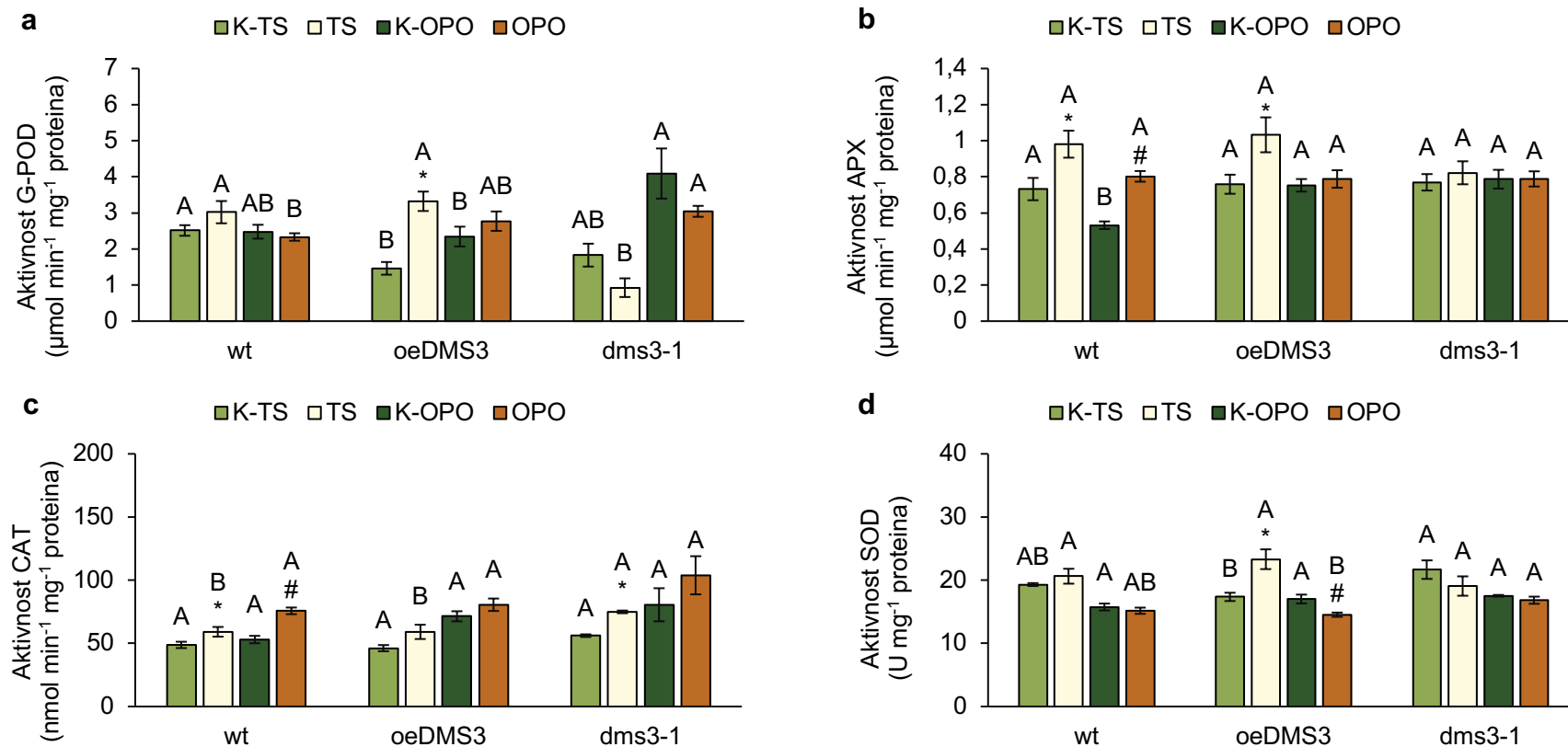


**Slika 41.** Aktivnost (a) gvajakol peroksidaze (G-POD), (b) askorbat peroksidaze (APX), (c) katalaze (CAT) i (d) superoksid dismutaze (SOD) u klijancima uročnjaka (*Arabidopsis thaliana*) s prekomjernom ekspresijom gena *BPM1* (*oeBPM1*), sa smanjenom ekspresijom gena *BPM1*, 4, 5 i 6 (*amiR-bpm*) i klijancima divljeg tipa (wt). Klijanci su prikupljeni u dvije vremenske točke, odmah nakon izlaganja temperaturi od 37 °C tijekom šest sati (TS), i nakon 24-satnog oporavka na 24 °C (OPO). Kontrolne skupine (K-TS i K-OPO) svake linije rasle su tijekom pokusa na 24 °C. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost pet bioloških replika  $\pm$  standardna pogreška. Odgovor kontrolnih i tretiranih biljka (K-TS i TS, odnosno K-OPO i OPO) unutar pojedine linije (wt, *oeBPM1*, ili *amiR-bpm*) analiziran je Studentovim *t*-testom; značajne razlike ( $p \leq 0,05$ ) između K-TS i TS obilježene su zvjezdicom (\*), a između K-OPO i OPO ljestvama (#). Međusobna usporedba odgovora kontrolnih (K-TS ili K-OPO), odnosno tretiranih (TS ili OPO) biljaka različitih linija (wt, *oeBPM1* i *amiR-bpm*) provedena je jednosmjernom analizom varijance i *post hoc* testom Tukey HSD; značajne razlike ( $p \leq 0,05$ ) obilježene su različitim velikim slovima.

U linijama s promijenjenom ekspresijom gena *DMS3* analiza aktivnosti G-POD pokazala je ovisnost o toplinskom tretmanu ( $F = 5,20, p \leq 0,05$ ), genskoj pozadini ( $F = 15,05, p \leq 0,0001$ ) i njihovoj interakciji ( $F = 14,46, p \leq 0,0001$ ). S druge strane, na aktivnost enzima SOD značajno je utjecala samo interakcija tretmana i genske pozadine ( $F = 5,49, p \leq 0,05$ ). Aktivnost oba enzima značajno je porasla u tretiranim klijancima (TS) linije *oeDMS3* u usporedbi s kontrolnim klijancima (K-TS) (Slika 42a, d). Naprotiv, značajne promjene u aktivnosti spomenutih enzima nisu uočene u klijancima (TS) linije *dms3-1* i klijancima (TS) divljeg tipa odmah nakon izlaganja povišenoj temperaturi. No, u tretiranim klijancima (TS) linije *dms3-1* aktivnost enzima G-POD pala je za 49%. Istovremeno, u tretiranim klijancima divljeg tipa aktivnost je porasla za 20%. Usporedba genskih pozadina pokazala je značajno nižu aktivnost G-POD u kontrolnim klijancima (K-TS) linije *oeDMS3* u odnosu na klijance divljeg tipa. Kontrolni klijanci (K-TS) linije *dms3-1* nisu pokazali značajne razlike u odnosu na klijance linije *oeDMS3* i divlji tip. S druge strane, tretirani klijanci (TS) linije *dms3-1* imali su značajno nižu aktivnost G-POD u odnosu na klijance linije *oeDMS3* i divlji tip. Analiza aktivnosti enzima SOD na razini genskih pozadina pokazala je višu aktivnost enzima u kontrolnim klijancima (K-TS) linije *dms3-1* u odnosu na liniju *oeDMS3*, dok se ona u klijancima divljeg tipa nije značajno razlikovala u odnosu na spomenute linije. Također, usporedba aktivnosti SOD u tretiranim klijancima (TS) istraživanih linija nije pokazala značajne razlike. Na aktivnost APX izmjerenu u prvoj vremenskoj točki također je utjecao samo tretman ( $F = 11,95, p \leq 0,01$ ), dok su na aktivnost CAT utjecali tretman ( $F = 28,95, p \leq 0,0001$ ) i genska pozadina ( $F = 9,83, p \leq 0,001$ ). Aktivnost oba enzima značajno je porasla u klijancima (TS) divljeg tipa nakon izlaganja povišenoj temperaturi (Slika 42b, c). Također, značajno veća aktivnost APX zabilježena je i u tretiranim klijancima (TS) linije *oeDMS3*, dok je aktivnost CAT bila značajno veća u tretiranim klijancima (TS) linije *dms3-1*. Iako promjena nije bila statistički značajna, aktivnost CAT porasla je 28% u tretiranim klijancima (TS) linije *oeDMS3* u usporedbi s kontrolnim klijancima. Vezano uz usporedbu genskih pozadina, analiza aktivnosti APX nije pokazala značajne razlike između kontrolnih (K-TS) ili tretiranih klijanaca (TS) istraživanih linija. Također, kontrolni klijanci (K-TS) istraživanih linija nisu pokazali značajnu razliku u aktivnosti CAT. Međutim, tretirani klijanci (TS) linije *dms3-1* imali su značajno veću aktivnost APX u odnosu na tretirane klijance (TS) linije *oeDMS3* i divlji tip.

Nakon 24-satnog oporavka, na aktivnost G-POD značajno je utjecala samo genska pozadina ( $F = 5,11, p \leq 0,05$ ). U skladu s time, nisu zabilježene značajne razlike u aktivnosti G-POD između kontrolnih (K-OPO) i tretiranih klijanaca (OPO), neovisno o liniji (Slika 42a). Unatoč

tome, aktivnost enzima G-POD pala je 26% u tretiranim klijancima (OPO) linije *dms3-1* u odnosu na kontrolne vrijednosti. Usporedba genskih pozadina pokazala je značajno veću aktivnost G-POD u kontrolnim (K-OPO) i tretiranim klijancima (OPO) linije *dms3-1*. Kontrolni klijanci (K-OPO) linije *dms3-1* pokazali su veću aktivnost u odnosu na klijance linije *oeDMS3*. Kod divljeg tipa nisu uočene razlike u odnosu na linije *oeDMS3* i *dms3-1*. S druge strane, tretirani klijanci (OPO) linije *dms3-1* značajno su se razlikovali od klijanaca divljeg tipa, dok se tretirani klijanci (OPO) linije *oeDMS3* nisu značajno razlikovali od linije *dms3-1* i divljeg tipa. Aktivnost APX pokazala je značajnu ovisnost o tretmanu ( $F = 9,45$ ,  $p \leq 0,01$ ), genskoj pozadini ( $F = 5,06$ ,  $p \leq 0,05$ ) i njihovoj međusobnoj interakciji ( $F = 6,41$ ,  $p \leq 0,01$ ). Naprotiv, na aktivnost CAT značajno je utjecao samo tretman ( $F = 6,70$ ,  $p \leq 0,05$ ). Aktivnost oba enzima značajno je porasla u tretiranim klijancima (OPO) divljeg tipa (Slika 42b, c), dok u linijama *oeDMS3* i *dms3-1* nisu uočene značajne razlike u aktivnosti APX i CAT između kontrolnih (K-OPO) i tretiranih klijanaca (OPO). Iako razlika nije bila statistički značajna, aktivnost CAT porasla je 29% u tretiranim klijancima (OPO) linije *dms3-1* u odnosu na kontrolne klijance. Vezano uz analizu genskih pozadina, uočena je značajno viša aktivnost APX u kontrolnim klijancima (K-OPO) linija *oeDMS3* i *dms3-1* u odnosu na klijance divljeg tipa. Naprotiv, usporedbom tretiranih klijanaca (OPO) istraživanih linija nisu uočene značajne razlike. Također, nisu uočene značajne promjene u aktivnosti CAT između različitih genskih pozadina, neovisno jesu li uspoređivani kontrolni (K-OPO) ili tretirani klijanci (OPO). Aktivnost enzima SOD značajno je ovisila o tretmanu ( $F = 8,90$ ,  $p \leq 0,01$ ) i genskoj pozadini ( $F = 6,04$ ,  $p \leq 0,01$ ). U tretiranim klijancima (OPO) linije *oeDMS3* zabilježena je značajno niža aktivnost SOD u usporedbi s kontrolnim klijancima (K-OPO) (Slika 42d), dok u linije *dms3-1*, odnosno u divljeg tipa nisu uočene značajne razlike između kontrolnih (K-OPO) i tretiranih klijanaca (OPO). Također, usporedba genskih pozadina nije pokazala značajne razlike između kontrolnih klijanaca (K-OPO) istraživanih linija. Naprotiv, tretirani klijanci (OPO) linije *dms3-1* imali su značajno veću aktivnost SOD u odnosu na klijance linije *oeDMS3*. Tretirani klijanci (OPO) divljeg tipa nisu se po aktivnosti SOD razlikovali od spomenutih linija.



**Slika 42.** Aktivnost (a) gvajakol peroksidaze (G-POD), (b) askorbat peroksidaze (APX), (c) katalaze (CAT) i (d) superoksid dismutaze (SOD) u klijancima uročnjaka (*Arabidopsis thaliana*) s prekomjernom ekspresijom gena *DMS3* (*oeDMS3*), s mutiranim genom *DMS3* (*dms3-1*) i klijancima divljeg tipa (wt). Klijanci su prikupljeni u dvije vremenske točke, odmah nakon izlaganja temperaturi od 37 °C tijekom šest sati (TS), i nakon 24-satnog oporavka na 24 °C (OPO). Kontrolne skupine (K-TS i K-OPO) svake linije rasle su tijekom pokusa na 24 °C. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost pet bioloških replika  $\pm$  standardna pogreška. Odgovor kontrolnih i tretiranih biljka (K-TS i TS, odnosno K-OPO i OPO) unutar pojedine linije (wt, *oeDMS3* ili *dms3-1*) analiziran je Studentovim *t*-testom; značajne razlike ( $p \leq 0,05$ ) između K-TS i TS obilježene su zvjezdicom (\*), a između K-OPO i OPO ljestvama (#). Međusobna usporedba odgovora kontrolnih (K- testom Tukey HSD; značajne razlike ( $p \leq 0,05$ ) obilježene su različitim velikim slovima.

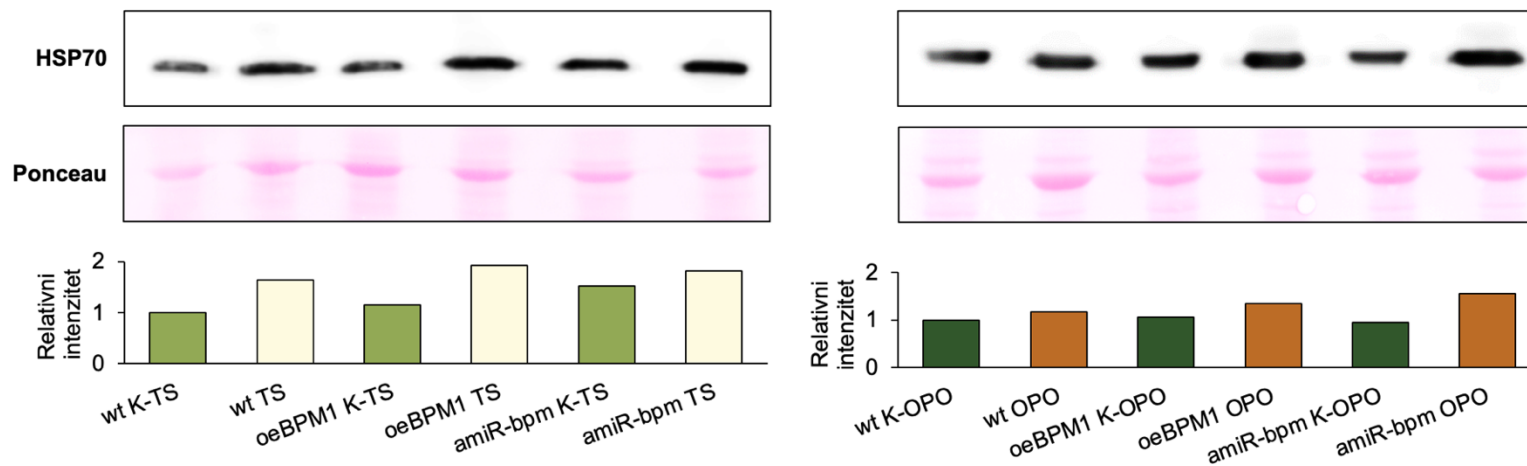
#### 4.2.7. Ekspresija proteina HSP70, HSP90 i RuBisCO

Odmah nakon izlaganja povišenoj temperaturi, ekspresija proteina HSP70 porasla je u tretiranim klijancima (TS) linije *oeBPM1* 1,7 puta, dok je u klijancima divljeg tipa porasla 1,6 puta u usporedbi s odgovarajućim kontrolama (K-TS) (Slika 43a). U tretiranim klijancima (TS) linije *amiR-bpm* nije zabilježen značajan porast (> 1,5) ekspresije proteina HSP70 odmah nakon toplinskog tretmana, ali je ekspresija porasla 1,6 puta nakon 24-satnog oporavka na 24 °C (OPO). S druge strane, u liniji *oeBPM1* i divljem tipu razina proteina HSP70 vratila se na kontrolne vrijednosti nakon oporavka. Usporedba genskih pozadina pokazala je da kontrolni klijanci (K-TS) linije *amiR-bpm* prikupljeni u prvoj vremenskoj točki imaju 1,5 puta višu ekspresiju proteina HSP70 u odnosu na klijance divljeg tipa. Međutim, navedena razlika nije potvrđena i u drugoj vremenskoj točki, odnosno tkivu sakupljenom 24 sata kasnije (K-OPO). Kontrolni klijanci linije *oeBPM1* nisu pokazali značajne razlike u ekspresiji proteina HSP70 u odnosu na klijance divljeg tipa niti u jednoj od analiziranih vremenskih točaka.

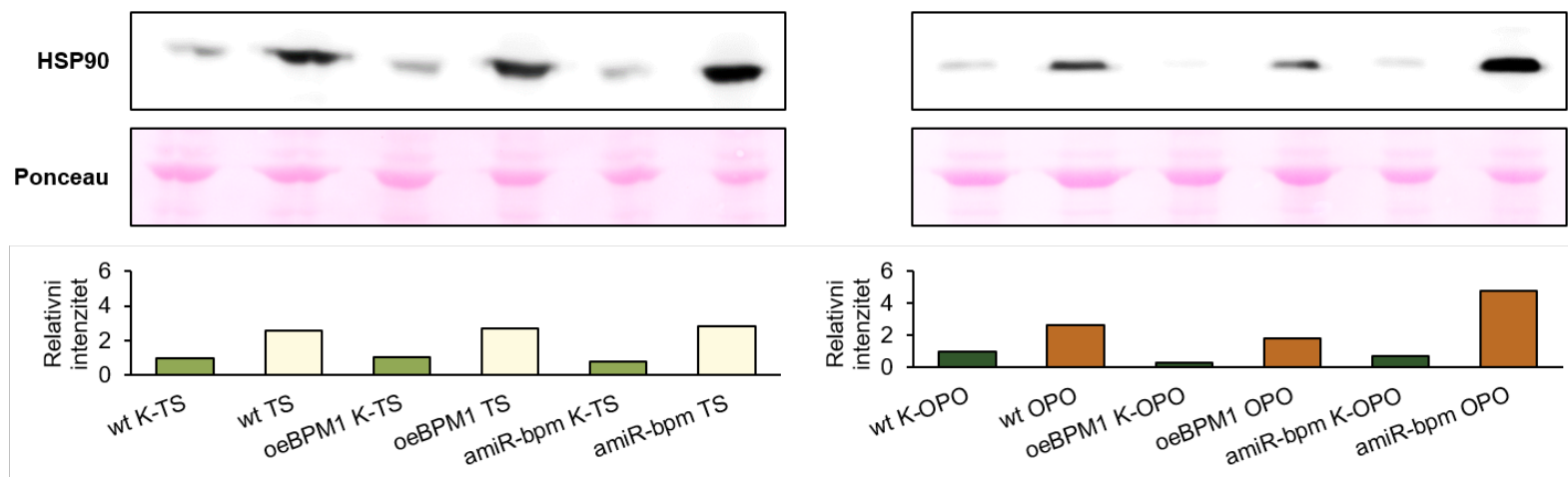
Za razliku od proteina HSP70, ekspresija proteina HSP90 značajno se inducirala u svim tretiranim klijancima (TS). U liniji *oeBPM1* i divljem tipu ekspresija je bila 2,6 puta veća u usporedbi s kontrolnim klijancima, dok je u liniji *amiR-bpm* ekspresija porasla 3,5 puta (Slika 43b). Zanimljivo, ekspresija proteina HSP90 dodatno se pojačala nakon oporavka tretiranih klijanaca (OPO) linija *oeBPM1* (5,8 puta) i *amiR-bpm* (6,8 puta), dok je u klijancima divljeg tipa ostala povećana 2,7 puta. Vezano uz usporedbu genskih pozadina, u prvoj vremenskoj točki nije zabilježena značajna razlika u ekspresiji proteina HSP90 između kontrolnih klijanaca (K-TS) linija *oeBPM1* i *amiR-bpm* te divljeg tipa. Nakon 24 sata, kontrolni klijanci (K-OPO) linije *oeBPM1* imali su 3,2 puta nižu razinu ekspresije proteina HSP90 u odnosu na klijance divljeg tipa, dok između kontrolnih klijanaca (K-OPO) linije *amiR-bpm* i divljeg tipa nije uočena razlika.

Ekspresija velike podjedinice proteina RuBisCO (*rbcL*) nije se značajno promijenila nakon izlaganja klijanaca toplinskom tretmanu, neovisno o istraživanoj liniji i vremenskoj točki (Slika 43c). Također, nije zabilježena značajna razlika u ekspresiji *rbcL* između kontrolnih klijanaca linija *oeBPM1* i *amiR-bpm* te divljeg tipa, neovisno o vremenskoj točki analize.

**a**

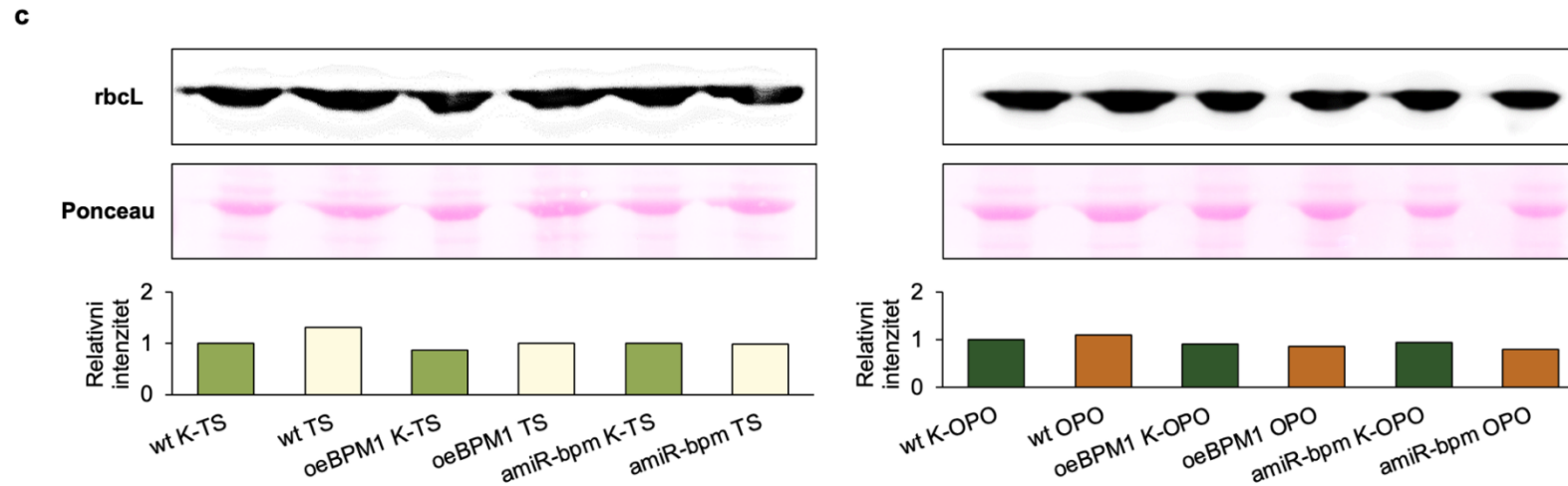


**b**



**Slika 43.** – nastavak na sljedećoj stranici

**Slika 43.** – nastavak s prethodne stranice



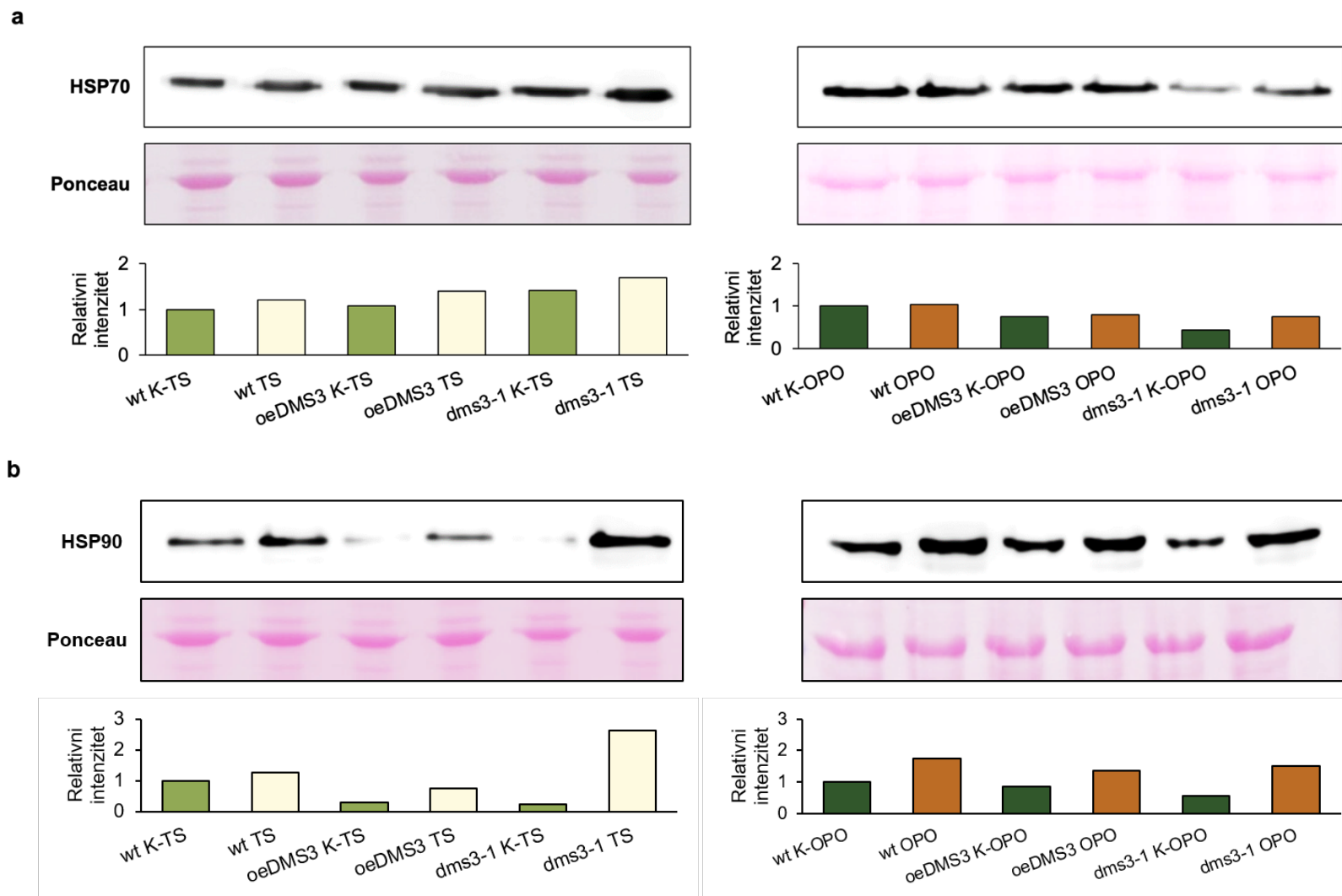
**Slika 43.** Imunodetekcija proteina (a) HSP70 i (b) HSP90 te (c) velike podjedinice proteina RuBisCO (*rbcL*) u klijanaca uročnjaka (*Arabidopsis thaliana*) s prekomjernom ekspresijom gena *BPM1* (*oeBPM1*), sa smanjenom ekspresijom gena *BPM1*, 4, 5 i 6 (*amiR-bpm*) i klijanacima divljeg tipa (wt). Klijaneci su prikupljeni u dvije vremenske točke, odmah nakon izlaganja temperaturi od 37 °C tijekom šest sati (TS), i nakon 24-satnog oporavka na 24 °C (OPO). Kontrolne skupine (K-TS i K-OPO) svake linije rasle su tijekom pokusa na 24 °C. Bojanje membrane bojom Ponceau korišteno je za kontrolu nanošenja uzoraka. U grafičkom prikazu rezultati su izraženi kao relativna vrijednost intenziteta vrpce u odnosu na wt K-TS i wt K-OPO (=1). Za svaki protein, provedena je imunodetekcija tri biološke replike, odnosno membrane, te je za prikaz odabrana jedna reprezentativna membrana.



U tretiranim klijancima (TS) linija s promijenjenom ekspresijom gena *DMS3* nije zabilježena značajnija promjena ekspresije proteina HSP70 odmah nakon izlaganja povišenoj temperaturi (Slika 44a). Međutim, nakon 24 sata tretirani klijanci linije *dms3-1* imali su 1,7 puta višu ekspresiju u odnosu na kontrolne klijance (K-OPO), dok u liniji *oeDMS3* i divljem tipu nisu uočene razlike između kontrolnih i tretiranih klijanaca. Međusobna usporedba genskih pozadina u prvoj vremenskoj točki nije pokazala značajne razlike u ekspresiji proteina HSP70 između kontrolnih klijanaca (K-TS) linija *oeDMS3* i *dms3-1* te divljeg tipa. Nakon 24 sata, kontrolni klijanci (K-OPO) linije *dms3-1* imali su 2,3 puta nižu razinu ekspresije proteina HSP70 u odnosu na klijance divljeg tipa, dok između kontrolnih klijanaca (K-OPO) linije *oeDMS3* i divljeg tipa nije uočena razlika.

Toplinski tretman inducirao je ekspresiju proteina HSP90 2,5 puta u tretiranim klijancima (TS) linije *oeDMS3* te 11,3 puta u klijancima linije *dms3-1* (Slika 44b). Iako se ekspresija proteina u tretiranim klijancima smanjila nakon 24-satnog oporavka na 24 °C (OPO), i dalje je ostala značajno povišena u odnosu na kontrolne klijance. Pri tome je u liniji *oeDMS3* bila povišena 1,6 puta, u liniji *dms3-1* 2,7 puta, a u divljem tipu 1,8 puta. Usporedba genskih pozadina pokazala je da kontrolni klijanci (K-TS) linija *oeDMS3* i *dms3-1* prikupljeni u prvoj vremenskoj točki imaju 3,3 puta, odnosno 4,3 puta nižu ekspresiju proteina HSP90 u odnosu na klijance divljeg tipa. Također, 1,8 puta niža ekspresija proteina HSP90 u kontrolnim klijancima (K-OPO) linije *dms3-1* opažena je u drugoj vremenskoj točki, odnosno 24 sata kasnije. Kontrolni klijanci (K-OPO) linije *oeDMS3* nisu pokazali značajne razlike nakon 24 sata u odnosu na klijance divljeg tipa.

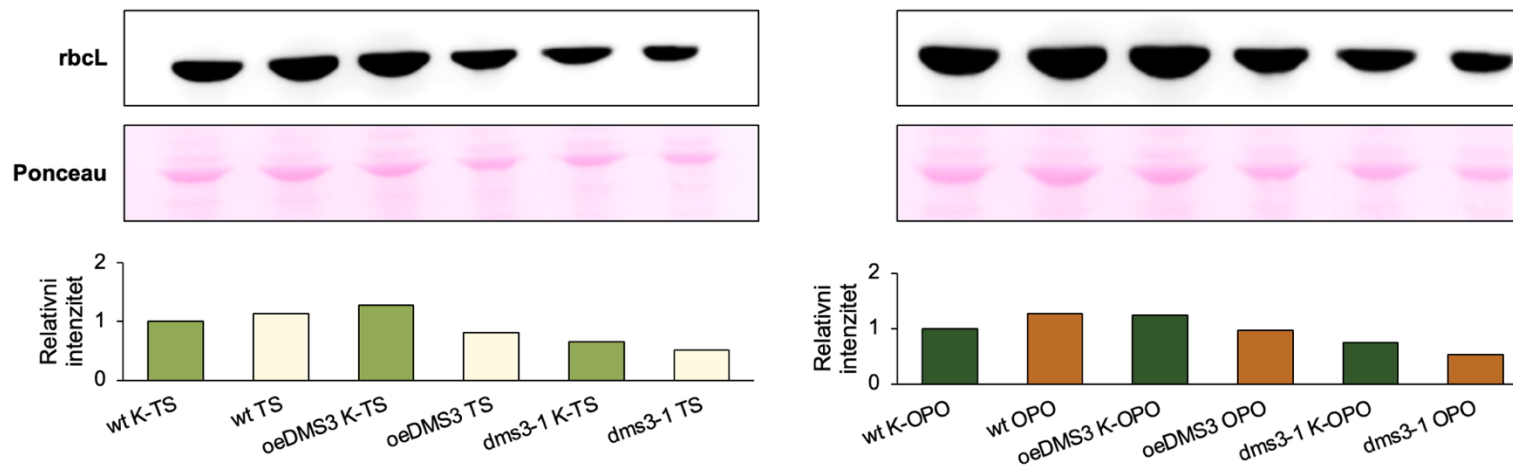
Ekspresija *rbcL* smanjila se 1,6 puta u tretiranim klijancima (TS) linije *oeDMS3* odmah nakon izlaganja povišenoj temperaturi (Slika 44c). Usporedbom tretiranih (TS) i kontrolnih klijanaca (K-TS) linije *dms3-1*, kao i tretiranih i kontrolnih klijanaca divljeg tipa, nisu uočene značajne promjene u ekspresiji *rbcL* u prvoj vremenskoj točki. Nakon 24 sata nije zabilježena značajna razlika u ekspresiji *rbcL* između kontrolnih (K-OPO) i tretiranih klijanaca (OPO), neovisno o genskoj pozadini. Usporedba genskih pozadina u kontrolnim uvjetima pokazala je da klijanci linije *dms3-1* prikupljeni u obje vremenske točke imaju ~1,5 puta nižu ekspresiju *rbcL* u odnosu na klijance divljeg tipa. U usporedbi s divljim tipom, kontrolni klijanci linije *oeDMS3* nisu pokazali značajne razlike u ekspresiji *rbcL*, neovisno o vremenskoj točki.



Slika 44. – nastavak na sljedećoj stranici

Slika 44. – nastavak s prethodne stranice

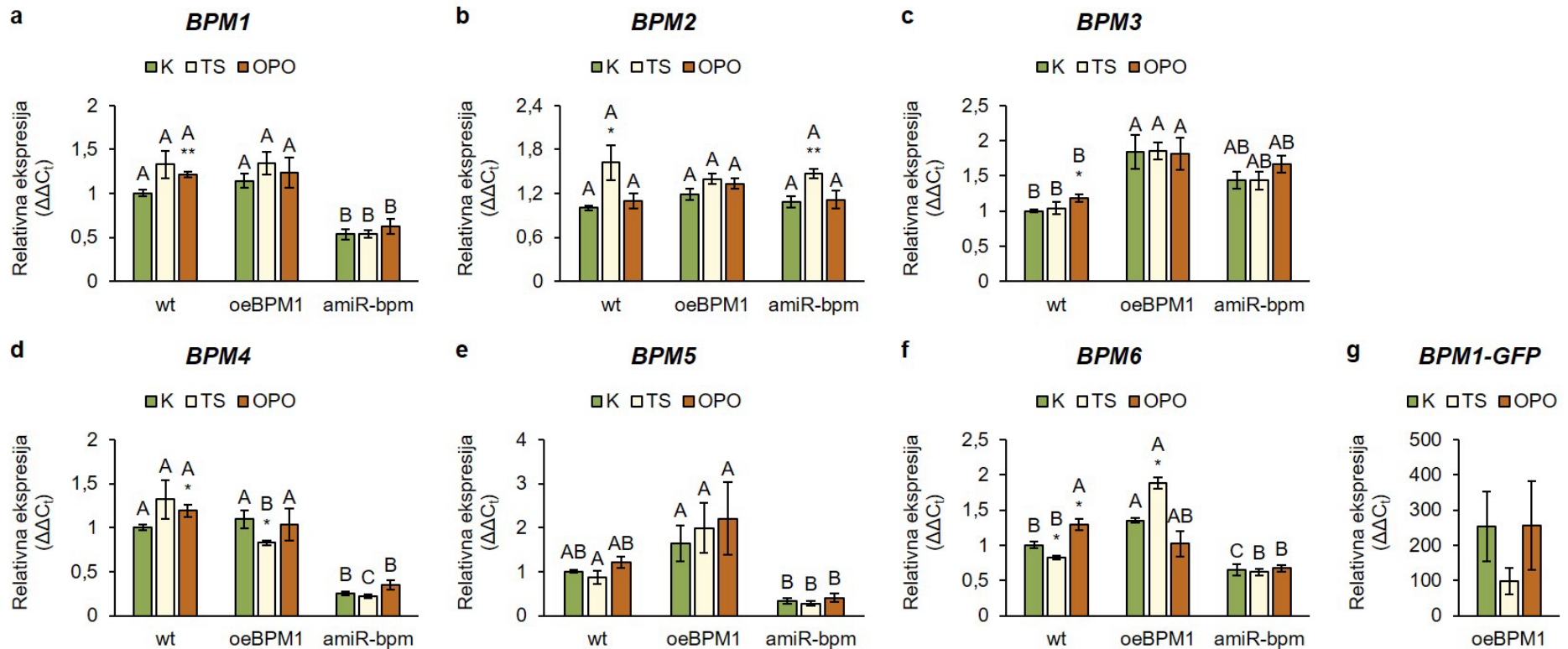
c



**Slika 44.** Imunodetekcija proteina (a) HSP70 i (b) HSP90 te (c) velike podjedinice proteina RuBisCO (*rbcL*) u klijanaca uročnjaka (*Arabidopsis thaliana*) s prekomjernom ekspresijom gena *DMS3* (*oeDMS3*), s mutiranim genom *DMS3* (*dms3-1*) i klijanacima divljeg tipa (wt). Klijaneci su prikupljeni u dvije vremenske točke, odmah nakon izlaganja temperaturi od 37 °C tijekom šest sati (TS), i nakon 24-satnog oporavka na 24 °C (OPO). Bojanje membrane bojom Ponceau korišteno je za kontrolu nanošenja uzoraka. U grafičkom prikazu rezultati su izraženi kao relativna vrijednost intenziteta vrpce u odnosu na wt K-TS i wt K-OPO (=1). Za svaki protein, provedena je imunodetekcija tri biološke replike, odnosno membrane, te je za prikaz odabrana jedna reprezentativna membrana.

#### 4.2.8. Ekspresija gena *BPM*

S obzirom na to da provjerom sintetizirane cDNA nisam uočila kontaminaciju genomskom DNA (Prilog 7.), analizirala sam ekspresiju gena *BPM* u klijancima linija s promijenjenom ekspresijom gena *BPM* (*oeBPM1*, *amiR-bpm*) te u klijancima divljeg tipa. Relativnu ekspresiju nativnih gena *BPM1-6* analizirala sam u linijama *oeBPM1* i *amiR-bpm* te u divljem tipu, a ekspresiju transgena *BPM1-GFP* samo u liniji *oeBPM1*. Ekspresija gena analizirana je prije izlaganja klijanaca povišenoj temperaturi (K), odmah nakon izlaganja (TS) te nakon 24-satnog oporavka na temperaturi uzgoja (OPO). Značajne promjene u ekspresiji gena *BPM2*, *BPM4* i *BPM6* u odnosu na kontrolne vrijednosti (K) uočene su odmah nakon izlaganja klijanaca povišenoj temperaturi (TS) (Slika 45b, d, f). Pri tome, ekspresija gena *BPM2* značajno se povisila u liniji *amiR-bpm* i divljem tipu, dok u liniji *oeBPM1* nisu uočene značajne razlike. S druge strane, ekspresija gena *BPM4* u liniji *oeBPM1* značajno se smanjila, dok je ekspresija *BPM6* značajno porasla. Nasuprot tome, ekspresija gena *BPM6* u divljem tipu značajno se smanjila. Kod linije *amiR-bpm* nisu uočene značajne promjene u ekspresiji gena *BPM4* i *BPM6*. Nakon oporavka, značajne promjene u ekspresiji gena uočene su samo u tretiranim klijancima (OPO) divljeg tipa. Uočen je značajan porast ekspresije gena *BPM1*, *BPM3*, *BPM4* i *BPM6* (Slika 45a, c, d, f). Usporedbom tretiranih (OPO) i kontrolnih klijanaca (K), u linijama *oeBPM1* i *amiR-bpm* nisu uočene promjene u ekspresiji navedenih gena nakon oporavka. Također, značajna promjena ekspresije gena *BPM5* nije zabilježena niti u jednoj od istraživanih linija (Slika 45e). Iako se ekspresija transgena *BPM1-GFP* smanjila 61% odmah nakon izlaganja klijanaca stresu (TS), promjena nije bila statistički značajna u odnosu na kontrolne vrijednosti (Slika 45g). Usporedbom genskih pozadina pokazano je da kontrolni klijanci linije *amiR-bpm* imaju smanjenu ekspresiju gena *BPM1*, 4, 5 i 6 u odnosu na liniju *oeBPM1* i divlji tip. Zanimljivo, kontrolni klijanci divljeg tipa imali su smanjenu ekspresiju gena *BPM3* i 6 u usporedbi s linijom *oeBPM1*.



**Slika 45.** Relativna ekspresija nativnih gena (a) *BPM1*, (b) *BPM2*, (c) *BPM3*, (d) *BPM4*, (e) *BPM5* i (f) *BPM6* u klijancima uročnjaka (*Arabidopsis thaliana*) s prekomjernom ekspresijom gena *BPM1* (*oeBPM1*), sa smanjenom ekspresijom gena *BPM1*, 4, 5 i 6 (*amiR-bpm*) i klijancima divljeg tipa (wt). Ekspresija transgena (g) *BPM1-GFP* određena je u liniji *oeBPM1*. Klijanci su prikupljeni prije izlaganja temperaturi od 37 °C (K), odmah nakon izlaganja 37 °C (TS) te nakon 24-satnog oporavka na 24 °C (OPO). Rezultati su izraženi kao relativna srednja vrijednost tri biološke replike ± standardna pogreška u odnosu na wt K (=1). Zvezdica označava značajnu razliku (Studentov *t*-test) između K i TS ili K i OPO za svaku liniju pri  $p \leq 0,05$  (\*) ili  $p \leq 0,01$  (\*\*). Međusobna usporedba odgovora kontrolnih (K), odnosno tretiranih (TS ili OPO) biljaka različitih linija (wt, *oeBPM1* i *amiR-bpm*) provedena je jednosmjernom analizom varijance i *post hoc* testom Tukey HSD; značajne razlike ( $p \leq 0,05$ ) obilježene su različitim velikim slovima.

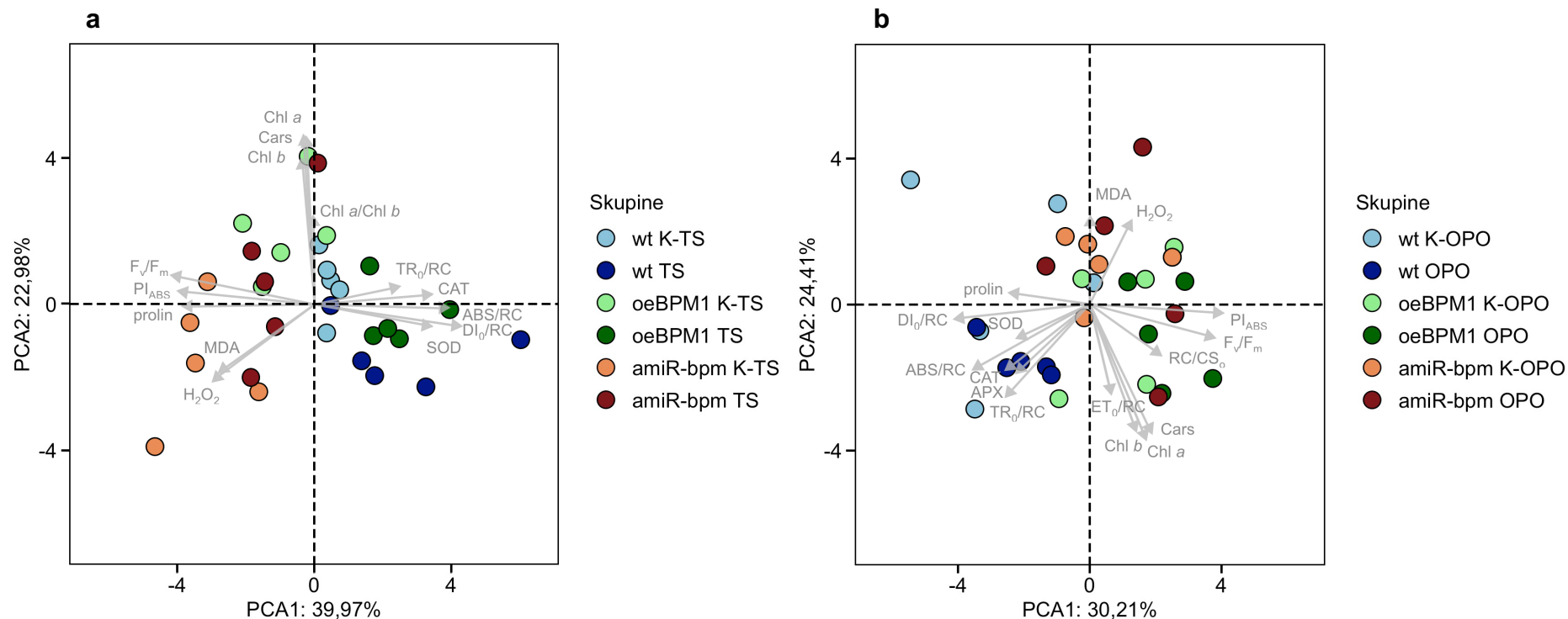
#### 4.2.9. Multivarijatna analiza parametara mjerenih u stadiju klijanaca

Za usporedbu odgovora na toplinski stres linija s promijenjenom ekspresijom gena *BPM* (*oeBPM1*, *amiR-bpm*), odnosno gena *DMS3* (*oeDMS3*, *dms3-1*) provedena je multivarijatna analiza PCA. Analiza je provedena zasebno za svaku vremensku točku te je postupak detaljno opisan u poglavlju 3.4. Obrada i statistička analiza podataka.

Za klijance linija s promijenjenom ekspresijom gena *BPM* prikupljene u prvoj vremenskoj točki, grafikon loma pokazao je da prve četiri komponente (PCA1 – PCA4) čine 82,05% ukupne varijance (Prilog 8a). Međutim, komponente PCA3 i PCA4 nisu korištene za daljnje usporedbe jer nisu pružile dodatne informacije o odgovoru klijanaca na toplinski stres. Vrijednost  $\cos^2$ , koja mjeri koliko parametar doprinosi određenoj komponenti u PCA, imala je vrijednosti blizu nule za parametre  $ET_0/RC$ ,  $RC/CS_0$ , G-POD i APX, što ukazuje na nizak doprinos tih parametara komponentama PCA1 i PCA2 te su navedeni parametri isključeni iz daljnje analize (Prilog 9a). Model PCA za klijance prikupljene u prvoj vremenskoj točki pokazao je jači učinak toplinskog stresa na liniju *oeBPM1* i divlji tip u usporedbi s linijom *amiR-bpm* (Slika 46a). Tretirani klijanci (TS) linije *oeBPM1* odvojili su se od kontrolnih klijanaca (K-TS) na temelju smanjenja fotosintetske učinkovitosti ( $PI_{ABS}$ ,  $F_v/F_m$ , sadržaja pigmenata) i porasta tokova energije ( $ABS/RC$ ,  $DI_0/RC$ ). Također, u tretiranih klijanaca (TS) zabilježen je smanjen sadržaj prolina te porast aktivnosti enzima CAT i SOD. Klijanci divljeg tipa pokazali su vrlo sličan obrazac ponašanja kao i klijanci linije *oeBPM1* pa je tako kod tretiranih klijanaca (TS) isto došlo do pada fotosintetske učinkovitosti (sadržaja pigmenata,  $PI_{ABS}$ ) i sadržaja prolina, dok je aktivnost antioksidacijskih enzima CAT i SOD porasla. Kontrolni klijanci linije *oeBPM1* odvojili su se blago od klijanaca divljeg tipa na temelju višeg sadržaja pigmenata. Kod linije *amiR-bpm* nije uočeno značajnije razdvajanje kontrolnih (K-TS) i tretiranih klijanaca (TS), odnosno nije zamijećen jasan učinak toplinskog stresa. Ali, ova se linija, osobito kontrolni klijanci, jasno odvojila od divljeg tipa i linije *oeBPM1* na temelju povećanog sadržaja prolina i  $H_2O_2$  te stupnja lipidne peroksidacije (MDA).

Za klijance prikupljene u drugoj vremenskoj točki, grafikon loma pokazao je da prvih šest komponenti (PCA1 – PCA6) čini 86,24% ukupne varijance (Prilog 8b). Međutim, komponente PCA3-6 isključene su iz daljnjih analiza zbog njihovog zanemarivog doprinosa procjeni odgovora klijanaca na toplinski stres. Na temelju vrijednosti  $\cos^2$  parametri  $Chl\ a/Chl\ b$  i G-POD isključeni su iz daljnje analize (Prilog 9b). Model PCA za klijance prikupljene nakon oporavka nije pokazao razliku između kontrolnih (K-OPO) i tretiranih klijanaca (OPO),

neovisno o istraživanoj liniji (Slika 46b). Međutim, primijećeno je grupiranje na temelju razlika genskih pozadina. Linija *amiR-bpm* izdvojila se od linije *oeBPM1* i divljeg tipa na temelju povećanog sadržaja prolina,  $H_2O_2$  i MDA. Za liniju *oeBPM1* bila je karakteristična pozitivna korelacija s fotosintetskom učinkovitošću (sadržaj pigmenata,  $F_v/F_m$ ,  $PI_{ABS}$ ), dok je za divlji tip bila značajna povišena aktivnost antioksidacijskih enzima (APX, SOD, CAT) te energetske tokova u fotosintezi ( $ABS/RC$ ,  $TR_0/RC$ ,  $DI_0/RC$ ).

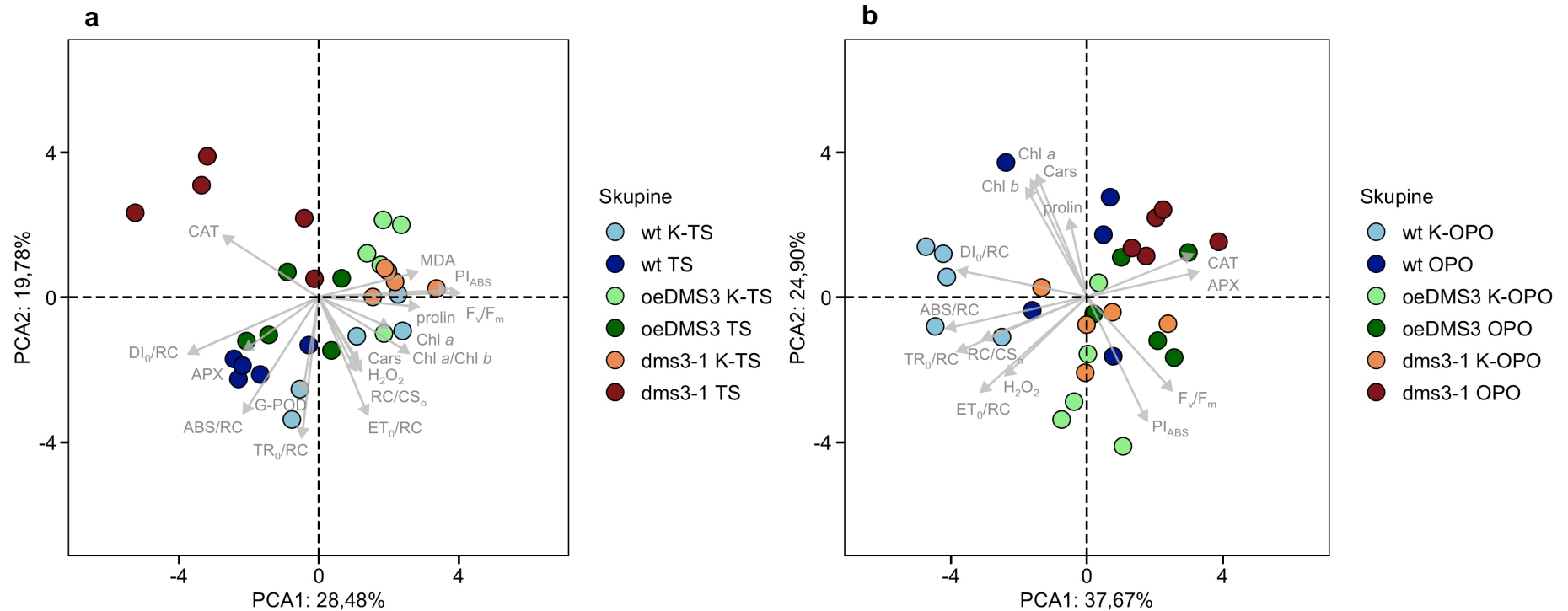


**Slika 46.** Analiza glavnih komponenti (PCA) parametara izmjerenih u klijanaca uročnjaka (*Arabidopsis thaliana*) s prekomjernom ekspresijom gena *BPM1* (*oeBPM1*), sa smanjenom ekspresijom gena *BPM1*, 4, 5 i 6 (*amiR-bpm*) i klijanacima divljeg tipa (wt). Klijaneci su prikupljeni u dvije vremenske točke – **(a)** odmah nakon izlaganja temperaturi od 37 °C u trajanju od šest sati (TS), i **(b)** nakon 24-satnog oporavka na 24 °C (OPO). Kontrolne skupine (K-TS i K-OPO) svake linije rasle su tijekom pokusa na 24 °C. Analiza je provedena na pet pojedinačnih bioloških replika po liniji i skupini. Ovisno o vremenskoj točki, analizirani su parametri: maksimalni kvantni prinos fotosustava II ( $F_v/F_m$ ), indeks fotosintetske učinkovitosti ( $PI_{ABS}$ ), apsorpcija svjetlosti ( $ABS/RC$ ), protok uhvaćenih fotona ( $TR_0/RC$ ), prijenos elektrona ( $ET_0/RC$ ), rasipanje energije po reakcijskom centru ( $DI_0/RC$ ), gustoća aktivnih reakcijskih centara po osvjetljenoj površini lista ( $RC/CS_0$ ), omjer klorofila *a* i klorofila *b* ( $Chl\ a/Chl\ b$ ), sadržaj klorofila *a* ( $Chl\ a$ ), klorofila *b* ( $Chl\ b$ ), ukupnih karotenoida ( $Cars$ ), vodikovog peroksida ( $H_2O_2$ ) i prolina, stupanj lipidne peroksidacije ( $MDA$ ) te aktivnost enzima gvajakol peroksidaze (G-POD), askorbat peroksidaze (APX), katalaze (CAT) i superoksid dismutaze (SOD).



Vezano uz analizu klijanaca linija s promijenjenom ekspresijom gena *DMS3* prikupljenih u prvoj vremenskoj točki, grafikon loma pokazao je da prvih pet komponenti čini 77,25% ukupne varijance (Prilog 8c). Međutim, komponente PCA3, PCA4 i PCA5 nisu bile uključene u daljnju analizu. Na temelju vrijednosti  $\cos^2$ , parametri Chl *b* i SOD isključeni su iz daljnje analize (Prilog 9c). Model PCA pokazao je učinak toplinskog stresa na sve istraživane linije, međutim do najvećeg odvajanja od pripadajuće kontrole došlo je u klijanaca linije *dms3-1* (Slika 47a). Prema modelu, do odvajanja tretiranih klijanaca (TS) od kontrolnih (K-TS) kod ove linije došlo je zbog smanjenja fotosintetske učinkovitosti ( $F_v/F_m$ ,  $PI_{ABS}$ , sadržaj pigmenata), sadržaja prolina i stupnja lipidne peroksidacije u tretiranih klijanaca (TS). Također, odvajanju je pridonijela značajno povećana aktivnost enzima CAT u tretiranim kljancima (TS). Odvajanju tretiranih klijanaca (TS) od kontrolnih (K-TS) linije *oeDMS3* i divljeg tipa doprinijeli su povećana aktivnost antioksidacijskih enzima (G-POD, APX, CAT), smanjenje fotosintetske učinkovitosti te sadržaja prolina u tretiranih klijanaca (TS).

Iako je grafikon loma pokazao da prvih šest komponenti objašnjava 83,25% ukupne varijance u klijanaca prikupljenih u drugoj vremenskoj točki, komponente PCA3-6 nisu bile uključene u daljnju analizu jer nisu dodatno doprinijele analizi odgovora na toplinski stres (Prilog 8d). Na temelju vrijednosti  $\cos^2$ , parametri Chl *a*/Chl *b*, stupanj lipidne peroksidacije (MDA), G-POD i SOD isključeni su iz daljnje analize (Prilog 9d). Dan nakon izlaganja klijanaca povišenoj temperaturi, u tretiranim kljancima (OPO) divljeg tipa opažena je značajno viša aktivnost antioksidacijskih enzima CAT i APX te smanjena učinkovitost glavnih fotosintetskih tokova energije ( $ABS/RC$ ,  $TR_0/RC$ ,  $ET_0/RC$ ,  $DI_0/RC$ ) (Slika 47b). Tretirani kljanci (OPO) linije *dms3-1* odvojili su se od pripadajućih kontrola (K-OPO) zbog pada fotosintetske učinkovitosti i smanjenja glavnih energetske tokova ( $PI_{ABS}$ ,  $ABS/RC$ ,  $TR_0/RC$ ,  $ET_0/RC$ ). Odvajanju je doprinijelo i smanjenje sadržaja  $H_2O_2$  u tretiranim kljancima (OPO) te porast prolina. Vezano uz liniju *oeDMS3*, nije opaženo izraženije razdvajanje tretiranih (OPO) i kontrolnih klijanaca (K-OPO) nakon oporavka.



**Slika 47.** Analiza glavnih komponenti (PCA) parametara izmjenjenih u klijanaca uročnjaka (*Arabidopsis thaliana*) s prekomjernom ekspresijom gena *DMS3* (*oeDMS3*), s mutiranim genom *DMS3* (*dms3-1*) i klijancima divljeg tipa (wt). Klijanci su prikupljeni u dvije vremenske točke – **(a)** odmah nakon izlaganja temperaturi od 37 °C u trajanju od šest sati (TS), i **(b)** nakon 24-satnog oporavka na 24 °C (OPO). Kontrolne skupine (K-TS i K-OPO) svake linije rasle su tijekom pokusa na 24 °C. Analiza je provedena na pet pojedinačnih bioloških replika po liniji i skupini. Ovisno o vremenskoj točki, analizirani su parametri: maksimalni kvantni prinos fotosustava II ( $F_v/F_m$ ), indeks fotosintetske učinkovitosti ( $PI_{ABS}$ ), apsorpcija svjetlosti ( $ABS/RC$ ), protok uhvaćenih fotona ( $TR_0/RC$ ), prijenos elektrona ( $ET_0/RC$ ), rasipanje energije po reakcijskom centru ( $DI_0/RC$ ), gustoća aktivnih reakcijskih centara po osvjetljenoj površini lista ( $RC/CS_o$ ), omjer klorofila *a* i klorofila *b* ( $Chl\ a/Chl\ b$ ), sadržaj klorofila *a* ( $Chl\ a$ ), klorofila *b* ( $Chl\ b$ ), ukupnih karotenoida ( $Cars$ ), vodikovog peroksida ( $H_2O_2$ ) i prolina, stupanj lipidne peroksidacije ( $MDA$ ) te aktivnost enzima askorbat peroksidaze ( $APX$ ), gvajakol peroksidaze ( $G-POD$ ) i katalaze ( $CAT$ ).

## 5. RASPRAVA

### 5.1. Učinak toplinskog stresa na rast i razvoj biljaka

Dugoročni učinak toplinskog tretmana i genske pozadine pratila sam uzgojem biljaka od stadija klijanaca do stadija sjemenki. Biljke sam izložila povišenoj temperaturi u dva razvojna stadija – s dva i/ili osam listova u rozeti kako bih usporedila odgovor istraživanih linija na toplinski stres u različitim razvojnim fazama. Primjenom platforme za fenotipizaciju biljaka, gotovo svakodnevno pratila sam morfološke promjene biljaka različitih genskih pozadina (*oeBPML*, *amiR-bpm*, *oeDMS3*, *dms3-1*, divlji tip) zbog čega sam dobila veliku količinu podataka. Primjenom analize pod nazivom stablo odlučivanja odabrala sam dane u kojima su biljke pokazale najizraženije promjene nakon toplinskog stresa s obzirom na različitu gensku pozadinu, kao i parametre koji su najviše pridonijeli uočenim razlikama. Međutim, analizom vlastitih podataka uočila sam da je točnost modela stabla odlučivanja bila niža nakon što su biljke bile izložene povišenoj temperaturi u razvojnom stadiju s osam listova (TS8L), u usporedbi s izlaganjem povišenoj temperaturi u stadiju s dva lista (TS2L). Zbog smanjene točnosti, model nije uspio učinkovito klasificirati određene skupine biljaka. Jedan od mogućih uzroka smanjene točnosti može biti niži broj replika po skupinama (Zorman i sur. 1997, Song i Lu 2015). Naime, na početku pokusa, za svaku liniju postavila sam dvije skupine biljaka – kontrolnu skupinu (K) i skupinu koja će biti tretirana u stadiju s dva lista (TS2L). Međutim, neposredno prije tretmana u stadiju s osam listova (TS8L), svaku od ovih skupina dalje sam podijelila na dvije podskupine. Kontrolnu skupinu (K) podijelila sam na onu koja je ostala kontrolna (K) i na novu skupinu, koja je kasnije bila izložena povišenoj temperaturi u stadiju s osam listova (TS8L). Slično tome, skupinu koja je bila tretirana u stadiju s dva lista (TS2L) podijelila sam također na dvije podskupine. Jedna je ostala biti skupina tretirana u stadiju s dva lista (TS2L), a druga skupina je ponovno bila izložena povišenoj temperaturi, ali sada u stadiju s osam listova (TS2L+8L). Ovim postupkom stvorene su četiri skupine na kraju pokusa: kontrolna skupina (K), skupina tretirana u stadiju s dva lista (TS2L), skupina tretirana u stadiju s osam listova (TS8L) te skupina tretirana u stadiju s dva i osam listova (TS2L+8L). No, zbog ovakvog dizajna pokusa smanjen je broj replika po skupini u odnosu na početni broj replika, što je vjerojatno dovelo do smanjenja točnosti modela stabla odlučivanja. S obzirom na to da platforme za fenotipizaciju omogućuju praćenje većeg broja biljaka istodobno, jedno od mogućih rješenja povećanja točnosti modela stabla odlučivanja bilo bi povećanje broja replika po skupinama. Naime, Lazarević i sur. (2022) istraživali su utjecaj nedostatka različitih makro-

i mikroelemenata na morfološka i fiziološka svojstva graha (*Phaseolus vulgaris* L. cv. Ferguson) koristeći platformu za fenotipizaciju biljaka. Kako bi izdvojili najvažnije parametre koji su doprinijeli razlikama među biljkama, usporedili su dvije statističke metode – stablo odlučivanja i linearnu diskriminativnu analizu (LDA). Analiza rezultata ukazala je na blagu prednost metode LDA u usporedbi sa stablom odlučivanja u klasifikaciji podataka. Međutim, stablo odlučivanja koristi izvorne podatke (engl. *raw data*) prilikom klasifikacije što ga čini praktičnijim za primjenu te boljim alatom za tumačenje rezultata i povezivanje s temeljnim fiziološkim procesima (Lazarević i sur. 2022). S obzirom na to da su autori u svom istraživanju koristili deset replika po tretman-skupini, predloženo je povećanje broja biljaka po skupini kako bi se postigla bolja klasifikacija podataka korištenjem stabla odlučivanja. Tijekom mog istraživanja, zadovoljavajuća klasifikacija postignuta je kad je svaka skupina imala 20 replika. Naime, skupine K i TS2L s po 20 replika pokazale su bolje rezultate u odnosu na podskupine TS8L i TS2L+8L gdje je broj replika smanjen na deset, što je rezultiralo značajnim padom točnosti klasifikacije. Drugim riječima, na osnovu mojih rezultata, preporuka je koristiti veći broj replika po skupini (~20) kako bi se postigla visoka preciznost klasifikacije podataka.

### 5.1.1. Morfološke promjene

U literaturi su kao česti pokazatelji toplinskog stresa istaknuti inhibicija rasta korijena i izdanaka, promjene boje plodova te ubrzano starenje i otpadanje listova (Rodríguez i sur. 2005, Fahad i sur. 2017). Takva opažanja u skladu su s rezultatima mog istraživanja, gdje su se u klijanaca i odraslih biljaka znakovi nepovoljnog utjecaja povišenih temperatura mogli uočiti kroz uvijanje listova i inhibiciju rasta rozete. Naime, nakon tretmana u stadiju s dva lista (TS2L), učinak toplinskog stresa na linije s promijenjenom ekspresijom gena *BPM* očitovao se značajnim smanjenjem površine konveksne ljuške i opsega rozete. Ove promjene vrlo vjerojatno proizlaze iz uvijanja listova kao obrambenog mehanizma, do kojeg je došlo zbog pada turgora u stanicama uzrokujući njihovo skupljanje i kompaktiji raspored. Smanjenje površine konveksne ljuške zbog izlaganja biljaka stresnim uvjetima također je primijećeno u istraživanju Laxman i sur. (2022), u kojem je istraživan učinak suše na rajčicu (*Solanum lycopersicum* L.) te je dokazana pozitivna korelacija između gubitka vode i smanjenja površine konveksne ljuške. Značajnije smanjenje površine rozeta u linija s promijenjenom ekspresijom gena *BPM* primijetila sam tijekom kasnijeg vegetativnog razvoja u svih tretiranih skupina (TS2L, TS8L, TS2L+8L). Ovi rezultati u skladu su s istraživanjem Gao i sur. (2020), u kojem

je također zabilježena manja površina rozete biljaka divljeg tipa uročnjaka nakon izlaganja biljaka s osam listova povišenoj temperaturi od 45 °C tijekom tri, šest i devet sati. Kao i u mom istraživanju, značajne razlike u površini rozete između kontrolnih i tretiranih biljaka nisu bile vidljive odmah, već nekoliko dana nakon toplinskog stresa, osobito tijekom izlaganja biljaka temperaturi od 45 C tri i šest sati. Mogući razlog je narušavanje uobičajenih procesa u biljci, poput rasta i diobe stanica, uslijed izlaganja toplinskom stresu. Dugoročno, kumulativni učinak smanjene stope rasta stanica može se odraziti na promjene u površini rozete. Dakle, površina rozete može poslužiti kao dobar pokazatelj dugoročnog učinka toplinskog stresa na biljke s obzirom na to da je u svih tretiranih biljaka s promijenjenom ekspresijom gena *BPM* do kraja pokusa uočena smanjena površina rozete u usporedbi s kontrolnim biljkama. Druga dva parametra izabrana temeljem analize stabla odlučivanja – opseg rozete i površina konveksne ljuske – pokazala su se kao dobri indikatori ranog učinka toplinskog stresa jer je u svih biljaka, neovisno o liniji, zabilježeno njihovo smanjenje odmah nakon izlaganja biljaka povišenoj temperaturi. Posebno je zanimljivo promatrati odnos između uočenih morfoloških promjena i genske pozadine pojedine linije s promijenjenom ekspresijom gena *BPM*. Naime, kontrolne biljke linije *oeBPM1* imale su općenito manju površinu rozete i konveksne ljuske u odnosu na biljke divljeg tipa i linije *amiR-bpm*. Ovo opažanje u skladu je s istraživanjem Škiljaica i sur. (2020) koje je pokazalo da biljke linije *oeBPM1* imaju manju i kompaktniju rozetu u usporedbi s biljkama divljeg tipa. Nasuprot tome, kontrolne biljke linije *amiR-bpm* imale su općenito veći opseg rozete u odnosu na biljke linije *oeBPM1* i divljeg tipa. Takav rezultat vjerojatno je posljedica pilastog (nazubljenog) oblika lista koji je zabilježen i istraživanjem Lechner i sur. (2011). Pilasti listovi u usporedbi s cjelovitim imaju dodatne „ureze“ i „zupce“ na svojim rubovima, što povećava opseg njihova ruba u odnosu na cjelovite listove. Prema Lechner i sur. (2011) mogući razlog takvog oblika lista je narušena regulacija proteina ATHB6, transkripcijskog faktora uključenog u signalni put apscizinske kiseline. Protein ATHB6 negativno je reguliran proteinima BPM te u liniji *amiR-bpm* dolazi do njegovog nakupljanja zbog smanjene ekspresije gena *BPM1*, *4*, *5* i *6*. Dvije linije, *amiR-bpm* te linija s prekomjernom ekspresijom proteina ATHB6 pokazuju sličan fenotip, odnosno pilasti oblik lista. Fenotip je posebno izražen u liniji koja ima kombinaciju smanjene ekspresije gena *BPM1*, *4*, *5* i *6* te prekomjernu ekspresiju proteina ATHB6 zbog čega su autori zaključili da su proteini BPM uključeni u oblikovanje morfoloških svojstava biljaka kroz regulaciju ATHB6, međutim sam mehanizam nije u potpunosti poznat.

Linija *oeDMS3* pokazala je sličan obrazac promjena morfoloških svojstava nakon izlaganja toplinskom stresu kao i linije s promijenjenom ekspresijom gena *BPM*, pri čemu je najznačajnije bilo smanjenje površine konveksne ljuške u tretiranih biljaka. Nasuprot tome, biljke linije *dms3-1* tretirane u stadiju s osam listova (TS8L) izdvojile su se od drugih istraživanih linija. Naime, samo su te biljke (*dms3-1* TS8L) pokazale pozitivan odgovor na povišenu temperaturu kroz značajno povećanje mjerenih morfoloških parametara u usporedbi s drugim skupinama (K, TS2L, TS2L+8L). Takav rezultat mogao bi biti posljedica smanjene metilacije DNA u ovoj liniji, uslijed narušene funkcionalnosti mehanizma RdDM, a koja je dokazana istraživanjem Kanno i sur. 2008. Karakterizacija linije *nrpe-1*, koja također ima narušenu funkcionalnost mehanizma RdDM i smanjenu metilaciju DNA, pokazala je sličan obrazac morfoloških promjena u ovih dviju linija uslijed izlaganja toplinskom stresu (Tokić 2024). Moguće objašnjenje ovih opažanja proizlazi iz promijenjene aktivnosti genoma zbog smanjene metilacije, što potencijalno može rezultirati izraženijom fenotipskom plastičnošću biljaka (Negi i sur. 2016). Smanjena metilacija genoma može značajno promijeniti ekspresiju gena i pokretnih genetičkih elemenata, što utječe na način na koji biljka reagira na toplinski stres. Prema autorima, to može rezultirati promjenama u fiziologiji biljke koje nisu nužno vidljive na morfološkoj razini. Fiziološka plastičnost posebno je izražena u stresnim uvjetima, jer su promjene fizioloških svojstava reverzibilne i zahtijevaju manji ulog resursa u odnosu na promjene morfoloških svojstava (Grime i Mackey 2002). Međutim, iako toplinski stres nije uzrokovao značajnije promjene morfoloških svojstava linije *dms3-1*, usporedbom genskih pozadina u kontrolnim uvjetima primijetila sam da je linija *dms3-1* imala manju površinu konveksne ljuške, opseg rozete i biomasu u usporedbi s linijom *oeDMS3* i divljim tipom. Sličan rezultat zabilježen je istraživanjem Finnegan i sur. (1996), koje je pokazalo da biljke uročnjaka smanjene metilacije DNA imaju različite fenotipske i razvojne abnormalnosti, uključujući manju površinu listova i rozete.

Iz ovog dijela pokusa, u kojem su toplinskom tretmanu bile izložene biljke u dvije vremenske točke tijekom razvoja, mogu zaključiti da je u većine istraživanih linija (*oeBPM1*, *amiR-bpm*, *oeDMS3*, divlji tip) uočeno smanjenje površine konveksne ljuške i rozete nakon izlaganja povišenoj temperaturi. Pritom, površina konveksne ljuške istaknula se kao dobar pokazatelj ranog učinka povišene temperature, dok se površina rozete pokazala kao pouzdani pokazatelj dugoročnog učinka. Obje linije s promijenjenom ekspresijom gena *BPM* pokazale su osjetljivost na izlaganje toplinskom stresu, ali i fenotipske promjene u kontrolnim uvjetima. Ti rezultati sugeriraju da su proteini BPM važni za pravilan rast i razvoj te odgovor biljaka na

stres. Iako toplinski stres nije značajno inhibirao rast rozete linije *dms3-1*, primijećen je smanjeni prirast rozete u usporedbi s linijom *oeDMS3* i divljim tipom, što ukazuje na potrebu optimalnog funkcioniranja mehanizma RdDM u rastu i razvoju biljaka. Rezultati dobiveni fenotipizacijom linija s promijenjenom ekspresijom gena *BPM* i *DMS3* u skladu su s prethodnim istraživanjima ovih linija, što dodatno potvrđuje korisnost platformi za fenotipizaciju kao neinvazivnog alata u morfološkoj karakterizaciji biljaka, kako u stresnim tako i u optimalnim uvjetima.

### 5.1.2. Fotosintetska učinkovitost

U posljednjih nekoliko godina, autori većeg broja radova potvrdili su da je fotosinteza jedan od najosjetljivijih fizioloških procesa na povišene temperature te da do smanjenja učinkovitosti fotosinteze često dolazi prije narušavanja drugih staničnih funkcija (Crafts-Brandner i Salvucci 2002, Ashraf i Harris 2013, Hu i sur. 2020). Budući da se primarne reakcije, a posebice fotosustav II (PSII), smatraju iznimno osjetljivima na povišene temperature, utjecaj toplinskog stresa na fotosintetsku učinkovitost uročnjaka s promijenjenom ekspresijom gena *BPM*, odnosno gena *DMS3* procijenila sam mjerenjem fluorescencije klorofila *a*. Mnoga istraživanja usmjerena na proučavanje odgovora biljaka na stres predložila su korištenje parametra  $F_v/F_m$  kao pouzdanog pokazatelja učinka toplinskog stresa na biljke jer taj parametar predstavlja mjeru kvantne učinkovitosti fotokemijskih reakcija PSII, odnosno mjeru učinkovitosti svjetlosnih reakcija fotosinteze (Strasser i sur. 2000, Chen i Cheng 2009, Zushi i sur. 2012, Jägerbrand i Kudo 2016). U kontrolnim fiziološkim uvjetima, vrijednosti ovog parametra kreću se u rasponu od 0,7 do 0,83 (Ritchie 2005). U ovom istraživanju, kontrolne biljke analiziranih linija, kao i one divljeg tipa, imale su vrijednosti parametra  $F_v/F_m$  između 0,71 i 0,80, neovisno o uvjetima uzgoja, tj. o tome jesu li bile uzgajane na zemljanom supstratu ili na hranjivoj podlozi u uvjetima *in vitro*. Drugim riječima, vrijednosti parametra  $F_v/F_m$  izmjerene tijekom ovog istraživanja bile su u okviru literaturnih navoda, pri čemu su, ovisno o genskoj pozadini, mlađe biljke imale niže vrijednosti (0,71-0,77), a starije nešto više vrijednosti (0,75-0,80).

Usporedbom kontrolnih i tretiranih biljaka linija s promijenjenom ekspresijom gena *BPM*, koje su bile uzgajane na zemljanom supstratu, nisam uočila značajnije promjene u vrijednostima parametra  $F_v/F_m$  nakon tretmana u stadiju s dva lista (TS2L). Konkretno, tijekom 13. i 15. dana praćenja, vrijednosti parametra  $F_v/F_m$  u kontrolnim i tretiranim biljkama kretale su se u rasponu od 0,75 do 0,77. Međutim, sedam dana nakon izlaganja tretmanu, tj. 20. dana praćenja

zabilježila sam značajno niže vrijednosti parametra  $F_v/F_m$  kod biljaka linije *oeBPM1*, koje su bile tretirane u stadiju s dva lista (TS2L) ili u oba stadija (TS2L+8L). Pritom su se vrijednosti parametra  $F_v/F_m$  u kontrolnim biljkama kretale oko 0,80, dok su se vrijednosti u skupinama TS2L i TS2L+8L snizile na 0,76-0,77. S obzirom da između 15. i 20. dana nisam mjerila fluorescenciju klorofila *a*, moguće je da nisam uspjela uočiti postepeno smanjenje vrijednosti parametra  $F_v/F_m$  u tretiranih biljaka linije *oeBPM1*. Ovu hipotezu podupire istraživanje provedeno na kultivaru rajčice (*Solanum lycopersicum* L. var. Aromata), koji je bio izložen temperaturi od 38 °C tijekom četiri dana. Mjerenjem fluorescencije klorofila *a* autori su pokazali postepeno smanjenje parametra  $F_v/F_m$  tijekom četiri dana, ali statistički značajno smanjenje uočeno je tek trećeg i četvrtog dana u usporedbi s kontrolnim biljkama (Zhou i sur. 2017). Slični rezultati dobiveni su istraživanjem odgovora rajčice (*Solanum lycopersicum* L. var. MoneyMaker) na niske temperature (Wei i sur. 2022). U biljaka izloženih temperaturi od 4 °C tijekom pet dana vrijednosti parametra  $F_v/F_m$  postepeno padaju tijekom prva četiri dana. Međutim, tijekom oporavka od izlaganja niskim temperaturama, vrijednosti ponovno počinju rasti prema kontrolnim vrijednostima. Drugim riječima, moguće je da pad vrijednosti parametra  $F_v/F_m$  koji sam zabilježila 20. dana, predstavlja vremenski odgođen odgovor na stres. Prvi dani nakon stresa možda su bili posvećeni aktivaciji brzih, ali privremenih, mehanizama prilagodbe. Tek nakon nekoliko dana, kad su se ovi mehanizmi iscrpili, ili kada su se drugi, dugoročniji mehanizmi aktivirali, vidjela sam stvarne promjene u parametru  $F_v/F_m$ .

Zanimljivo je da su obje linije s promijenjenom ekspresijom gena *BPM* (*oeBPM1*, *amiR-bpm*) pokazale osjetljivost, odnosno nižu vrijednost parametra  $F_v/F_m$ , nakon tretmana u oba razvojna stadija (TS2L+8L), ukazujući na potrebu optimalne razine proteina BPM u stanicama za normalno odvijanje fotokemijskih reakcija tijekom i nakon ponovljenog toplinskog tretmana. Ta hipoteza slaže se s istraživanjem Vuković i sur. (neobjavljeni rezultati), koje sugerira da protein BPM1 ima ulogu u regulaciji stečene termotolerancije biljaka tako što sudjeluje u regulaciji odgovora biljke na nepovoljne uvjete. Naime, u spomenutom istraživanju klijanci linije *oeBPM1* pokazuju bolju toleranciju ponovljenog toplinskog stresa u usporedbi s divljim tipom. Međutim, zanimljivo je da se bolja tolerancija linije *oeBPM1* odrazila kroz smanjenje stupnja lipidne peroksidacije te bolju fotosintetsku učinkovitost tretiranih klijanaca, što nije bio slučaj i u mom istraživanju. No, prilikom interpretacije rezultata treba uzeti u obzir da su u spomenutom istraživanju klijanci prvo bili izloženi temperaturi od 37 °C, a nakon 42 sata temperaturi od 42 °C. Za razliku od toga, u mom istraživanju, biljke su oba puta bile izložene temperaturi od 40 °C s razmakom od sedam dana. Stoga je moguće da je već prvo izlaganje



povišenoj temperaturi od 40 °C bilo dovoljno jako da uzrokuje promjene u funkcionalnosti fotosintetskog aparata, a koje su se dodatno pojačale ponovnim izlaganjem istoj temperaturi. Naravno, u obzir treba uzeti i vremensku razliku između dva toplinska tretmana. Unatoč izlaganju biljaka različitim stresnim čimbenicima, nekoliko istraživanja ukazuje da je trajanje aklimatizacije slično i da najčešće traje pet do sedam dana (Ding i sur. 2012, Singh i sur. 2014, Feng i sur. 2016, Lämke i Bäurle 2017). Stoga, moji rezultati mjerenja parametra  $F_v/F_m$  upućuju da prvo izlaganje temperaturi od 40 °C nije rezultiralo aklimatizacijom linije *oeBPMI* na stres, kao što je bilo u slučaju istraživanja Vuković i sur. (neobjavljeni rezultati), već je došlo do narušavanja funkcionalnosti fotosintetskog aparata. Dodatnu potporu mojoj hipotezi pružaju rezultati analize biljaka linije *oeBPMI*, koje su tretirane samo u stadiju s dva lista (TS2L). Naime, i ove biljke su 20. dana imale niže vrijednosti parametra  $F_v/F_m$ , sugerirajući da je temperatura od 40 °C bila dovoljno jaka da uzrokuje pojavu stresa izlaganjem biljaka u stadiju klijanaca. Analizom vrijednosti parametra  $F_v/F_m$  u biljaka izloženih toplinskom stresu u stadiju s osam listova (TS8L), nisam uočila značajne razlike između kontrolnih i tretiranih biljaka, neovisno o liniji (*oeBPMI*, *amiR-bpm*, divlji tip), te su se vrijednosti parametra  $F_v/F_m$  kretale između 0,76 i 0,80. S obzirom da je riječ o odraslim biljkama, moguće je da tretman nije bio dovoljno jak da uzrokuje značajnije promjene parametra  $F_v/F_m$ . Naime, prema Gao i sur. (2020), odrasle biljke uročnjaka pokazale su značajno smanjenje parametra  $F_v/F_m$  nakon izlaganja višoj temperaturi, tj. 45 °C u trajanju od devet sati. Unatoč tome što nisam zabilježila značajne promjene u parametru  $F_v/F_m$  odraslih biljaka, primijetila sam inhibiciju rasta rozete. Kompenzacijski mehanizmi koje biljke razvijaju kako bi preživjele stres često se očituju kroz redistribuciju resursa, promjene u hormonskoj ravnoteži i druge adaptivne strategije koje, iako ne moraju nužno rezultirati promjenama u fotosintetskoj učinkovitosti, mogu utjecati na rast i razvoj biljaka. Istraživanje Gao i sur. (2020) također nije pokazalo izraženije promjene u parametru  $F_v/F_m$  nakon šestosatnog izlaganja biljaka temperaturi od 45 °C. Unatoč tome, primijećeno je smanjenje površine rozete tijekom narednih nekoliko dana.

Analiza linija s promijenjenom ekspresijom gena *DMS3* otkrila je da linija *dms3-1* tijekom ranog vegetativnog rasta imala nižu vrijednost parametra  $F_v/F_m$  u odnosu na liniju *oeDMS3* i divlji tip. Konkretno, u liniji *dms3-1*, vrijednosti parametra  $F_v/F_m$  kretale su se između 0,71 i 0,73, dok su u liniji *oeDMS3* i divljem tipu zabilježene vrijednosti između između 0,75 i 0,77. Istraživanje koje je proučavalo metilacijske promjene i njihov utjecaj na svojstva vrste *Populus simonii* Carrière pokazalo je da varijacije u metilacijskim obrascima utječu na fotosintetsku učinkovitost i veličinu listova (Ci i sur. 2016). S obzirom na rezultate mog istraživanja, to bi

moglo značiti da je smanjena metilacija u liniji *dms3-1* dovela do smanjenja stope fotosinteze u ovoj liniji. Štoviše, smanjena učinkovitost fotosinteze u liniji *dms3-1* vjerojatno se odrazila na smanjenje stope rasta ove linije u odnosu na liniju *oeDMS3* i divlji tip. Naime, nekoliko radova sugerira da smanjena stopa fotosinteze tijekom ranijeg razvoja često dovodi do smanjenja stope rasta tijekom kasnijeg razvoja (Laing i sur. 1995, Chen i sur. 2005, Gao i sur. 2020, Khanna i sur. 2021). Iako sam smanjene vrijednosti  $F_v/F_m$  u liniji *dms3-1* zabilježila tijekom ranog vegetativnog rasta, a ne kasnije, moguće je da linija nije uspjela nadoknaditi smanjenu stopu fotosinteze u ranoj fazi, što je rezultiralo bazično nižim prirastom. No, možda su smanjena stopa fotosinteze te smanjeni rast razlog drugačijeg učinka toplinskog stresa na liniju *dms3-1* u usporedbi s linijom *oeDMS3* i divljim tipom. Naime, jedino sam kod linije *dms3-1* uočila pozitivan učinak izlaganja povišenoj temperaturi u kasnijem razvojnom stadiju (TS8L) na morfološke parametre. Drugim riječima, postoji mogućnost da je linija *dms3-1*, zbog smanjene metilacije, razvila drugačiju metaboličku strategiju u odnosu na liniju *oeDMS3* i divlji tip. Ova strategija rezultirala je smanjenim i sporijim rastom, no istovremeno joj je omogućila učinkovitiju raspodjelu resursa tijekom toplinskog stresa, zbog čega nije došlo do inhibicije rasta. S druge strane, linija *oeDMS3* pokazala je osjetljivost na povišenu temperaturu nakon tretmana u stadiju s dva lista (TS2L), ali i nakon ponovljenog tretmana u stadiju s osam listova (TS2L+8L). To sugerira da prekomjerna ekspresija gena *DMS3* može narušiti funkcionalnost mehanizma RdDM. U prilog ovoj hipotezi ide istraživanje iz 2019. godine (Zhong i sur. 2019), koje je pokazalo da su stanične razine proteina DMS3 regulirane proteinom APC/C (engl. *anaphase-promoting complex/cyclosome*). Uočeno je da mutanti uročnjaka *apc/c* imaju povišenu razinu proteina DMS3, što uzrokuje narušavanje funkcionalnosti mehanizma RdDM i smanjeno navođenje Pol V. Prema tome, može se pretpostaviti da narušena funkcionalnost mehanizma RdDM u liniji *oeDMS3* utječe na odgovor biljke na toplinski stres, smanjujući njenu termotoleranciju, što se očituje i u osjetljivosti fotosintetskih reakcija, odnosno parametru  $F_v/F_m$ . Kao i u linija s promijenjenom ekspresijom gena *BPM*, analizom biljaka s promijenjenom ekspresijom gena *DMS3* tretiranih u stadiju s osam listova (TS8L) nisam primijetila značajne razlike između kontrolnih i tretiranih biljaka. Ovaj rezultat ide u prilog hipotezi da tretman temperaturom od 40 °C tijekom šest sati nije bio dovoljno jak da uzrokuje značajnije promjene parametra  $F_v/F_m$  u odraslih biljaka uročnjaka.

Na temelju dobivenih rezultata mogu zaključiti da su se opažene promjene parametra  $F_v/F_m$  u linija s promijenjenom ekspresijom gena *BPM* i *DMS3* odnosile na tretman biljaka u ranijem stadiju (TS2L), odnosno u oba stadija (TS2L+8L). Nasuprot tome, nisam uočila značajnije

promjene u vrijednostima parametra  $F_v/F_m$  nakon tretmana biljaka u stadiju s osam listova (TS8L). Iako se u literaturi parametar  $F_v/F_m$  često navodi kao pouzdani pokazatelj učinka stresa na fotosintetsku učinkovitost, u mom istraživanju učinka toplinskog stresa na biljke uzgajane u zemljanom supstratu nisu uočene značajnije promjene u ovom parametru. Jedno moguće objašnjenje je da stres nije bio dovoljno jak da izazove velike promjene u parametru  $F_v/F_m$ . Biljke su možda uspjele aktivirati druge kompenzacijske mehanizme koji nisu utjecali na fotosintetsku učinkovitost, ali su se odrazili na rast. S druge strane, moguće je da bi dodatno mjerenje drugih fotosintetskih parametara, koje korištena platforma za fenotipizaciju ne pokriva, pružilo dublji uvid u učinak toplinskog stresa na fotosintezu. Primjerice, u istraživanju Gao i sur. (2020) fotosintetski parametri mjereni su u biljaka aklimatiziranih na uvjete tame, ali i u biljaka aklimatiziranih na uvjete svjetlosti. Analizom je utvrđeno da se nakon izlaganja biljaka toplinskom stresu najznačajnije promjene u fotosintetskim parametrima mogu opaziti kod biljaka aklimatiziranih na uvjete svjetlosti, što se razlikuje od mog istraživanja, gdje su mjereni samo parametri u biljaka aklimatiziranih na uvjete tame.

### 5.1.3. Klijavost sjemenki

Poznato je da stadij klijanja sjemenki u životnom ciklusu biljaka predstavlja fazu koja je posebno osjetljiva na djelovanje nepovoljnih temperaturnih uvjeta (Hasanuzzaman i sur. 2013, Chen i sur. 2016, Hassan i sur. 2021). Brojni radovi također su dokazali da toplinski stres tijekom reproduktivne faze biljaka značajno umanjuje prinos i klijavost sjemenki (Aghamolki i sur. 2014, Chen i sur. 2021, Cohen i sur. 2020). Pri tome je važno napomenuti da posljedice izlaganja povišenim temperaturama ovise o vrsti biljke, njenoj genskoj pozadini te trajanju i jačini toplinskog tretmana. Ipak, manje je poznato kako toplinski tretman u različitim vegetativnim stadijima rasta i razvoja biljke utječe na prinos i klijavost sjemenki. Stoga sam u sklopu ovog istraživanja analizirala učinak genske pozadine i toplinskog stresa u različitim vegetativnim stadijima (TS2L, TS8L, TS2L+8L) na biomasu i klijavost sjemenki. Usporedba biomase sjemenki linija s promijenjenom ekspresijom gena *BPM* (*oeBPM1*, *amiR-bpm*) i divljeg tipa ukazala je na veću osjetljivost divljeg tipa na toplinski tretman u ranijem (TS2L) i kasnijem (TS8L) vegetativnom stadiju u odnosu na liniju *oeBPM1*. Istovremeno, nisam uočila značajne razlike u biomasu sjemenki usporedbom linije *amiR-bpm* s linijom *oeBPM1*, odnosno divljim tipom, neovisno jesam li uspoređivala sjemenke prikupljene od kontrolnih ili tretiranih biljaka. Istraživanje Chen i sur. (2013) pokazalo je da mutant sa smanjenom ekspresijom

proteina WRI1, a koji sudjeluje u biosintezi masnih kiselina, ima značajno manju biomasu sjemenki u usporedbi s divljim tipom. Intrigantno, isto istraživanje utvrdilo je da postoji interakcija između proteina BPM i WRI1, gdje proteini BPM negativno reguliraju razine WRI1 putem ubikvitin-proteasomalnog puta, te mutant *amiBPM* s reduciranom ekspresijom svih šest gena *BPM* pokazuje povećanu biomasu sjemenki (Chen i sur. 2013). Međutim, takav rezultat nije potvrđen mojim istraživanjem linije *amiR-bpm*. No, ne smije se zanemariti da u liniji *amiR-bpm* nisu utišani svi geni *BPM*. Naprotiv, čak je zabilježena povišena ekspresija gena *BPM3* u usporedbi s divljim tipom, što bi moglo objasniti razlike u rezultatima dvaju istraživanja. Drugim riječima, upravo bi protein BPM3 mogao imati ulogu u razvoju sjemenki kroz interakciju s proteinom WRI1. Međutim, postavlja se pitanje kako to da je uočena veća biomasa sjemenki prikupljenih od tretiranih biljaka linije *oeBPM1* s obzirom na regulaciju BPM-WRI1? Budući da nisam otkrila značajnije razlike u biomasu sjemenki linija *oeDMS3* i *dms3-1*, vrlo vjerojatno je riječ o regulaciji putem ubikvitin-proteasomalnog puta, a ne mehanizma RdDM. No, sam mehanizam regulacije zasad nije poznat. Štoviše, Chen i sur. (2013) su istraživali učinak promijenjene ekspresije gena *BPM* na biomasu sjemenki prikupljenih od netretiranih biljaka, dok sam ja u obzir uzela i analizu sjemenki prikupljenih od tretiranih biljaka. Kako bih dobila detaljniji uvid u mehanizam regulacije biomase sjemenki putem proteina BPM, posebno pod učinkom toplinskog stresa, bilo bi korisno istražiti učinak promijenjene ekspresije gena *BPM* na količinu i sastav masti i ulja u sjemenkama uročnjaka.

Tijekom ovog istraživanja, također sam analizirala kako toplinski tretman te genska pozadina utječu na klijanje sjemenki. U skladu s time, otkrila sam da sjemenke linije *oeBPM1* prokljuju u kraćem vremenskom periodu u usporedbi s linijom *amiR-bpm*, bez obzira potječu li sjemenke od kontrolnih ili tretiranih biljaka. Slični rezultati, koji ukazuju da linija *oeBPM1* ima kraći i brži životni ciklus, dobiveni su istraživanjem Škiljaica i sur. (2020), a kojim je pokazano da linija *oeBPM1* ranije cvjeta u odnosu na divlji tip. Tijekom ovog istraživanja primijetila sam da sjemenke linije *amiR-bpm*, prikupljene od biljaka tretiranih u stadiju s osam listova (TS8L), pokazuju smanjenu klijavost u usporedbi sa sjemenkama divljeg tipa, a osobito u usporedbi sa sjemenkama linije *oeBPM1*. Istraživanje Vuković i sur. (neobjavljeni rezultati) pokazalo je da sjemenke linije *oeBPM1* prikupljene od biljaka izloženih visokim temperaturama u stadiju klijanaca imaju bolju klijavost u usporedbi sa sjemenkama divljeg tipa. Jagić i sur. (2022) predložili su novu funkciju proteina BPM1, a riječ je o regulaciji mehanizma RdDM neovisno o ubikvitin-proteasomalnog puta. S obzirom da je istraživanje Jagić i sur. (2022) pokazalo da protein BPM1 ima stimulirajući učinak na mehanizam RdDM, Vuković i sur. (neobjavljeni

rezultati) predložili su da prekomjerna ekspresija proteina BPM1 uslijed izlaganja biljaka toplinskom stresu ima pozitivan učinak na stabilnost genoma putem regulacije aktivnosti pokretnih genetičkih elemenata, što naposljetku rezultira boljom prilagodbom biljaka i kvalitetnijim sjemenkama. Međutim, važno je istaknuti da proteini BPM sudjeluju u regulaciji različitih transkripcijskih faktora poput ATHB6, MYB56 te MYC2-4 koji također imaju ulogu u razvoju i klijavosti sjemenki (Lechner i sur. 2011, Chen i sur. 2015, Gao i sur. 2016). Dakle, nije nužno da je pozitivan učinak prekomjerne ekspresije proteina BPM1 na biomasu i klijavost sjemenki posljedica isključivo njegove uloge u mehanizmu RdDM, već je moguće da je tu važna i uloga ovog proteina u ubikvitin-proteasomalnom putu. Toj hipotezi u prilog ide analiza klijavosti linija s promijenjenom ekspresijom gena *DMS3*, u kojih sam značajnije promjene u klijavosti sjemenki zamijetila samo prvog dana klijanja. Konkretno, sjemenke linije *dms3-1* prikupljene od biljaka tretiranih u oba razvojna stadija (TS2L+8L) pokazale su smanjenu klijavost u usporedbi sa sjemenkama biljaka tretiranih samo u stadiju s dva lista (TS2L).

Na temelju analize biomase i klijavosti sjemenki mogu zaključiti da ovo istraživanje potvrđuje da proteini BPM imaju ulogu u regulaciji mehanizama uključenih u razvoj i klijavost sjemenki, vjerojatno putem ubikvitin-proteasomalnog puta. Međutim, suprotno dosadašnjim rezultatima (Chen i sur. 2013), moji rezultati ukazuju da prekomjerna ekspresija proteina BPM ne rezultira nužno manjom biomasom, posebno ukoliko su majčinske biljke bile izložene toplinskom stresu, već prekomjerna ekspresija može djelovati pozitivno na razvoj sjemenki te ubrzati njihovo klijanje.

## **5.2. Učinak toplinskog stresa na klijance uzgajane *in vitro***

Učinak toplinskog tretmana i genske pozadine na fiziološke, biokemijske i molekularne parametre detaljno sam istražila u klijancima linija s promijenjenom ekspresijom gena *BPM* i gena *DMS3*. Klijance sam analizirala u dvije vremenske točke – odmah nakon toplinskog tretmana (prva vremenska točka) te nakon 24-satnog oporavka (druga vremenska točka).

### **5.2.1. Fotosintetska učinkovitost klijanaca**

Kako bih istražila učinak toplinskog tretmana i genske pozadine na učinkovitost fotosinteze u stadiju klijanaca, izmjerila sam fluorescenciju klorofila *a* primjenom JIP-testa. Analiza

parametra  $F_v/F_m$  pokazala je veće promjene u odnosu na analizu istog parametra kod klijanaca uzgajanih na zemljanom supstratu. Iako su klijanci na zemljanom supstratu bili izloženi višoj temperaturi (40 °C) u usporedbi s klijancima uzgajanim *in vitro* (37 °C), veće razlike u parametru  $F_v/F_m$  zabilježene su u klijanaca uzgojenih *in vitro*. Pri tome sam odmah nakon toplinskog tretmana klijanaca s promijenjenom ekspresijom gena *BPM* (*oeBPM1*, *amiR-bpm*), odnosno gena *DMS3* (*oeDMS3*, *dms3-1*), primijetila značajno smanjenje vrijednosti parametra  $F_v/F_m$ . Iako promjena nije bila značajna, i u divljem tipu sam opazila smanjenje parametra  $F_v/F_m$  nakon tretmana. Ove rezultate mogu objasniti razlike u sustavima uzgoja. Klijanci na zemljanom supstratu rasli su i bili izloženi povišenoj temperaturi u uvjetima kontrolirane vlage (60%), dok su klijanci u uvjetima *in vitro* rasli u uvjetima veće zasićenosti vlagom. Takvi su uvjeti vjerojatno uzrokovali smanjenu mogućnost transpiracije tijekom izlaganja povišenoj temperaturi, i posljedično jači učinak toplinskog stresa. Istraživanje provedeno na različitim kultivarima rajčice (*Solanum lycopersicum* L.) izloženih toplinskom stresu pokazalo je da biljke uspješnije rastu u uvjetima nižeg udjela vlage u zraku, nego u uvjetima višeg udjela vlage (Ayenan i sur. 2022), jer u uvjetima visoke vlažnosti transpiracija može biti ograničena, što može utjecati na hlađenje biljaka tijekom toplinskog stresa.

Osim parametra  $F_v/F_m$ , istraživanja često ističu i parametar  $PI_{ABS}$ , dobiven primjenom JIP-testa, kao pouzdani pokazatelj utjecaja stresa na biljke (Strasser i sur. 2000, Chen i Cheng 2009, Zushi i sur. 2012, Jägerbrand i Kudo 2016). Riječ je o parametru koji predstavlja kvantitativnu procjenu vitalnosti biljaka na temelju njihove fotosintetske aktivnosti, odnosno opisuje kako se apsorbirana energija koristi u svjetlosnim reakcijama fotosinteze (Strasser i sur. 2000, Živčák i sur. 2008). Odmah nakon izlaganja klijanaca povišenoj temperaturi, zabilježene su značajno niže vrijednosti parametra  $PI_{ABS}$  u dvije linije – *oeBPM1* i *dms3-1*, u usporedbi s odgovarajućim kontrolama. Obje linije imale su i značajno niže vrijednosti parametra  $F_v/F_m$  odmah nakon tretmana. Takvi rezultati sugeriraju da su fotosintetski procesi u linijama *oeBPM1* i *dms3-1* osjetljiviji na povišenu temperaturu u usporedbi s ostalim istraživanim linijama. Ovu hipotezu potvrđuje istraživanje provedeno na nekoliko različitih varijeteta divljeg ječma (*Hordeum spontaneum* L.), a koje je pokazalo da varijeteti koji su osjetljivi na povišene temperature imaju nakon izlaganja toplinskom stresu značajno niže vrijednosti parametara  $F_v/F_m$  i  $PI_{ABS}$  u odnosu na tolerantnije varijetete (Jedmowski i Brüggemann 2015).

Kako bih detaljnije istražila učinak toplinskog stresa na fotosintetsku učinkovitost, posebno u linijama *oeBPM1* i *dms3-1*, analizirala sam četiri glavna toka energije u fotosintetskom aparatu koji opisuju parametar  $PI_{ABS}$ . Riječ je o apsorpciji svjetlosti (fotona) po aktivnom RC

(ABS/RC), protoku uhvaćenih fotona po aktivnom RC ( $TR_0/RC$ ), prijenosu elektrona po aktivnom RC ( $ET_0/RC$ ) te rasipanju energije po aktivnom RC ( $DI_0/RC$ ). Prema istraživanju Strasser i sur. (2000), u biljaka izloženih povišenim temperaturama dolazi do porasta vrijednosti ABS/RC i  $DI_0/RC$  zbog smanjenja gustoće aktivnih centara ( $RC/CS_0$ ). U obje linije, *oeBPM1* i *dms3-1*, odmah nakon izlaganja toplinskom stresu zabilježen je porast vrijednosti ABS/RC i  $DI_0/RC$ . Međutim, značajno smanjenje parametra  $RC/CS_0$  uočeno je samo u liniji *dms3-1*. Stoga se postavlja pitanje zašto je u liniji *oeBPM1* primijećeno smanjenje fotosintetske učinkovitosti, ali nije zabilježeno značajno smanjenje parametra  $RC/CS_0$ . Jedan od mogućih uzroka smanjenja fotosintetske učinkovitosti u liniji *oeBPM1* mogao bi biti smanjeni sadržaj klorofila *a* i karotenoida izmjeren nakon izlaganja klijanaca toplinskom stresu. Naime, istraživanje provedeno na različitim kultivarima biljke lucerna (*Medicago sativa* L.) pokazalo je da se uslijed djelovanja povišenih temperatura u tretiranim biljkama smanjuje sadržaj klorofila *a* te vrijednosti parametara  $F_v/F_m$  i  $PI_{ABS}$ , a smanjenje je posebno izraženo u osjetljivijih kultivara (Wassie i sur. 2019). Drugim riječima, u liniji *oeBPM1* je nakon toplinskog stresa došlo do smanjenja sadržaja klorofila *a*, što je vjerojatno rezultiralo smanjenjem ukupnog broja RC. Unatoč tome, omjer aktivnih i neaktivnih centara, koji se mjeri parametrom  $RC/CS_0$ , mogao bi ostati nepromijenjen u tretiranim i kontrolnim klijancima, zbog čega bi izostala promjena parametra  $RC/CS_0$ . Ipak, zbog smanjenja ukupnog broja RC, uslijed smanjenja sadržaja klorofila *a* u tretiranim klijancima, došlo je do pada fotosintetske učinkovitosti. Kako je tijekom ovog istraživanja, linija *amiR-bpm*, koja ima smanjenu ekspresiju gena *BPM1*, *4*, *5* i *6*, pokazala manje oscilacija u fotosintetskom odgovoru na toplinski stres, mogu pretpostaviti da prekomjerna ekspresija gena *BPM1* u liniji *oeBPM1* uzrokuje veću osjetljivost fotosintetskog aparata na toplinski stres. Ova hipoteza u skladu je s istraživanjem provedenim na liniji sa smanjenom ekspresijom svih šest gena *BPM*, *amiBPM* (Morimoto i sur. 2017), gdje je nakon izlaganja klijanaca linije *amiBPM* i divljeg tipa jakom toplinskom stresu (43 °C, 45 min), utvrđeno da linija *amiBPM* ima veću stopu preživljavanja te veći sadržaj ukupnih klorofila u odnosu na divlji tip. Prema teoriji autora, proteini BPM, posebno BPM2, negativno reguliraju odgovor biljaka na toplinski stres putem regulacije razine proteina DREB2A u stanici. Protein DREB2A jedan je od ključnih transkripcijskih faktora koji sudjeluje u aktivaciji velikog broja gena potrebnih za odgovor biljke na toplinski stres te uslijed djelovanja povišene temperature dolazi do njegove pojačane indukcije. Međutim, zbog preraspodjele stanične energije uslijed pojačane indukcije proteina DREB2A i aktivacije velikog broja gena često dolazi do inhibicije rasta i razvoja biljke. Kako bi se to ublažilo, odnosno, kako u uvjetima stresa ne bi došlo do potpune inhibicije rasta, potrebna je precizna regulacija razine proteina DREB2A u stanici

(Mizoi i sur. 2019). U ovom istraživanju koristila sam liniju *amiR-bpm* koja ima utišane gene *BPM1*, *4*, *5* i *6* te je analiza ekspresije gena *BPM* pokazala pojačanu ekspresiju gena *BPM2* odmah nakon izlaganja klijanaca povišenoj temperaturi. Pojačana ekspresija gena *BPM2* zabilježena je i u tretiranim klijanacima divljeg tipa. Unatoč povišenoj razini gena *BPM2*, klijanci linije *amiR-bpm* i divljeg tipa pokazali su bolju fotosintetsku učinkovitost u usporedbi s linijom *oeBPM1*. Prilikom analize ovih rezultata u obzir treba uzeti da su proteini *BPM1* i *BPM2* najbliži homolozi među proteinima *BPM* (Juranić i Dresselhaus 2014) te da je u liniji *oeBPM1* ekspresija gena *BPM1* puno veća nego ekspresija gena *BPM2* u liniji *amiR-bpm* i divljem tipu. Tijekom ovog istraživanja, klijanci su bili izloženi temperaturi od 37 °C što za uročnjak predstavlja umjereni stres. S obzirom da prilikom djelovanja umjerenog stresa biljka ne treba koristiti strategiju „sve ili ništa“, moguće je da je blago pojačana ekspresija gena *BPM2* u liniji *amiR-bpm* i divljem tipu djelovala kao precizna regulacija stanične razine proteina *DREB2A* kako ne bi došlo do snažne aktivacije odgovora na stres. Takva precizna regulacija može u konačnici rezultirati boljom preraspodjelom stanične energije te boljom fotosintetskom učinkovitošću linije *amiR-bpm* i divljeg tipa. Ovu hipotezu dodatno potkrjepljuje analiza biljaka uzgajanih na zemljanom supstratu. Naime, biljke linije *oeBPM1* izložene temperaturi od 40 °C u stadiju s dva lista (TS2L) pokazale su veću inhibiciju rasta rozete tijekom razvoja u odnosu na biljke linije *amiR-bpm* i divljeg tipa te smanjenu fotosintetsku učinkovitost, što je u skladu s istraživanjima koja sugeriraju da smanjena stopa fotosinteze tijekom ranijeg razvoja često dovodi do smanjenja stope rasta tijekom kasnijeg razvoja (Laing i sur. 1995, Chen i sur. 2005, Gao i sur. 2020, Khanna i sur. 2021).

Nakon oporavka na temperaturi uzgoja, nisu primijećene značajnije promjene u fotosintetskom odgovoru između kontrolnih i tretiranih klijanaca s promijenjenom ekspresijom gena *BPM*. Razlike nisu uočene niti u linije s prekomjernom ekspresijom gena *DMS3*. Takvi rezultati u skladu su s tvrdnjom da izlaganje temperaturi od 37 °C za uročnjak predstavlja umjereni stres koji uzrokuje blage promjene u metabolizmu. Takve su promjene brze i prolazne, često bez dugoročnih strukturalnih promjena. Međutim, linija s narušenim mehanizmom RdDM (*dms3-1*) pokazala je smanjenu fotosintetsku učinkovitost tretiranih klijanaca i nakon oporavka. Ovaj rezultat sugerira da je riječ o liniji koja pokazuje veću osjetljivost fotosintetskog aparata na toplinski stres. Istraživanje provedeno na kultivarima graha (*Phaseolus vulgaris* L.) pokazalo je da se s obzirom na fotosintetski odgovor biljaka na povišenu temperaturu, kultivari graha mogu podijeliti u nekoliko grupa (Stefanov i sur. 2011). Kultivari svrstani u „tolerantnu“ grupu nisu pokazali značajnije varijacije u fotosintetskom odgovoru nakon izlaganja toplinskom



stresu. Kultivari koji su bili djelomično tolerantni na povišenu temperaturu, pokazali su varijacije u fotosintetskom odgovoru odmah nakon stresa. Međutim, nakon oporavka na temperaturi uzgoja, ponovno je došlo do uspostavljanja ravnoteže u stopi fotosinteze. Naposljetku, kultivari u kojih se nakon oporavka stopa fotosinteze nije vratila na kontrolne vrijednosti, poput linije *dms3-1* u mojem pokusu, svrstani su u grupu kultivara osjetljivih na toplinski stres. Jedan od razloga osjetljivosti fotosintetskog aparata linije *dms3-1* na toplinski stres mogao bi biti nefunkcionalan protein DMS3. Njegova nefunkcionalnost dovodi do narušavanja učinkovitosti mehanizma RdDM i smanjenja metilacije genoma, rezultirajući smanjenom termotolerancijom biljke. Naime, istraživanje provedeno na mutantima uročnjaka s utišanim komponentama mehanizma RdDM pokazalo je da mutant s narušenim genom *NRPD2*, koji kodira drugu najveću podjedinicu proteina Pol IV i Pol V, pokazuje nižu stopu preživljavanja, odnosno veću osjetljivost na toplinski stres nakon izlaganja temperaturi od 42 °C tijekom 24 sata u usporedbi s divljim tipom (Popova i sur. 2013). Također, biljke duhana (*Nicotiana benthamiana* Domin) s narušenim mehanizmom RdDM pokazuju veću osjetljivost i izrazitija stanična oštećenja nakon infekcije virusom TYLCCNV/TYLCCNB (engl. *tomato yellow leaf curl China virus associated with a betasatellite*) u odnosu na biljke s funkcionalnim mehanizmom RdDM (Zhong i sur. 2017).

Zanimljivo, usporedba kontrolnih biljaka različitih genskih pozadina, pokazala je da se linije s promijenjenom ekspresijom gena *BPM* razlikuju u sadržaju pigmenata. Pri tome je linija *oeBPM1* imala bazično veći sadržaj klorofila *a* i karotenoida u odnosu na liniju *amiR-bpm*. Posebno je zanimljiva usporedba ovog rezultata s istraživanjem Havaux i Tardy (1999). Naime, spomenuto istraživanje pokazalo je da varijetet ječma (*Hordeum vulgare* L.) otporan na svjetlosni i/ili toplinski stres ima smanjen bazični sadržaj ukupnih klorofila i karotenoida u odnosu na osjetljiviji varijetet ječma. Autori su predložili da smanjeni sadržaj pigmenata smanjuje apsorpcijski kapacitet listova, i na taj način, u uvjetima svjetlosnog i/ili toplinskog stresa smanjuje negativan učinak povećanog intenziteta svjetlosti, odnosno temperature na fotosintetski aparat. Ti rezultati dodatno idu u prilog hipotezi da prekomjerna ekspresija gena *BPM1* u liniji *oeBPM1* uzrokuje veću osjetljivost fotosintetskog aparata na toplinski stres. Unatoč tome što linija *oeBPM1* pokazuje veću osjetljivost fotosintetskih procesa na toplinski stres u usporedbi s linijom *amiR-bpm* i divljim tipom, to ne implicira nužno da je ova linija podložnija stresu. Veća osjetljivost fotosinteze na toplinski stres možda predstavlja adaptivnu strategiju. Naime, smanjenjem sadržaja pigmenata i/ili redukcijom stope fotosinteze u uvjetima povišenih temperatura, linija *oeBPM1* mogla bi ograničiti prekomjerni porast koncentracije

ROS-ova u stanici, čime bi se smanjio rizik od oštećenja uzrokovanih oksidacijskim stresom. Iako sam i u tretiranih klijanaca linije *dms3-1* zabilježila smanjenje stope fotosinteze odmah nakon izlaganja stresu, moguće je da smanjenje fotosinteze u ovom slučaju ne predstavlja adaptivnu strategiju na toplinski stres. Naime, u tretiranih klijanaca linije *oeBPM1* je nakon 24 sata došlo do vraćanja stope fotosinteze na kontrolne vrijednosti, dok je u istih klijanaca linije *dms3-1* stopa fotosinteze i dalje bila narušena, implicirajući da je došlo do dugoročnijih promjena, odnosno narušavanja strukture i funkcije fotosintetskog aparata.

Sekundarne reakcije fotosinteze također pokazuju osjetljivost na povišene temperature, ponajviše zbog učinka na funkcionalnost i količinu enzima RuBisCO (Spreitzer i Salvucci 2002, Sage i sur. 2008, Perdomo i sur. 2017). Stoga sam tijekom ovog istraživanja analizirala ekspresiju velike podjedinice enzima RuBisCO (*rbcL*) u tretiranim i kontrolnim klijancima linija s promijenjenom ekspresijom gena *BPM* i *DMS3* te divljem tipu. Značajnije promjene u ekspresiji proteina *rbcL* primijetila sam u linijama s promijenjenom ekspresijom gena *DMS3*, ali ne i u linijama s promijenjenom ekspresijom gena *BPM*. Tretirani klijanci linije *oeDMS3* imali su smanjenu razinu proteina *rbcL* u usporedbi s kontrolom, te je razina proteina bila slična smanjenoj bazičnoj razini proteina *rbcL* u liniji *dms3-1*. Ovo ukazuje na ranije spomenutu mogućnost da prekomjerna ekspresija gena *DMS3* može narušiti funkcionalnost mehanizma RdDM. Manja bazična količina proteina *rbcL*, koju sam uočila u liniji *dms3-1*, mogla bi biti jedan od uzroka smanjenog prirasta ove linije u odnosu na liniju *oeDMS3* i divlji tip. Naime, smanjenje količine enzima RuBisCO može ograničiti sposobnost učinkovite fiksacije CO<sub>2</sub>, što može smanjiti ukupni kapacitet za proizvodnju šećera te u konačnici ograničiti brzinu rasta i razvoja biljke (Sharma i sur. 2020).

Na temelju spomenutih rezultata mogu zaključiti da su linije *oeBPM1* i *dms3-1* pokazale veću osjetljivost fotosintetskog aparata na toplinski stres. Međutim, u liniji *oeBPM1* je nakon oporavka došlo do ponovnog uspostavljanja ravnoteže u procesu fotosinteze, dok je linija *dms3-1* imala smanjenu fotosintetsku učinkovitost i nakon oporavka.

### **5.2.2. Oksidacijski stres i antioksidacijski odgovor**

Uslijed izloženosti povišenim temperaturama, biljne stanice često se suočavaju sa sekundarnim stresom, poznatim kao oksidacijski stres. Ovaj oblik stresa proizlazi iz pojačane produkcije ROS-ova zbog narušene stanične redoks-ravnoteže (Qu i sur. 2013, Kumar i Wani 2020). Jedan od istraživanih ROS-ova je H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, relativno stabilna i umjereno reaktivna molekula koja ima

dvojaku ulogu u stanici – djeluje kao signalna molekula, ali istovremeno može uzrokovati oksidacijski stres (Volkov i sur. 2006, Sharma i sur. 2012, Ohama i sur. 2017). U okviru ovog istraživanja, u tretiranim klijancima linije *amiR-bpm* i divljeg tipa zabilježila sam značajno manju količinu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> odmah nakon izlaganja povišenoj temperaturi. Istraživanje na klijancima pšenice (*Triticum aestivum* L.) pokazalo je da do značajnijeg porasta koncentracije H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dolazi na višim temperaturama (iznad 40 °C), dok umjereni stres (oko 35 °C) ne uzrokuje porast koncentracije u stanici (Kumar i sur. 2012). Također, dokazano je da biljke mogu suzbiti prekomjerni porast koncentracije i moguće toksične učinke ROS-ova aktivacijom antioksidacijskih enzima (Mittler 2002, Zhou i sur. 2019). Uistinu, u tretiranim klijancima linije *amiR-bpm* i divljeg tipa odmah nakon izlaganja stresu zabilježena je pojačana aktivnost antioksidacijskih enzima uključenih u razgradnju H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – gvajakol peroksidaze (G-POD), askorbat peroksidaze (APX) i katalaze (CAT). Drugim riječima, temperatura od 37 °C predstavlja umjereni stres za klijance uročnjaka koji može biti prevladan pojačanom aktivnošću antioksidacijskih enzima. Ovu hipotezu dodatno potvrđuju rezultati stupnja lipidne peroksidacije, parametra koji se koristi kao pokazatelj oštećenja staničnih membrana uzrokovanih ROS-ovima (Larkindale i Knight 2002). Naime, u linijama s promijenjenom ekspresijom gena *BPM* nisam zabilježila značajne promjene u stupnju lipidne peroksidacije nakon izlaganja klijanaca povišenoj temperaturi.

Zanimljivo, u tretiranim klijancima linije *oeBPMT1* nije uočena niti značajna promjena u sadržaju H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> niti u aktivnosti enzima G-POD, APX, CAT i SOD sugerirajući da nije došlo do pojave oksidacijskog stresa nakon izlaganja povišenoj temperaturi. Navedeno se može povezati s ulogom proteina BPM u ubikvitin-proteasomalnom putu gdje spomenuti proteini služe kao specifični adaptori ligaza E3 baziranih na CUL3 (Chen i sur. 2013, Bauer i sur. 2019, Ban i Estelle 2021). Naime, biljke uročnjaka s prekomjernom ekspresijom gena *PPRT1* (engl. *protein with the RING domain and Tmemb\_185A 1*), koji kodira istoimenu ligazu E3, nakon izlaganja povišenoj temperaturi od 45 °C tri sata pokazuju niži sadržaj H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i stupanj lipidne peroksidacije te veću stopu preživljavanja u odnosu na biljke s utišanim genom (Liu i sur. 2020). Autori su pokazali da zbog prekomjerne ekspresije gena *PPRT1* uslijed djelovanja toplinskog stresa dolazi do indukcije ekspresije gena uključenih u odgovor na stres – *ZAT12* (engl. *responsive to high light 41*), *HSP21* (engl. *heat shock protein 21*) i *HSA7a* (engl. *heat stress transcription factor A-7a*). Indukcija njihove ekspresije u konačnici dovodi do pozitivnog odgovora na stres i pojačane termotolerancije. Iako sam u svojem istraživanju pokazala da dolazi do smanjenja ekspresije gena *BPM1-GFP* nakon izlaganja klijanaca linije *oeBPMT1*

toplinskom stresu, bazične razine transgena u liniji *oeBPM1* su i dalje bile puno više u odnosu na native gene *BPM* u divljem tipu i liniji *amiR-bpm*. Štoviše, Škiljaica i sur. (2020) pokazali su da se protein BPM1 akumulira uslijed izlaganja klijanaca temperaturi od 37 °C. Također, pojačana akumulacija proteina BPM1 dovodi do smanjene ekspresije gena *HSFA3*, koji je reguliran proteinom DREB2A. Protein HSFA3 uključen je u regulaciju različitih gena induciranih oksidacijskim stresom, poput gena *APX2* (engl. *L-ascorbate peroxidase 2*) koji kodira antioksidacijski enzim APX (Hwang i sur. 2012). Uzevši u obzir ove spoznaje, moguće je da u liniji *oeBPM1* nakon izlaganja umjereno povišenoj temperaturi nije došlo do prekomjerne akumulacije proteina DREB2A zbog mehanizma regulacije BPM-DREB2A te je izostala snažna aktivacija gena i proteina uključenih u odgovor na stres. Istovremeno, postojeći antioksidacijski sustav bio je dovoljno snažan da prilikom djelovanja umjerenog stresa osigura redoks-ravnotežu u stanici. Ovu teoriju dodatno potkrepljuje izmjerena razina stupnja lipidne peroksidacije, pokazatelja oksidacijskog stresa, a koja se nije promijenila nakon izlaganja klijanaca linije *oeBPM1* povišenoj temperaturi. No, također je moguće da je izostanak promjene u sadržaju H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i aktivnosti antioksidacijskih enzima dio adaptivne strategije linije *oeBPM1* na toplinski stres. Ranije sam spomenula da sam u ovoj liniji opazila smanjenu stopu fotosinteze odmah nakon izlaganja klijanaca povišenoj temperaturi te da se stopa fotosinteze vratila na kontrolne razine nakon 24 sata. Drugim riječima, moguće je da smanjenjem stope fotosinteze, ova linija regulira staničnu redoks-ravnotežu za vrijeme nepovoljnih uvjeta, čime se ograničava prekomjerni porast koncentracije ROS-ova u stanici te posljedično, izostaje povišena aktivnost antioksidacijskih enzima. Prestankom djelovanja nepovoljnih uvjeta, smanjuje se mogućnost prekomjernog porasta koncentracije ROS-ova te se stopa fotosinteze vraća na kontrolne razine. Tijekom ovog istraživanja, u linija s promijenjenom ekspresijom gena *BPM* nije zabilježena značajnija promjena aktivnosti enzima SOD odmah nakon izlaganja povišenoj temperaturi, niti nakon oporavka. Enzim SOD doprinosi nastanku H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> jer katalizira dismutaciju dvije molekule O<sub>2</sub><sup>-</sup> u jednu molekulu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i jednu molekulu kisika. Izostanak promjene aktivnosti enzima SOD nakon toplinskog tretmana u skladu je sa sadržajem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, čije razine su bile smanjene ili čak nepromijenjene nakon tretmana klijanaca. Istraživanje Ji i sur. (2021) također nije zabilježilo značajnije promjene aktivnosti enzima SOD nakon izlaganja biljaka češnjaka (*Allium sativum* L.) temperaturi od 35 °C tijekom nekoliko sati. Međutim, pojačana aktivnost enzima primijećena je nakon izlaganja biljaka temperaturi od 45 °C, zbog čega su autori zaključili da temperatura od 35 °C ne predstavlja snažan stres za biljke češnjaka. Zajedno, ovi

rezultati potvrđuju prethodno spomenutu hipotezu da izlaganje klijanaca temperaturi od 37 °C predstavlja blagi do umjereni stres za klijance uročnjaka.

Analiza biljaka nakon 24 sata pokazala je da su linije *oeBPM1* i *amiR-bpm* imale sličniji odgovor na toplinski stres u usporedbi s divljim tipom. Nameće se misao zašto su linija sa smanjenom ekspresijom gena *BPM* i linija s prekomjernom ekspresijom gena *BPM1* pokazale sličniji odgovor u odnosu na divlji tip. Odgovor bi mogao biti uključenost proteina BPM u neke druge mehanizme, poput mehanizma RdDM (Jagić i sur. 2022), koji nisu dio ubikvitin-proteasomalnog puta, a omogućuju biljci reakcije na stres koje su po nekim detaljima drugačije od reakcija u divljeg tipa. Prethodno spomenuta istraživanja (Popova i sur. 2013, Zhong i sur. 2017) pokazala su da su biljke s narušenim mehanizmom RdDM osjetljivije na stres, uključujući i toplinski stres. S druge strane, postoje naznake da prekomjerna ekspresija određenih komponenti mehanizma RdDM dovodi do veće tolerancije različitih stresnih čimbenika. Naime, klijanci kultivara topole (*Populus deltoides* × *Populus euramericana* „Nanlin895“) s prekomjernom ekspresijom gena *RDMI* pokazuju uspješniju regeneraciju korijena u usporedbi s klijancima divljeg tipa nakon izlaganja solnom stresu (Movahedi i sur. 2018). Drugim riječima, moji rezultati sugeriraju da ovisno o razini proteina BPM u stanici, biljka može koristiti različite strategije odgovora na toplinski stres. S jedne strane, u uvjetima smanjene razine proteina BPM (linija *amiR-bpm*) može doći do pojačane akumulacije proteina DREB2A i indukcije ekspresije različitih gena, reguliranih tim transkripcijskim faktorom, koji će pomoći biljci u uvjetima stresa. No, isto tako je moguće da u uvjetima prekomjerne razine proteina BPM (linija *oeBPM1*) akumulacija DREB2A bude smanjena, ali se ekspresija gena uključenih u odgovor na stres kontrolira na epigenetičkoj razini, odnosno putem mehanizma RdDM.

Temperatura od 37 °C nije izazvala oksidacijska oštećenja niti u linijama s promijenjenom ekspresijom gena *DMS3*, čemu u prilog idu smanjeni sadržaj H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i stupanj lipidne peroksidacije te povećana aktivnost antioksidacijskih enzima u tretiranim klijancima. Međutim, multivarijatna analiza pokazala je da postoji razlika u dinamici aktivnosti antioksidacijskih enzima s obzirom na gensku pozadinu (*oeDMS31*, *dms3-1*, divlji tip) sugerirajući mogućnost da je metilacija uključena u regulaciju antioksidacijskog sustava. U nekoliko radova autori su predložili da pojačana akumulacija ROS-ova u stanici dovodi do smanjenja globalne metilacije i stimulacije odgovora biljke na stres (Choi i Sano 2007, Ou i sur. 2015, Berglund i sur. 2017, Ramakrishnan i sur. 2022). Primjerice, izlaganje klijanaca kukuruza (*Zea mays* L.) povišenom salinitetu dovodi do metilacije i utišavanja ekspresije gena *PP2C* (engl. *protein*

*phosphatase 2C*), negativnog regulatora u odgovoru na stres. Istovremeno, dolazi do demetilacije i pojačane ekspresije gena *GST* (engl. *glutathione S-transferase*), koji se smatra pozitivnim regulatorom odgovora na stres i dio je antioksidacijskog sustava (Tan 2010).

Poznato je da se epigenetička regulacija ekspresije gena odvija putem mehanizma RdDM, u kojem važnu ulogu ima protein DMS3 (Zhang i sur. 2018, Erdmann i Picard 2020). Dosadašnja istraživanja sugeriraju da oksidacijski stres može inhibirati aktivnost mehanizma RdDM te potaknuti pojačanu aktivnost antioksidacijskog sustava (Seta i sur. 2017, Charbonnel i sur. 2017). Međutim, zanimljivo je primijetiti da je u usporedbi s divljim tipom, koji je pokazao pojačanu aktivnost enzima APX i CAT nakon izlaganja povišenoj temperaturi, linija *oeDMS3* imala pojačanu aktivnost enzima G-POD, APX i SOD, dok je linija *dms3-1* imala pojačanu aktivnost samo enzima CAT. Slični rezultati dobiveni su u istraživanju Chan i sur. (2016), u sklopu kojeg su autori istraživali toleranciju hladnoće u mutanata uročnjaka s promijenjenim mehanizmom RdDM. Rezultati su pokazali da mutanti u usporedbi s divljim tipom imaju smanjenu aktivnost antioksidacijskih enzima nakon izlaganja sniženim temperaturama. To je u skladu s mojim rezultatima gdje je zabilježena smanjena aktivnost većine antioksidacijskih enzima nakon izlaganja klijanaca linije *dms3-1* povišenoj temperaturi. Istraživanje Rizhsky i sur. (2002) otkrilo je da su biljke duhana s djelomično narušenom aktivnošću enzima APX i/ili CAT osjetljivije od biljaka divljeg tipa te pokazuju veće smanjenje stope fotosinteze nakon izlaganja abiotičkom stresu. Stoga se u svjetlu mojih rezultata može zaključiti da linija *dms3-1* pokazuje veću osjetljivost na toplinski stres u odnosu na druge istraživane linije. No, pomalo je kontradiktorno da uslijed oksidacijskog stresa dolazi do smanjenja aktivnosti mehanizma RdDM i povećane aktivnosti antioksidacijskog sustava, dok istovremeno, linije s narušenim mehanizmom RdDM pokazuju djelomičnu aktivaciju antioksidacijskog sustava. Ove spoznaje sugeriraju da je za odgovor biljke na stres ključno pravilno funkcioniranje mehanizma RdDM. To je i potvrđeno istraživanjem iz 2013. godine (Popova i sur. 2013) u kojem je dokazano da je mehanizam RdDM nužan za bazalnu termotoleranciju u uročnjaka. Autori su pokazali da biljke s narušenim mehanizmom RdDM imaju smanjenu stopu preživljavanja nakon izlaganja povišenoj temperaturi u odnosu na divlji tip. Također, dokazali su da je narušena ekspresija gena u biljaka koje imaju mutiran mehanizam RdDM, pozitivno korelirana s narušenom epigenetskom regulacijom susjednih transpozona. Drugim riječima, zbog nefunkcionalnog mehanizma RdDM dolazi do smanjene regulacije aktivnosti transpozona što uzrokuje njihovu pojačanu aktivnost i dovodi do narušavanja ekspresije gena, između ostalog i gena koji su

ključni u odgovoru biljke na stres. Konačni rezultat je smanjena tolerancija biljke na nepovoljne okolišne uvjete, uključujući i toplinski stres.

Posljednjih godina različita istraživanja dokazala su da prilikom izlaganja biljaka promjenjivim okolišnim čimbenicima dolazi do pojačane stope sinteze prolina, pritom ukazujući na ulogu prolina u osmoregulaciji, neutralizaciji slobodnih radikala, stabilizaciji proteina te održavanju redoks-ravnoteže i pH vrijednosti u stanici (Ozden i sur. 2009, Gill i sur. 2013, Li i sur. 2018). Međutim, u sklopu ovog istraživanja većina tretiranih klijanaca (*oeBPMT1*, *oeDMS3*, *dm3-1*, divlji tip) pokazala je smanjen sadržaj prolina odmah nakon izlaganja povišenoj temperaturi. Slični rezultati primijećeni su u istraživanju Gür i sur. (2010) te u istraživanju Kumar i sur. (2012), nakon što su biljke pamuka (*Gossypium hirsutum* L.), odnosno pšenice (*Triticum aestivum* L.), bile izložene različitim toplinskim tretmanima. Rizhsky i sur. (2004) proveli su istraživanje u kojem su klijance uročnjaka uzgajali na podlogama s različitim koncentracijama prolina te ih potom izlagali povišenoj temperaturi. Rezultati su pokazali da s porastom koncentracije prolina dolazi do pojačane inhibicije rasta korijena i izdanka uslijed izlaganja klijanaca toplinskom stresu. Drugim riječima, ovi rezultati sugeriraju da pojačana količina prolina može imati štetan učinak na biljke tijekom toplinskog stresa. Ovu hipotezu potvrdilo je istraživanje Lv i sur. (2011) koje je bilo usmjereno na učinak toplinskog stresa na transgeničnu liniju uročnjaka s prekomjernom ekspresijom gena *P5CS1* (engl. *delta1-pyrroline-5-carboxylate synthase*). Budući da je protein P5CS1 dio biosintetskog puta prolina, spomenuta linija akumulira više prolina u usporedbi s divljim tipom. Nakon izlaganja povišenoj temperaturi, linija s prekomjernom ekspresijom gena *P5CS1* ima niži udio klorofila i stopu preživljavanja, te viši stupanj lipidne peroksidacije i aktivnost antioksidacijskih enzima u usporedbi s divljim tipom, potvrđujući da povećani udio prolina u tkivu dovodi do smanjene termotolerancije biljke. Stoga nije neobično da je smanjena akumulacija prolina u odgovoru na toplinski stres zamijećena i u mojem istraživanju.

Istraživanje Lv i sur. (2011) posebno je zanimljivo ako ga povežemo s usporedbom genskih pozadina, pri čemu je linija *oeBPMT1* općenito imala niži sadržaj prolina u usporedbi s linijom *amiR-bpm*. Niži sadržaj prolina u liniji *oeBPMT1* također je zabilježen u istraživanju Vitko i sur. (2022), u kojem je interakcija BPM1-DREB2A predložena kao regulatorni mehanizam stanične razine prolina. Naime, prema bazi podataka KEGG (engl. *Kyoto encyclopedia of genes and genomes*), protein DREB2A uključen je u metabolizam prolina negativnom regulacijom prolin dehidrogenaze i prolil 4-hidroksilaze, enzima uključenih u katabolizam prolina. To je potvrdilo istraživanje Xiu i sur. (2016), u kojem su biljke bagrema (*Robinia pseudoacacia* L.) s

prekomjernom ekspresijom gena *DREB2A* izložene suši, te je analiza pokazala više razine prolina u odnosu na divlji tip. Također, ovdje je važno ponovno istaknuti istraživanje Škiljaica i sur. (2020) koje je pokazalo da linija *oeBPM1* ima sniženu ekspresiju gena *HSFA3*, direktno reguliranog proteinom DREB2A, sugerirajući da su i razine proteina DREB2A snižene. Moguće je da prekomjerna ekspresija proteina BPM1 dovodi do smanjenja razine proteina DREB2A u stanici, što rezultira povećanom stopom katabolizma prolina i dovodi do nižeg sadržaja prolina u liniji *oeBPM1*. U prilog toj hipotezi ide usporedba sadržaja prolina i ekspresije gena *BPM* u linijama *oeBPM1* i *amiR-bpm* te divljem tipu. Linija *oeBPM1* s prekomjernom ekspresijom gena *BPM1* imala je bazično niži sadržaj prolina, dok je linija *amiR-bpm* sa smanjenom ekspresijom gena *BPM1*, 4, 5 i 6 imala bazično viši sadržaj prolina. Međutim, važno je istaknuti da je divlji tip također imao bazično niži sadržaj prolina u odnosu na liniju *amiR-bpm*, ali blago viši sadržaj u odnosu na liniju *oeBPM1*. To sugerira da su i drugi proteini BPM uključeni u regulaciju stanične razine prolina, ne nužno samo protein BPM1.

Zanimljivo je istaknuti da je linija *amiR-bpm* imala bazično više razine H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, prolina i stupnja lipidne peroksidacije. Unatoč tome, to nije uzrokovalo slabiji rast u kontrolnim uvjetima niti je dovelo do smanjenog odgovora na toplinski stres u usporedbi s linijom *oeBPM1* i divljim tipom. Povišeni stupanj lipidne peroksidacije, odnosno pokazatelj oštećenja staničnih membrana uzrokovanih ROS-ovima, vjerojatno je rezultat povišene koncentracije H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Larkindale i Knight 2002, Zhou i sur. 2019). S obzirom na to da je redoks-ravnoteža u stanici kontrolirana aktivnošću antioksidacijskih enzima, te da ja nisam primijetila bazično višu aktivnost enzima u liniji *amiR-bpm* u usporedbi s drugim linijama, vjerojatno je tu ulogu preuzeo prolin. Naime, prema istraživanjima, prolin ima ulogu u neutralizaciji slobodnih radikala i održavanju redoks-ravnoteže u stanici (Ozden i sur. 2009, Gill i sur. 2013, Li i sur. 2018).

Tijekom ovog istraživanja, zabilježila sam bazično nižu razinu prolina u liniji *oeDMS3*. Slični rezultati, zabilježeni su u kultivaru rajčice (*Solanum lycopersicum* L.) s prekomjernom ekspresijom gena *AGO4A* (engl. *argonaute 4A*), važne komponente mehanizma RdDM (Huang i sur. 2016). Ovi rezultati ukazuju na moguću povezanost stanične razine prolina i metilacijskih mehanizama, uključujući mehanizam RdDM. Naime, u mom istraživanju, obje linije s prekomjernom ekspresijom proteina uključenih u mehanizam RdDM (*BPM1*, *DMS3*) imale su niže razine prolina u tkivu. Istraživanje provedeno na riži (*Oryza sativa* L.) ukazuje da je metilacija DNA uključena u regulaciju biosinteze prolina tijekom osmotskog stresa (Zhang i sur. 2013). Naime, biljke riže sa smanjenom metilacijom DNA imaju pojačanu ekspresiju dvaju gena uključenih u biosintezu prolina – *P5CS* i  $\delta$ -*OAT* (engl. *ornithine delta-aminotransferase*),



te pokazuju porast količine prolina uslijed izlaganja osmotskom stresu induciranom polietilen glikolom. Dakle, ekspresija gena koji sudjeluju u biosintetskom putu prolina regulirana je ne samo transkripcijskim faktorima već i metilacijom DNA. Rad Jagić i sur. (2022) pokazao je da linija *oeBPM1*, koja je bila predmet i mogeg istraživanja, ima značajno više razine globalne metilacije DNA u odnosu na divlji tip. Pretpostavka je da hipermetiliranost genoma u liniji *oeBPM1* djeluje kao inhibicijski faktor za ekspresiju gena uključenih u biosintezu prolina što naposljetku, uz interakciju BPM1-DREB2A, pridonosi smanjenoj razini prolina. Međutim, način na koji prekomjerna ekspresija gena *DMS3* utječe na smanjenje razine prolina u liniji *oeDMS3* ostaje nejasan. Prethodno sam spomenula da prekomjerna ekspresija gena *DMS3* može narušiti funkcionalnost mehanizma RdDM, što bi posljedično moglo dovesti do smanjenja globalne metilacije. S obzirom na prethodna istraživanja, očekivao bi se povišeni sadržaj prolina u liniji *oeDMS3*, a ne smanjeni. Dakle, postoji li mogućnost da, unatoč narušenoj funkcionalnosti mehanizma RdDM, ipak dolazi do hipermetilacije određenih regija zbog čega sam zabilježila smanjeni sadržaj prolina u liniji *oeDMS3*? Ovo pitanje ostaje otvoreno.

Nakon 24-satnog oporavka na temperaturi uzgoja, sadržaj prolina u većini tretiranih klijanaca (*oeBPM1*, *amiR-bpm*, *oeDMS3*, divlji tip) vratio se na kontrolne razine. To opažanje ukazuje na ponovnu uspostavu stanične ravnoteže nakon toplinskog stresa. Ipak, u tretiranih klijanaca linije *dms3-1* zabilježen je porast količine prolina nakon istog perioda oporavka. Prethodna istraživanja sugeriraju da porast količine prolina pri povišenim temperaturama može štititi fotosintetski aparat tijekom i nakon toplinskog stresa (Tonhati i sur. 2020, Rajametov i sur. 2021, Sehar i sur. 2023). U ovom istraživanju, smanjenje fotosintetske učinkovitosti odmah nakon izlaganja temperaturi od 37 °C, ali i nakon oporavka na temperaturi uzgoja, zamijetila sam samo u liniji *dms3-1*. Stoga bi porast količine prolina u ovoj liniji moglo predstavljati obrambeni mehanizam protiv štetnih učinaka povišene temperature. Ovu teoriju dodatno potkrepljuje analiza fotosintetske učinkovitosti i sadržaja prolina u ostalim tretiranim klijancima, kod kojih nisu uočene značajnije promjene tijekom oporavka od toplinskog stresa.

Uzevši o obzir spomenute rezultate, mogu zaključiti da temperatura od 37 °C nije izazvala značajan oksidacijski stres u istraživanim linijama, čemu u prilog idu nepromijenjeni ili smanjeni sadržaj H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i stupanj lipidne peroksidacije u tretiranim klijancima istraživanih linija. Usporedba genskih pozadina pokazala je da postoji razlika u dinamici aktivnosti antioksidacijskih enzima s obzirom na ekspresiju i funkcionalnost proteina BPM i DMS3. Također, većina tretiranih klijanaca (*oeBPM1*, *oeDMS3*, *dm3-1*, divlji tip) pokazala je smanjeni sadržaj prolina odmah nakon izlaganja povišenoj temperaturi. Nakon 24-satnog oporavka,

sadržaj prolina u većini tretiranih klijanaca (*oeBPM1*, *oeDMS3*, divlji tip) vratio se na kontrolne razine. Ipak, u tretiranih klijanaca linije *dms3-1* zabilježen je porast količine prolina nakon oporavka.

### 5.2.3. Proteini toplinskog šoka

Imajući na umu da izloženost biljaka toplinskom stresu inducira ekspresiju proteina toplinskog šoka (HSP), usmjerila sam pažnju na analizu ekspresije proteina iz porodica HSP90 i HSP70. Očekivano, svi tretirani klijanci, neovisno o genskoj pozadini, pokazali su značajno povećanje ekspresije proteina HSP90 u usporedbi s odgovarajućim kontrolama. Ovaj rezultat u skladu je s opažanjima brojnih prethodnih istraživanja koja su ukazala na tendenciju veće indukcije molekularnih šaperona tijekom toplinskog stresa u odnosu na druge proteine (Finka i sur. 2011, Finka i sur. 2015, Guihur i sur. 2021). Zanimljivo je primijetiti da je ekspresija proteina HSP90 ostala na povišenim razinama čak i nakon perioda oporavka. To je u skladu s istraživanjem Charng i sur. (2006), koje je pokazalo da razina proteina HSP90 dosegne svoj maksimum otprilike tri sata nakon izlaganja klijanaca uročnjaka temperaturi od 37 °C, a potom se postupno smanjuje na razine zabilježene u kontrolnim uvjetima tijekom perioda oporavka od 72 sata. Ovo sugerira da, iako je stres bio relativno blag i kratkotrajan, njegove posljedice na stanični proteom mogu imati dugotrajniji učinak. Povišene razine proteina HSP90 nakon izlaganja visokim temperaturama mogu igrati ključnu ulogu u procesu oporavka, olakšavajući ponovno smatanje ili stabilizaciju denaturiranih proteina koji su oštećeni tijekom stresnog događaja (Hasanuzzaman i sur. 2013).

U usporedbi s proteinom HSP90, protein HSP70 nije pokazao jedinstven odgovor na toplinski stres, što ukazuje na mogućnost da se indukcija ekspresije proteina HSP70 mijenja ovisno o vrsti tretmana i genskoj pozadini. Proteini HSP70 smatraju se dijelom skupine „*hit and run*“ proteina, karakteriziranih brzim i izraženim povećanjem ekspresije tijekom i neposredno nakon toplinskog stresa te relativno brzim smanjenjem razine proteina u fazi oporavka (Lämke i sur. 2016). To je u skladu s rezultatima koje sam opazila u liniji *oeBPM1* i divljem tipu, gdje su tretirani klijanci pokazali povećanje razine proteina HSP70 neposredno nakon izloženosti povišenim temperaturama, ali ne i nakon 24-satnog oporavka. Nasuprot tome, u drugih istraživanih linija (*amiR-bpm*, *oeDMS3*, *dms3-1*) nije dokazana ovakva dinamika proteina HSP70. Smanjena razina proteina BPM1 (*amiR-bpm*), odnosno narušena funkcionalnost proteina DMS3 (*oeDMS3*, *dms3-1*) te posljedično smanjenje funkcionalnosti mehanizma

RdDM mogli bi objasniti ove rezultate. Naime, sekvenciranje čitavog genoma uročnjaka izloženog toplinskom stresu otkrilo je da gen *HSP70* prolazi kroz metilacijske promjene u sva tri okruženja – CG, CHG, CHH (Korotko i sur. 2021). Do porasta metilacije gena *HSP70* u sva tri okruženja dolazi u ranoj fazi odgovora biljke na stres, odnosno šest sati nakon izlaganja biljaka uročnjaka temperaturi od 42 °C. Nasuprot tome, nakon vraćanja biljaka u kontrolne uvjete i daljnjeg oporavka dolazi do demetilacije gena. Također, dokazano je da toplinski stres potiče povećanje broja epigenetičkih modifikacija histona H3 (H3K9ac i H3K4me3) koje induciraju transkripciju gena *HSP70* tijekom rane faze odgovora na toplinski stres (Lämke i sur. 2016). Zanimljivo, isto istraživanje pokazalo je smanjenje broja modifikacija H3K9ac i H3K4me3 i transkripcije gena *HSP70* u fazi oporavka. Stoga, ovi rezultati upućuju na zaključak da funkcionalnost mehanizama metilacije, uključujući mehanizam RdDM, može utjecati na epigenetsku regulaciju gena *HSP70*, što bi na kraju moglo utjecati na razinu proteina unutar stanice. Analizom genskih pozadina uočeno je da linija *dms3-1* ima niže bazične razine proteina HSP90 i HSP70 u odnosu na divlji tip. Rad Kozeko (2021) pokazuje da izlaganje klijanaca mutanta *hsp90-1* i *hsp70-5* temperaturi od 45 °C dovodi do gotovo potpunog smanjenja stope preživljavanja, dok, s druge strane, klijanci divljeg tipa mogu podnijeti ovu temperaturu bez izraženijih oštećenja. Ovi podaci sugeriraju da biljke s nižim razinama proteina HSP90 i HSP70 imaju manju sposobnost preživljavanja i rasta kad su izložene visokim temperaturama, što implicira na smanjenu termotoleranciju linije *dms3-1*. Ta hipoteza posebno je zanimljiva u kontekstu mojih rezultata koji su ukazali na veću osjetljivost fotosintetskog aparata tretiranih klijanaca linije *dms3-1* u usporedbi s drugim istraživanim linijama. Dodatno, smanjena funkcionalnost fotosintetskog aparata koju sam uočila u tretiranih klijanaca linije *dms3-1* u skladu je s rezultatima biljaka uzgajanih na zemljanom supstratu. Naime, u tih biljaka opazila sam inhibiciju rasta rozete nakon tretmana biljaka u ranijem razvojnom stadiju (TS2L) u usporedbi s tretmanom u kasnijem stadiju (TS8L).

Na temelju analize ekspresije proteina HSP90 i HSP70, mogu zaključiti da je toplinski tretman utjecao na indukciju proteina HSP90, ali ne i genska pozadina, s obzirom da su svi tretirani klijanci pokazali značajnu indukciju ovog proteina. Međutim, protein HSP70 nije pokazao jedinstven odgovor na toplinski stres te je njegova indukcija bila ovisna o genskoj pozadini i toplinskom tretmanu. U liniji *oeBPM1* i divljem tipu došlo je do indukcije proteina HSP70 neposredno nakon izlaganja povišenim temperaturama, ali ne i tijekom oporavka. U preostalih linija (*amiR-bpm*, *oeDMS3*, *dms3-1*) nije uočena značajna razlika u ekspresiji HSP70 između kontrolnih i tretiranih klijanaca.

## 6. ZAKLJUČAK

Na temelju rezultata ovog istraživanja mogu izvesti sljedeće zaključke:

- Kratkoročno izlaganje biljaka povišenoj temperaturi inhibiralo je rast rozete i smanjilo biomasu biljaka divljeg tipa te linija *oeBPM1*, *amiR-bpm* i *oeDMS3*, neovisno o razvojnom stadiju u kojem su biljke bile izložene toplinskom stresu (TS2L, TS8L, TS2L+8L). Jedino sam kod biljaka linije *dms3-1* tretiranih u kasnijem stadiju (TS8L) zabilježila porast vrijednosti praćenih morfoloških parametara.
- Uočila sam smanjeni prirast linija *oeBPM1* i *dms3-1* u kontrolnim uvjetima u usporedbi s divljim tipom i linijom *amiR-bpm*, odnosno linijom *oeDMS3*.
- Na temelju analize parametra  $F_v/F_m$  uočila sam da je toplinski stres uzrokovao najveće promjene u biljaka tretiranih u ranijem stadiju (TS2L), odnosno oba stadija (TS2L+8L). Detaljnijom analizom fotosinteze u klijanaca uzgojenih *in vitro* otkrila sam poremećaj funkcionalnosti fotosintetskog aparata u linijama *oeBPM1* i *dms3-1*, pri čemu se linija *dms3-1* sporije oporavljala.
- Tretirani klijanci divljeg tipa te linija *oeBPM1*, *oeDMS3* i *dms3-1* imali su smanjeni sadržaj prolina odmah nakon izlaganja povišenoj temperaturi. Nakon 24 sata, sadržaj prolina u većini tretiranih klijanaca vratio se na kontrolne razine, dok je u tretiranih klijanaca linije *dms3-1* zabilježen porast količine prolina.
- Toplinski tretman klijanaca nije izazvao jači oksidacijski stres te sam, ovisno o liniji, zabilježila nepromijenjeni ili smanjeni sadržaj  $H_2O_2$  i stupanj lipidne peroksidacije u odnosu na kontrolne razine. Aktivnost antioksidacijskih enzima ovisila je o genskoj pozadini.
- Linija *amiR-bpm* imala je bazično veći sadržaj  $H_2O_2$  i prolina te viši stupanj lipidne peroksidacije.
- Svi tretirani klijanci, neovisno o genskoj pozadini, pokazali su značajnu indukciju proteina HSP90 odmah nakon toplinskog tretmana te nakon 24 sata. Indukcija proteina HSP70 ovisila je o genskoj pozadini. Usporedbom genskih pozadina uočila sam da linija *dms3-1* ima nižu bazičnu razinu proteina HSP90 i HSP70.
- Promijenjena ekspresija gena *BPM* utjecala je na biomasu i klijavost sjemenki. Sjemenke linije *oeBPM1* prikupljene od tretiranih biljaka imale su veću biomasu od divljeg tipa te su klijale brže od sjemenki linije *amiR-bpm*.

## 7. LITERATURA

- Abouzari A, Fakheri BA (2015) Reactive oxygen species: generation, oxidative damage, and signal transduction. *International Journal of Life Sciences* 9(5): 3-17. <https://doi.org/10.3126/ijls.v9i5.12699>
- Aebi H (1984) [13] Catalase *in vitro*. *Methods in Enzymology* 105: 121-126. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(84\)05016-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05016-3)
- Aghamolki MTK, Yusop MK, Oad FC, Zakikhani H, Jaafar HZ, Kharidah S, Musa MH (2014) Heat stress effects on yield parameters of selected rice cultivars at reproductive growth stages. *Journal of Food, Agriculture and Environment* 12(2): 741-746. <https://doi.org/10.1234/4.2014.5230>
- Ahmad P, Sarwat M, Sharma S (2008) Reactive oxygen species, antioxidants and signaling in plants. *Journal of Plant Biology* 51(3): 167-173. <https://doi.org/10.1007/BF03030694>
- Akter N, Rafiqul Islam M (2017) Heat stress effects and management in wheat. A review. *Agronomy for Sustainable Development* 37(5): 1-17. <https://doi.org/10.1007/s13593-017-0443-9>
- Alam NB, Ghosh A (2018) Comprehensive analysis and transcript profiling of *Arabidopsis thaliana* and *Oryza sativa* catalase gene family suggests their specific roles in development and stress responses. *Plant Physiology and Biochemistry* 123: 54-64. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2017.11.018>
- Allakhverdiev SI, Kreslavski VD, Klimov VV, Los DA, Carpentier R, Mohanty P (2008) Heat stress: an overview of molecular responses in photosynthesis. *Photosynthesis Research* 98: 541-550. <https://doi.org/10.1007/s11120-008-9331-0>
- Anjum NA, Gill SS, Gill R, Hasanuzzaman M, Duarte AC, Pereira E, Ahmad I, Tuteja R, Tuteja N (2014). Metal/metalloid stress tolerance in plants: role of ascorbate, its redox couple, and associated enzymes. *Protoplasma* 251: 1265-1283. <https://doi.org/10.1007/s00709-014-0636-x>
- Asada K (2006) Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. *Plant Physiology* 141(2): 391-396. <https://doi.org/10.1104/pp.106.082040>
- Ashapkin VV, Kutueva LI, Aleksandrushkina NI, Vanyushin BF (2020) Epigenetic mechanisms of plant adaptation to biotic and abiotic stresses. *International Journal of Molecular Sciences* 21(20): 1-32. <https://doi.org/10.3390/ijms21207457>
- Ashraf M, Harris PJC (2013) Photosynthesis under stressful environments: An overview. *Photosynthetica* 51(2): 163-190. <https://doi.org/10.1007/s11099-013-0021-6>
- Ayenon MAT, Danquah A, Hanson P, Asante IK, Danquah EY (2022) Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) genotypes respond differently to long-term dry and humid heat stress. *Horticulturae* 8(2): 118. <https://doi.org/10.3390/horticulturae8020118>
- Bai T, Li C, Ma F, Feng F, Shu H (2010) Responses of growth and antioxidant system to root-zone hypoxia stress in two *Malus* species. *Plant and Soil* 327(1): 95-105. <https://doi.org/10.1007/s11104-009-0034-x>
- Ban Z, Estelle M (2021) CUL3 E3 ligases in plant development and environmental response. *Nature Plants* 7(1): 6-16. <https://doi.org/10.1038/s41477-020-00833-6>

- Bates LS, Waldren RA, Teare ID (1973) Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil* 39: 205-207. <https://doi.org/10.1007/BF00018060>
- Bauer N, Škiljaica A, Malenica N, Razdorov G, Klasić M, Juranić M, Močibob M, Sprunck S, Dresselhaus T, Leljak Levanić D (2019) The MATH-BTB protein TaMAB2 accumulates in ubiquitin-containing foci and interacts with the translation initiation machinery in *Arabidopsis*. *Frontiers in Plant Science* 10: 1469. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01469>
- Bauweraerts I, Ameye M, Wertin TM, McGuire MA, Teskey RO, Steppe K (2014) Water availability is the decisive factor for the growth of two tree species in the occurrence of consecutive heat waves. *Agricultural and Forest Meteorology* 189: 19-29. <https://doi.org/10.1016/j.agrformet.2014.01.001>
- Beauchamp C, Fridovich I (1971) Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry* 44: 276-287. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(71\)90370-8](https://doi.org/10.1016/0003-2697(71)90370-8)
- Berglund T, Wallström A, Nguyen TV, Laurell C, Ohlsson AB (2017) Nicotinamide; antioxidative and DNA hypomethylation effects in plant cells. *Plant Physiology and Biochemistry* 118: 551-560. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2017.07.023>
- Blevins T, Podicheti R, Mishra V, Marasco M, Wang J, Rusch D, Tang H, Pikaard CS (2015) Identification of Pol IV and RDR2-dependent precursors of 24 nt siRNAs guiding de novo DNA methylation in *Arabidopsis*. *eLife* 4: e09591. <https://doi.org/10.7554/eLife.09591.001>
- Bokszczanin KL, Solanaceae Pollen Thermotolerance Initial Training Network (SPOT-ITN) Consortium, Fragkostefanakis S (2013) Perspectives on deciphering mechanisms underlying plant heat stress response and thermotolerance. *Frontiers in Plant Science* 4: 315. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00315>
- Boyes DC, Zayed AM, Ascenzi R, McCaskill AJ, Hoffman NE, Davis KR, Görlach J (2001) Growth stage-based phenotypic analysis of *Arabidopsis*: a model for high throughput functional genomics in plants. *The Plant Cell* 113(7): 1499-1510. <https://doi.org/10.1105/TPC.010011>
- Bradford MM (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. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>
- Buchanan BB, Gruissem W, Jones RL (2015) *Biochemistry and molecular biology of plants*. 2nd edn. John Wiley and Sons, Hoboken, New Jersey.
- Buxton GV, Greenstock CL, Helman WP, Ross AB (1988) Critical Review of rate constants for reactions of hydrated electrons, hydrogen atoms and hydroxyl radicals ( $\cdot\text{OH}/\cdot\text{O}^-$  in Aqueous Solution. *Journal of Physical and Chemical Reference Data* 17(2): 513-886. <https://doi.org/10.1063/1.555805>
- Byrdin M, Rimke I, Schlodder E, Stehlik D, Roelofs TA (2000) Decay kinetics and quantum yields of fluorescence in photosystem I from *Synechococcus elongatus* with P700 in the reduced and oxidized state: are the kinetics of excited state decay trap-limited or transfer-limited? *Biophysical Journal* 79(2): 992-1007. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(00\)76353-3](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(00)76353-3)

- Caffarri S, Tibiletti T, Jennings RC, Santabarbara S (2014) A comparison between plant photosystem I and photosystem II architecture and functioning. *Current Protein and Peptide Science* 15(4): 296-331.  
<https://doi.org/10.2174%2F1389203715666140327102218>
- Callis J, Carpenter T, Sun C-W, Vierstra RD (1995) Structure and evolution of genes encoding polyubiquitin and ubiquitin-like proteins in *Arabidopsis thaliana* ecotype Columbia. *Genetics* 139(2): 921-939. <https://doi.org/10.1093/genetics/139.2.921>
- Cavrak VV, Lettner N, Jamge S, Kosarewicz A, Bayer LM, Mittelsten Scheid O (2014) How a retrotransposon exploits the plant's heat stress response for its activation. *PLoS Genetics* 10(1): e1004115. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004115>
- Ceron-Garcia A, Vargas-Arispuro I, Aispuro-Hernandez E, Martinez-Tellez MA (2012) Oligoglucan elicitor effects during plant oxidative stress. U: Bubulya P (ur.) Cell metabolism – cell homeostasis and stress response. InTech, 1-12.  
<https://doi.org/10.5772/26057>
- Chan Z, Wang Y, Cao M, Gong Y, Mu Z, Wang H, Hu Y, Deng X, He XJ, Zhu JK (2016) *RDM4* modulates cold stress resistance in *Arabidopsis* partially through the *CBF*-mediated pathway. *New Phytologist* 209(4): 1527-1539.  
<https://doi.org/10.1111/nph.13727>
- Chang YN, Zhu C, Jiang J, Zhang H, Zhu JK, Duan CG (2020) Epigenetic regulation in plant abiotic stress responses. *Journal of Integrative Plant Biology* 62(5): 563-580.  
<https://doi.org/10.1111/jipb.12901>
- Charbonnel C, Niazi AK, Elvira-Matlot E, Nowak E, Zytnicki M, de Bures A, Jobet E, Opsomer A, Shamandi N, Nowotny M, Carapito C, Reichheld JP, Vaucheret H, Sáez-Vásquez J (2017) The siRNA suppressor RTL1 is redox-regulated through glutathionylation of a conserved cysteine in the double-stranded-RNA-binding domain. *Nucleic Acids Research* 45(20): 11891-11907. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx820>
- Chang YY, Liu HC, Liu NY, Hsu FC, Ko SS (2006) *Arabidopsis* Hsa32, a novel heat shock protein, is essential for acquired thermotolerance during long recovery after acclimation. *Plant Physiology* 140(4): 1297-1305.  
<https://doi.org/10.1104/pp.105.074898>
- Chebrolu KK, Fritschi FB, Ye S, Krishnan HB, Smith JR, Gillman JD (2016) Impact of heat stress during seed development on soybean seed metabolome. *Metabolomics* 12(2): 1-14. <https://doi.org/10.1007/s11306-015-0941-1>
- Chen C, Begcy K, Liu K, Folsom JJ, Wang Z, Zhang C, Walia H (2016) Heat stress yields a unique MADS box transcription factor in determining seed size and thermal sensitivity. *Plant Physiology* 171(1): 606-622. <https://doi.org/10.1104/pp.15.01992>
- Chen L-S, Cheng L (2009) Photosystem 2 is more tolerant to high temperature in apple (*Malus domestica* Borkh.) leaves than in fruit peel. *Photosynthetica* 47(1): 112-120.  
<https://doi.org/10.1007/s11099-009-0017-4>
- Chen L, Bernhardt A, Lee J, Hellmann H (2015) Identification of *Arabidopsis* MYB56 as a novel substrate for CRL3<sup>BPM</sup> E3 ligases. *Molecular Plant* 8(2): 242-250.  
<https://doi.org/10.1016/j.molp.2014.10.004>
- Chen L, Hellmann H (2013) Plant E3 ligases: Flexible enzymes in a sessile world. *Molecular Plant* 6(5): 1388-1404. <https://doi.org/10.1093/mp/sst005>

- Chen L, Lee JH, Weber H, Tohge T, Witt S, Roje S, Fernie AR, Hellmann H (2013) *Arabidopsis* BPM proteins function as substrate adaptors to a CULLIN3-based E3 ligase to affect fatty acid metabolism in plants. *The Plant Cell* 25(6): 2253-2264. <https://doi.org/10.1105/tpc.112.107292>
- Chen S, Hajirezaei M, Peisker M, Tschiersch H, Sonnewald U, Börnke F (2005) Decreased sucrose-6-phosphate phosphatase level in transgenic tobacco inhibits photosynthesis, alters carbohydrate partitioning, and reduces growth. *Planta* 221(4): 479-492. <https://doi.org/10.1007/s00425-004-1458-4>
- Chen S, Stefanova K, Siddique KHM, Cowling WA (2021) Transient daily heat stress during the early reproductive phase disrupts pod and seed development in *Brassica napus* L. *Food and Energy Security* 10(1): e262. <https://doi.org/10.1002/fes3.262>
- Chew O, Whelan J, Millar AH (2003) Molecular definition of the ascorbate-glutathione cycle in *Arabidopsis* mitochondria reveals dual targeting of antioxidant defenses in plants. *Journal of Biological Chemistry* 278: 46869-46877. <https://doi.org/10.1074/jbc.M307525200>
- Choi CS, Sano H (2007) Abiotic-stress induces demethylation and transcriptional activation of a gene encoding a glycerophosphodiesterase-like protein in tobacco plants. *Molecular Genetics and Genomics* 277(5): 589-600. <https://doi.org/10.1007/s00438-007-0209-1>
- Choudhury FK, Rivero RM, Blumwald E, Mittler R (2017) Reactive oxygen species, abiotic stress and stress combination. *The Plant Journal* 9f0(5): 856-867. <https://doi.org/10.1111/tpj.13299>
- Ci D, Song Y, Du Q, Tian M, Han S, Zhang D (2016) Variation in genomic methylation in natural populations of *Populus simonii* is associated with leaf shape and photosynthetic traits. *Journal of Experimental Botany* 67(3): 723-737. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv485>
- Ciais P, Reichstein M, Viovy N, Granier A, Ogée J, Allard V, Aubinet M, Buchmann N, Bernhofer C, Carrara A, Chevallier F, de Noblet N, Friend AD, Friedlingstein P, Grünwald T, Heinesch B, Keronen P, Knohl A, Krinner G, Loustau D, Manca G, Matteucci G, Miglietta F, Ourcival JM, Papale D, Pilegaard K, Rambal S, Seufert G, Soussana JF, Sanz MJ, Schulze ED, Vesala T, Valentini R (2005) Europe-wide reduction in primary productivity caused by the heat and drought in 2003. *Nature* 437(7058): 529-533. <https://doi.org/10.1038/nature03972>
- Cohen I, Zandalinas SI, Fritschi FB, Sengupta S, Fichman Y, Azad RK, Mittler R (2021) The impact of water deficit and heat stress combination on the molecular response, physiology, and seed production of soybean. *Physiologia Plantarum* 172(1): 41-52. <https://doi.org/10.1111/ppl.13269>
- Cosio C, Dunand C (2009) Specific functions of individual class III peroxidase genes. *Journal of Experimental Botany* 60(2): 391-408. <https://doi.org/10.1093/jxb/ern318>
- Crafts-Brandner SJ, Salvucci ME (2002) Sensitivity of photosynthesis in a C4 plant, maize, to heat stress. *Plant Physiology* 129(4): 1773-1780. <https://doi.org/10.1104/pp.002170>
- Cuerda-Gil D, Slotkin RK (2016) Non-canonical RNA-directed DNA methylation. *Nature Plants* 2(11): 1-8. <https://doi.org/10.1038/nplants.2016.163>
- Das K, Roychoudhury A (2014) Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. *Frontiers in Environmental Science* 2: 53. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2014.00053>



- Debnath T, Dhar DG, Dhar P (2024) Molecular switches in plant stress adaptation. *Molecular Biology Reports* 51(1): 20. <https://doi.org/10.1007/s11033-023-09051-7>
- De Boer K, Tilleman S, Pauwels L, Vanden Bossche R, de Sutter V, Vanderhaeghen R, Hilson P, Hamill JD, Goossens A (2011) APETALA2/ETHYLENE RESPONSE FACTOR and basic helix-loop-helix tobacco transcription factors cooperatively mediate jasmonate-elicited nicotine biosynthesis. *Plant Journal* 66(6): 1053-1065. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2011.04566.x>
- de Haan JR, Wehrens R, Bauerschmidt S, Piek E, van Schaik RC, Buydens LMC (2007) Interpretation of ANOVA models for microarray data using PCA. *Bioinformatics* 23(2): 184-190. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btl572>
- Deuschle K, Funck D, Forlani G, Stransky H, Biehl A, Leister D, van der Graaff E, Kunze R, Frommer WB (2004) The role of  $\Delta^1$ -pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase in proline degradation. *The Plant Cell* 16(12): 3413-3425. <https://doi.org/10.1105/tpc.104.023622>
- Ding Y, Fromm M, Avramova Z (2012) Multiple exposures to drought “train” transcriptional responses in *Arabidopsis*. *Nature Communications* 3(1): 740. <https://doi.org/10.1038/ncomms1732>
- Duan CG, Zhu JK, Cao X (2018) Retrospective and perspective of plant epigenetics in China. *Journal of Genetics and Genomics* 45(11): 621-638. <https://doi.org/10.1016/j.jgg.2018.09.004>
- Dutta S, Mohanty S, Tripathy BC (2009) Role of temperature stress on chloroplast biogenesis and protein import in pea. *Plant Physiology* 150(2): 1050-1061. <https://doi.org/10.1104/pp.109.137265>
- El-Beltagi HS, Mohamed HI (2013) Reactive oxygen species, lipid peroxidation and antioxidative defense mechanism. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca* 41(1): 44-57. <https://doi.org/10.15835/nbha4118929>
- Elewa TA, Sadak MS, Saad AM (2017). Proline treatment improves physiological responses in quinoa plants under drought stress. *Bioscience Research* 14(1): 21-33.
- Elstner EF (1982) Oxygen activation and oxygen toxicity. *Annual Review of Plant Physiology* 33(1): 73-96. <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.33.060182.000445>
- Erdmann RM, Picard CL (2020) RNA-directed DNA methylation. *PLoS Genetics* 16(10): e1009034. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1009034>
- Fahad S, Bajwa AA, Nazir U, Anjum SA, Farooq A, Zohaib A, Sadia S, Nasim W, Adkins S, Saud S, Ihsan MZ, Alharby H, Wu C, Wang D, Huang J (2017) Crop production under drought and heat stress: Plant responses and management options. *Frontiers in Plant Science* 8: 1147. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01147>
- Fang C, Dou L, Liu Y, Yu J, Tu J (2018) Heat stress-responsive transcriptome analysis in heat susceptible and tolerant rice by high-throughput sequencing. *Ecological Genetics and Genomics* 6: 33-40. <https://doi.org/10.1016/j.egg.2017.12.001>
- Feng XJ, Li JR, Qi SL, Lin QF, Jin JB, Hua XJ (2016) Light affects salt stress-induced transcriptional memory of *P5CS1* in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113(51): E8335-E8343. <https://doi.org/10.1073/pnas.1610670114>

- Finka A, Mattoo RUH, Goloubinoff P (2011) Meta-analysis of heat- and chemically upregulated chaperone genes in plant and human cells. *Cell Stress and Chaperones* 16(1): 15-31. <https://doi.org/10.1007/s12192-010-0216-8>
- Finka A, Sharma SK, Goloubinoff P (2015) Multi-layered molecular mechanisms of polypeptide holding, unfolding and disaggregation by HSP70/HSP110 chaperones. *Frontiers in Molecular Biosciences* 2: 29. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2015.00029>
- Finnegan EJ, Peacock WJ, Dennis ES (1996) Reduced DNA methylation in *Arabidopsis thaliana* results in abnormal plant development. *Developmental Biology* 93(16): 8449-8454. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.16.8449>
- Fracheboud Y, Leipner J (2003) The application of chlorophyll fluorescence to study light, temperature, and drought stress. U: DeEll JR, Toivonen PMA (ur.) *Practical applications of chlorophyll fluorescence in plant biology*. Springer, 125-150. [https://doi.org/10.1007/978-1-4615-0415-3\\_4](https://doi.org/10.1007/978-1-4615-0415-3_4)
- Furukawa M, He YJ, Borchers C, Xiong Y (2003) Targeting of protein ubiquitination by BTB-Cullin 3-Roc1 ubiquitin ligases. *Nature Cell Biology* 5(11): 1001-1007. <https://doi.org/10.1038/ncb1056>
- Galsurker O, Doron-Faigenboim A, Teper-Bamnolker P, Daus A, Lers A, Eshel D (2018) Differential response to heat stress in outer and inner onion bulb scales. *Journal of Experimental Botany* 69(16): 4047-4064. <https://doi.org/10.1093/jxb/ery189>
- Gao C, Qi S, Liu K, Li D, Jin C, Li Z, Huang G, Hai J, Zhang M, Chen M (2016) MYC2, MYC3, and MYC4 function redundantly in seed storage protein accumulation in *Arabidopsis*. *Plant Physiology and Biochemistry* 108: 63-70. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.07.004>
- Gao G, Tester MA, Julkowska MM (2020) The use of high-throughput phenotyping for assessment of heat stress-induced changes in *Arabidopsis*. *Plant Phenomics* 2020: 3723916. <https://doi.org/10.34133/2020/3723916>
- Gill SS, Tajrishi M, Madan M, Tuteja N (2013) A DESD-box helicase functions in salinity stress tolerance by improving photosynthesis and antioxidant machinery in rice (*Oryza sativa* L. cv. PB1). *Plant Molecular Biology* 82: 1-22. <https://doi.org/10.1007/s11103-013-0031-6>
- Gingerich DJ, Gagne JM, Salter DW, Hellmann H, Estelle M, Ma L, Vierstra RD (2005) Cullins 3a and 3b assemble with members of the broad complex/tramtrack/bric-a-brac (BTB) protein family to form essential ubiquitin-protein ligases (E3s) in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry* 280(19): 18810-18821. <https://doi.org/10.1074/jbc.M413247200>
- Gingerich DJ, Hanada K, Shiu SH, Vierstra RD (2007) Large-scale, lineage-specific expansion of a bric-a-brac/tramtrack/broad complex ubiquitin-ligase gene family in rice. *The Plant Cell* 19(8): 2329-2348. <https://doi.org/10.1105/tpc.107.051300>
- Gomathi R, Rakkiyapan P (2011) Comparative lipid peroxidation, leaf membrane thermostability, and antioxidant system in four sugarcane genotypes differing in salt tolerance. *International Journal of Plant Physiology and Biochemistry* 3(4): 67-74. <https://doi.org/10.5897/IJPPB.9000009>
- Grime JP, Mackey JML (2002). The role of plasticity in resource capture by plants. *Evolutionary Ecology* 16: 299-307. <https://doi.org/10.1023/A:1019640813676>

- Guihur A, Fauvet B, Finka A, Quadroni M, Goloubinoff P (2021) Quantitative proteomic analysis to capture the role of heat-accumulated proteins in moss plant acquired thermotolerance. *Plant Cell and Environment* 44(7): 2117-2133. <https://doi.org/10.1111/pce.13975>
- Gür A, Demirel U, Özden M, Kahraman A, Çopur O (2010) Diurnal gradual heat stress affects antioxidant enzymes, proline accumulation and some physiological components in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *African Journal of Biotechnology* 9(7): 1008-1015. <https://doi.org/10.5897/AJB09.1590>
- Hahn A, Bublak D, Schleiff E, Scharf KD (2011) Crosstalk between Hsp90 and Hsp70 chaperones and heat stress transcription factors in tomato. *The Plant Cell* 23(2): 741-755. <https://doi.org/10.1105/tpc.110.076018>
- Halliwell B (2006) Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiology* 141(2): 312-322. <https://doi.org/10.1104/pp.106.077073>
- Hasanuzzaman M, Nahar K, Alam MM, Roychowdhury R, Fujita M (2013) Physiological, biochemical, and molecular mechanisms of heat stress tolerance in plants. *International Journal of Molecular Sciences* 14(5): 9643-9684. <https://doi.org/10.3390/ijms14059643>
- Hassan MU, Chattha MU, Khan I, Chattha MB, Barbanti L, Aamer M, Iqbal MM, Nawaz M, Mahmood A, Ali A, Aslam MT (2021) Heat stress in cultivated plants: nature, impact, mechanisms, and mitigation strategies – a review. *Plant Biosystems* 155(2): 211-234. <https://doi.org/10.1080/11263504.2020.1727987>
- Havaux M, Tardy F (1999) Loss of chlorophyll with limited reduction of photosynthesis as an adaptive response of Syrian barley landraces to high-light and heat stress. *Australian Journal of Plant Physiology* 26(6): 569-578. <https://doi.org/10.1071/PP99046>
- Hayashi Y, Takehira K, Nozawa K, Suzuki T, Masuta Y, Kato A, Ito H (2020) *ONSEN* shows different transposition activities in RdDM pathway mutants. *Genes and Genetic Systems*, 95(4): 183-190. <https://doi.org/10.1266/ggs.20-00019>
- Hellmann H, Funck D, Rentsch D, Frommer WB (2000) Hypersensitivity of an Arabidopsis sugar signaling mutant toward exogenous proline application. *Plant Physiology* 122(2): 357-368. <https://doi.org/10.1104/pp.122.2.357>
- Hershko A, Ciechanover A (1998) The ubiquitin system. *Annual Review of Biochemistry* 67: 425-479. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.67.1.425>
- Hodges DM, DeLong JM, Forney CF, Prange RK (1999) Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. *Planta* 207(4): 604-611. <https://doi.org/10.1007/s004250050524>
- Hosseinfard M, Stefaniak S, Javid MG, Soltani E, Wojtyła Ł, Garnczarska M (2022) Contribution of exogenous proline to abiotic stresses tolerance in plants: a review. *International Journal of Molecular Sciences* 23(9): 5186. <https://doi.org/10.3390/ijms23095186>
- Hu S, Ding Y, Zhu C (2020) Sensitivity and responses of chloroplasts to heat stress in plants. *Frontiers in Plant Science* 11: 375. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00375>

- Hu XJ, Chen D, Lynne McIntyre C, Fernanda Dreccer M, Zhang ZB, Drenth J, Kalaipandian S, Chang H, Xue GP (2018) Heat shock factor C2a serves as a proactive mechanism for heat protection in developing grains in wheat via an ABA-mediated regulatory pathway. *Plant Cell and Environment* 41(1): 79-98. <https://doi.org/10.1111/pce.12957>
- Huang W, Xian Z, Hu G, Li Z (2016) SLAGO4A, a core factor of RNA-directed DNA methylation (RdDM) pathway, plays an important role under salt and drought stress in tomato. *Molecular Breeding* 36(3): 1-13. <https://doi.org/10.1007/s11032-016-0439-1>
- Hwang JE, Lim CJ, Chen H, Je J, Song C, Lim CO (2012) Overexpression of *Arabidopsis* Dehydration-responsive element-binding protein 2C confers tolerance to oxidative stress. *Molecules and Cells* 33(2): 135-140. <https://doi.org/10.1007/s10059-012-2188-2>
- Ito H, Gaubert H, Bucher E, Mirouze M, Vaillant I, Paszkowski J (2011) An siRNA pathway prevents transgenerational retrotransposition in plants subjected to stress. *Nature* 472(7341): 115-120. <https://doi.org/10.1038/nature09861>
- Jacob P, Hirt H, Bendahmane A (2017) The heat-shock protein/chaperone network and multiple stress resistance. *Plant Biotechnology Journal* 15(4): 405-414. <https://doi.org/10.1111/pbi.12659>
- Jagadish SVK, Way DA, Sharkey TD (2021) Plant heat stress: Concepts directing future research. *Plant Cell and Environment* 44(7): 1992-2005. <https://doi.org/10.1111/pce.14050>
- Jägerbrand AK, Kudo G (2016) Short-term responses in maximum quantum yield of PSII ( $F_v/F_m$ ) to *ex situ* temperature treatment of populations of bryophytes originating from different sites in Hokkaido, Northern Japan. *Plants* 5(2): 455-465. <https://doi.org/10.3390/plants5020022>
- Jagić M (2023) Domain-specific interactions of BPM1 with DMS3 and RDM1 in RNA-directed DNA methylation. *Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet*. <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:359683>
- Jagić M, Vuk T, Škiljaica A, Markulin L, Vičić Bočkor V, Tokić M, Miškec K, Razdorov G, Habazin S, Šoštar M, Weber I, Bauer N, Leljak Levanić D (2022) BPM1 regulates RdDM-mediated DNA methylation via a cullin 3 independent mechanism. *Plant Cell Reports* 41(11): 2139-2157. <https://doi.org/10.1007/s00299-022-02911-9>
- Jajic I, Sarna T, Strzalka K (2015) Senescence, stress, and reactive oxygen species. *Plants* 4(3): 393-411. <https://doi.org/10.3390/plants4030393>
- Jedmowski C, Brüggemann W (2015) Imaging of fast chlorophyll fluorescence induction curve (OJIP) parameters, applied in a screening study with wild barley (*Hordeum spontaneum*) genotypes under heat stress. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 151: 153-160. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2015.07.020>
- Jentsch S, Pyrowolakis G (2000) Ubiquitin and its kin: how close are the family ties? *Trends in Cell Biology* 10(8): 335-342. [https://doi.org/10.1016/S0962-8924\(00\)01785-2](https://doi.org/10.1016/S0962-8924(00)01785-2)
- Ji HS, Bang SG, Ahn MA, Kim G, Kim E, Eom SH, Hyun TK (2021) Molecular cloning and functional characterization of heat stress-responsive superoxide dismutases in garlic (*Allium sativum* L.). *Antioxidants* 10(5): 815. <https://doi.org/10.3390/antiox10050815>
- Juranić M, Dresselhaus T (2014) Phylogenetic analysis of the expansion of the *MATH-BTB* gene family in the grasses. *Plant Signaling and Behavior* 9(4): e28242. <https://doi.org/10.4161/psb.28242>

- Juranić M, Srilunchang KO, Krohn NG, Leljak-Levanić D, Sprunck S, Dresselhaus T (2012) Germline-specific MATH-BTB substrate adaptor MAB1 regulates spindle length and nuclei identity in maize. *The Plant Cell* 24(12): 4974-4991. <https://doi.org/10.1105/tpc.112.107169>
- Kaiser WM (1979) Reversible inhibition of the calvin cycle and activation of oxidative pentose phosphate cycle in isolated intact chloroplasts by hydrogen peroxide. *Planta* 145: 377-382. <https://doi.org/10.1007/BF00388364>
- Kalaji HM, Schansker G, Brestic M, Bussotti F, Calatayud A, Ferroni L, Goltsev V, Guidi L, Jajoo A, Li P, Losciale P, Mishra VK, Misra AN, Nebauer SG, Pancaldi S, Penella C, Pollastrini M, Suresh K, Tambussi E, Yanniccari M, Zivcak M, Cetner MD, Samborska IA, Stirbet A, Olsovska K, Kunderlikova K, Shelonzek H, Rusinowski S, Bąba W (2017) Frequently asked questions about chlorophyll fluorescence, the sequel. *Photosynthesis Research* 132(1): 13-66. <https://doi.org/10.1007/s11120-016-0318-y>
- Kalaji HM, Schansker G, Ladle RJ, Goltsev V, Bosa K, Allakhverdiev SI, Brestic M, Bussotti F, Calatayud A, Dąbrowski P, Elsheery NI, Ferroni L, Guidi L, Hogewoning SW, Jajoo A, Misra AN, Nebauer SG, Pancaldi S, Penella C, Poli DB, Pollastrini M, Romanowska-Duda ZB, Rutkowska B, Serôdio J, Suresh K, Szulc W, Tambussi E, Yanniccari M, Zivcak M (2014) Frequently asked questions about in vivo chlorophyll fluorescence: practical issues. *Photosynthesis Research* 122(2): 121-158. <https://doi.org/10.1007/s11120-014-0024-6>
- Kang HM, Saltveit ME (2002) Chilling tolerance of maize, cucumber and rice seedling leaves and roots are differentially affected by salicylic acid. *Physiologia Plantarum* 115(4): 571-576. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.2002.1150411.x>
- Kanno T, Bucher E, Daxinger L, Huettel B, Böhmendorfer G, Gregor W, Kreil DP, Matzke M, Matzke AJM (2008) A structural-maintenance-of-chromosomes hinge domain-containing protein is required for RNA-directed DNA methylation. *Nature Genetics* 40(5): 670-675. <https://doi.org/10.1038/ng.119>
- Khanna RR, Jahan B, Iqbal N, Khan NA, AlAjmi MF, Tabish Rehman M, Khan MIR (2021) GABA reverses salt-inhibited photosynthetic and growth responses through its influence on NO-mediated nitrogen-sulfur assimilation and antioxidant system in wheat. *Journal of Biotechnology* 325: 73-82. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2020.11.015>
- Kim JH, Lim SD, Jang CS (2019) *Oryza sativa* heat-induced RING finger protein 1 (OsHIRP1) positively regulates plant response to heat stress. *Plant Molecular Biology* 99(6): 545-559. <https://doi.org/10.1007/s11103-019-00835-9>
- Korotko U, Chwiałkowska K, Sańko-Sawczenko I, Kwasniewski M (2021) DNA demethylation in response to heat stress in *Arabidopsis thaliana*. *International Journal of Molecular Sciences* 22(4): 1-20. <https://doi.org/10.3390/ijms22041555>
- Kotak S, Larkindale J, Lee U, von Koskull-Döring P, Vierling E, Scharf KD (2007) Complexity of the heat stress response in plants. *Current Opinion in Plant Biology* 10(3): 310-316. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2007.04.011>
- Kozeko L (2021) Different roles of inducible and constitutive HSP70 and HSP90 in tolerance of *Arabidopsis thaliana* to high temperature and water deficit. *Acta Physiologiae Plantarum* 43(4): 58. <https://doi.org/10.1007/s11738-021-03229-x>

- Krasnovsky Jr AA (1998) Singlet molecular oxygen in photobiochemical systems: IR phosphorescence studies. *Membrane and Cell Biology* 12(5): 665-690.
- Krieger-Liszak A (2005) Singlet oxygen production in photosynthesis. *Journal of Experimental Botany* 56(411): 337-346. <https://doi.org/10.1093/jxb/erh237>
- Kumar RR, Goswami S, Sharma SK, Singh K, Gadpayle KA, Kumar N, Rai GK, Singh M, Rai RD (2012) Protection against heat stress in wheat involves change in cell membrane stability, antioxidant enzymes, osmolyte, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and transcript of heat shock protein. *International Journal of Plant Physiology and Biochemistry* 4(4): 83-91. <https://doi.org/10.5897/ijppb12.008>
- Kumar S, Kaur R, Kaur N, Bhandhari K, Kaushal N, Gupta K, Bains TS, Nayyar H (2011) Heat-stress induced inhibition in growth and chlorosis in mungbean (*Phaseolus aureus* Roxb.) is partly mitigated by ascorbic acid application and is related to reduction in oxidative stress. *Acta Physiologiae Plantarum* 33(6): 2091-2101. <https://doi.org/10.1007/s11738-011-0748-2>
- Kumar Tewari A, Charan Tripathy B (1998) Temperature-stress-induced impairment of chlorophyll biosynthetic reactions in cucumber and wheat. *Plant Physiology* 117(3): 851-858. <https://doi.org/10.1104/pp.117.3.851>
- Kumar V, Wani SH (2020) Heat stress tolerance in plants: physiological, molecular and genetic perspectives. 1st edn. John Wiley and Sons, Hoboken, New Jersey.
- Küpper H, Benedikty Z, Morina F, Andresen E, Mishra A, Trtílek M (2019) Analysis of OJIP chlorophyll fluorescence kinetics and Q<sub>A</sub> reoxidation kinetics by direct fast imaging. *Plant Physiology* 179(2): 369-381. <https://doi.org/10.1104/pp.18.00953>
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259): 680-685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
- Laing WA, Greer DH, Schnell TA (1995) Photoinhibition of photosynthesis causes a reduction in vegetative growth rates of dwarf bean (*Phaseolus vulgaris*) plants. *Functional Plant Biology* 22(4): 511-520. <https://doi.org/10.1071/PP9950511>
- Lämke J, Bäurle I (2017) Epigenetic and chromatin-based mechanisms in environmental stress adaptation and stress memory in plants. *Genome Biology* 18(1): 1-11. <https://doi.org/10.1186/s13059-017-1263-6>
- Lämke J, Brzezinka K, Altmann S, Bäurle I (2016) A hit-and-run heat shock factor governs sustained histone methylation and transcriptional stress memory. *The EMBO Journal* 35(2): 162-175. <https://doi.org/10.15252/embj.201592593>
- Larkindale J, Knight MR (2002) Protection against heat stress-induced oxidative damage in Arabidopsis involves calcium, abscisic acid, ethylene, and salicylic acid. *Plant Physiology* 128(2): 682-695. <https://doi.org/10.1104/pp.010320>
- Laxman RH, Hemamalini P, Namratha MR, Bhatt RM, Sadashiva AT (2022) Phenotyping deficit moisture stress tolerance in tomato using image derived digital features. *International Journal of Bio-resource and Stress Management* 13(4): 339-347. <http://dx.doi.org/10.23910/1.2022.2544>
- Lazarević B, Carović-Stanko K, Živčak M, Vodnik D, Javornik T, Safner T (2022) Classification of high-throughput phenotyping data for differentiation among nutrient deficiency in common bean. *Frontiers in Plant Science* 13: 931877. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.931877>

- Lechner E, Leonhardt N, Eisler H, Parmentier Y, Alioua M, Jacquet H, Leung J, Genschik P (2011) MATH/BTB CRL3 receptors target the homeodomain-leucine zipper ATHB6 to modulate abscisic acid signaling. *Developmental Cell* 21(6): 1116-1128. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.10.018>
- Leegood RC, Walker DA (1982). Regulation of fructose-1,6-bisphosphatase activity in leaves. *Planta* 156: 449-456. <https://doi.org/10.1007/BF00393316>
- Li B, Liu H-T, Sun D-Y, Zhou R-G (2004) Ca<sup>2+</sup> and calmodulin modulate DNA-binding activity of maize heat shock transcription factor in vitro. *Plant and Cell Physiology* 45(5): 627-634. <https://doi.org/10.1093/pcp/pch074>
- Li J, Guo X, Zhang M, Wang X, Zhao Y, Yin Z, Zhang Z, Wang Y, Xiong H, Zhang H, Todorovska E, Li Z (2018) *OsERF71* confers drought tolerance via modulating ABA signaling and proline biosynthesis. *Plant Science* 270: 131-139. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2018.01.017>
- Liu G, Xia Y, Liu T, Dai S, Hou X (2018) The DNA methylome and association of differentially methylated regions with differential gene expression during heat stress in *Brassica rapa*. *International Journal of Molecular Sciences* 19(5): 1414. <https://doi.org/10.3390/ijms19051414>
- Liu HC, Liao HT, Chang YY (2011) The role of class A1 heat shock factors (HSFA1s) in response to heat and other stresses in *Arabidopsis*. *Plant, Cell and Environment* 34(5): 738-751. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2011.02278.x>
- Liu Y, Xiao S, Sun H, Pei L, Liu Y, Peng L, Gao X, Liu Y, Wang J (2020) *AtPPRT1*, an E3 ubiquitin ligase, enhances the thermotolerance in *Arabidopsis*. *Plants* 9(9): 1-11. <https://doi.org/10.3390/plants9091074>
- Liu ZW, Shao CR, Zhang CJ, Zhou JX, Zhang SW, Li L, Chen S, Huang HW, Cai T, He XJ (2014) The SET domain proteins SUVH2 and SUVH9 are required for Pol V occupancy at RNA-directed DNA methylation loci. *PLoS Genetics* 10(1): e1003948. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003948>
- Lv WT, Lin B, Zhang M, Hua XJ (2011) Proline accumulation is inhibitory to *Arabidopsis* seedlings during heat stress. *Plant Physiology* 156(4): 1921-1933. <https://doi.org/10.1104/pp.111.175810>
- Maehly AC, Chance B (1954) The assay of catalases and peroxidases. *Methods of Biochemical Analysis* 1: 358-423. <https://doi.org/10.1002/9780470110171.ch14>
- Magaña Ugarte R, Escudero A, Gavilán RG (2019) Metabolic and physiological responses of Mediterranean high-mountain and alpine plants to combined abiotic stresses. *Physiologia plantarum* 165(2): 403-412. <https://doi.org/10.1111/ppl.12898>
- Mareri L, Parrotta L, Cai G (2022) Environmental stress and plants. *International Journal of Molecular Sciences* 23(10): 5416. <https://doi.org/10.3390/ijms23105416>
- Marjamaa K, Kukkola EM, Fagerstedt KV (2009) The role of xylem class III peroxidases in lignification. *Journal of Experimental Botany* 60(2): 367-376. <https://doi.org/10.1093/jxb/ern278>
- Marutani Y, Yamauchi Y, Kimura Y, Mizutani M, Sugimoto Y (2012) Damage to photosystem II due to heat stress without light-driven electron flow: involvement of enhanced introduction of reducing power into thylakoid membranes. *Planta* 236(2): 753-761. <https://doi.org/10.1007/s00425-012-1647-5>

- Mátai A, Hideg É (2017) A comparison of colorimetric assays detecting hydrogen peroxide in leaf extracts. *Analytical Methods* 9(15): 2357-2360.  
<https://doi.org/10.1039/c7ay00126f>
- Mathé C, Barre A, Jourda C, Dunand C (2010) Evolution and expression of class III peroxidases. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 500(1): 58-65.  
<https://doi.org/10.1016/j.abb.2010.04.007>
- Matzke MA, Mosher RA (2014) RNA-directed DNA methylation: an epigenetic pathway of increasing complexity. *Nature Reviews Genetics* 15(6): 394-408.  
<https://doi.org/10.1038/nrg3683>
- Maxwell K, Johnson GN (2000) Chlorophyll fluorescence – a practical guide. *Journal of Experimental Botany* 51(345): 659-668. <https://doi.org/10.1093/jexbot/51.345.659>
- Meister G (2013) Argonaute proteins: functional insights and emerging roles. *Nature Reviews Genetics* 14(7): 447-459. <https://doi.org/10.1038/nrg3462>
- Mhamdi A, Queval G, Chaouch S, Vanderauwera S, Van Breusegem F, Noctor G (2010) Catalase function in plants: a focus on *Arabidopsis* mutants as stress-mimic models. *Journal of Experimental Botany* 61(15): 4197-4220. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq282>
- Mishra SK, Tripp J, Winkelhaus S, Tschiersch B, Theres K, Nover L, Scharf KD (2002) In the complex family of heat stress transcription factors, HsfA1 has a unique role as master regulator of thermotolerance in tomato. *Genes and Development* 16(12): 1555-1567.  
<https://doi.org/10.1101/gad.228802>
- Mittler R (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science* 7(9): 405-410. [https://doi.org/10.1016/s1360-1385\(02\)02312-9](https://doi.org/10.1016/s1360-1385(02)02312-9)
- Mittler R, Finka A, Goloubinoff P (2012) How do plants feel the heat? *Trends in Biochemical Sciences* 37(3): 118-125. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2011.11.007>
- Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M, Van Breusegem F (2004) Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in Plant Science* 9(10): 490-498.  
<https://doi.org/10.1016/j.tplants.2004.08.009>
- Miyake C (2020) Molecular mechanism of oxidation of P700 and suppression of ROS production in photosystem I in response to electron-sink limitations in C3 plants. *Antioxidants* 9(3): 230. MDPI. <https://doi.org/10.3390/antiox9030230>
- Mizoi J, Kanazawa N, Kidokoro S, Takahashi F, Qin F, Morimoto K, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2019) Heat-induced inhibition of phosphorylation of the stress-protective transcription factor DREB2A promotes thermotolerance of *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry* 294(3): 902-917.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.002662>
- Møller IM, Jensen PE, Hansson A (2007) Oxidative modifications to cellular components in plants. *Annual Review of Plant Biology* 58: 459-481.  
<https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.58.032806.103946>
- Morimoto K, Ohama N, Kidokoro S, Mizoi J, Takahashi F, Todaka D, Mogami J, Sato H, Qin F, Kim JS, Fukao Y, Fujiwara M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2017) BPM-CUL3 E3 ligase modulates thermotolerance by facilitating negative regulatory domain-mediated degradation of DREB2A in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114(40): E8528-E8536.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.1704189114>



- Movahedi A, Zhang J, Sun W, Mohammadi K, Almasi Zadeh Yaghti A, Wei H, Wu X, Yin T, Zhuge Q (2018) Functional analyses of *PtRDM1* gene overexpression in poplars and evaluation of its effect on DNA methylation and response to salt stress. *Plant Physiology and Biochemistry* 127: 64-73. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2018.03.011>
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum* 15(3): 473-497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Nakano Y, Asada K (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant and Cell Physiology*, 22(5): 867-880. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a076232>
- Negi P, Rai AN, Suprasanna P (2016) *Moving through the stressed genome*: Emerging regulatory roles for transposons in plant stress response. *Frontiers in Plant Science* 7: 1448. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01448>
- Nover L, Bharti K, Döring P, Mishra SK, Ganguli A, Scharf KD (2001) *Arabidopsis* and the heat stress transcription factor world: how many heat stress transcription factors do we need? *Cell Stress and Chaperones* 6(3): 177. [https://doi.org/10.1379/1466-1268\(2001\)006%3C0177:aathst%3E2.0.co;2](https://doi.org/10.1379/1466-1268(2001)006%3C0177:aathst%3E2.0.co;2)
- Ohama N, Sato H, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki, K (2017) Transcriptional regulatory network of plant heat stress response. *Trends in Plant Science* 22(1): 53-65. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.08.015>
- Okamura MY, Paddock ML, Graige MS, Feher G (2000) Proton and electron transfer in bacterial reaction centers. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* 1458(1), 148-163. [https://doi.org/10.1016/S0005-2728\(00\)00065-7](https://doi.org/10.1016/S0005-2728(00)00065-7)
- op den Camp RGL, Przybyla D, Ochsenbein C, Laloi C, Kim C, Danon A, Wagner D, Hideg É, Göbel C, Feussner I, Nater M, Apel K (2003) Rapid induction of distinct stress responses after the release of singlet oxygen in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 15(10): 2320-2332. <https://doi.org/10.1105/tpc.014662>
- Ou X, Zhuang T, Yin W, Miao Y, Wang B, Zhang Y, Lin X, Xu C, von Wettstein D, Rustgi S, Liu B (2015) DNA methylation changes induced in rice by exposure to high concentrations of the nitric oxide modulator, sodium nitroprusside. *Plant Molecular Biology Reporter* 33(5): 1428-1440. <https://doi.org/10.1007/s11105-014-0843-9>
- Ozden M, Demirel U, Kahraman A (2009) Effects of proline on antioxidant system in leaves of grapevine (*Vitis vinifera* L.) exposed to oxidative stress by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Scientia Horticulturae* 119(2): 163-168. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2008.07.031>
- Passardi F, Cosio C, Penel C, Dunand C (2005) Peroxidases have more functions than a Swiss army knife. *Plant Cell Reports* 24(5): 255-265. <https://doi.org/10.1007/s00299-005-0972-6>
- Perdomo JA, Capó-Bauçà S, Carmo-Silva E, Galmés J (2017) Rubisco and rubisco activase play an important role in the biochemical limitations of photosynthesis in rice, wheat, and maize under high temperature and water deficit. *Frontiers in Plant Science*, 8: 490. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00490>
- Pfaffl MW (2004) Quantification strategies in real-time PCR. *AZ of Quantitative PCR* 1: 89-113.

- Pintard L, Willis JH, Willems A, Johnson JLF, Srayko M, Kurz T, Glaser S, Mains PE, Tyers M, Bowerman B, Peter M (2003) The BTB protein MEL-26 is a substrate-specific adaptor of the CUL-3 ubiquitin-ligase. *Nature* 425(6955): 311-316. <https://doi.org/10.1038/nature01959>
- Popova OV, Dinh HQ, Aufsatz W, Jonak C (2013) The RdDM pathway is required for basal heat tolerance in *Arabidopsis*. *Molecular Plant* 6(2): 396-410. <https://doi.org/10.1093/mp/sst023>
- Pörtner H-O, Roberts DC, Tignor M, Poloczanska ES, Mintenbeck K, Alegría A, Craig M, Langsdorf S, Lösschke S, Möller V, Okem A, Rama B (2022) Climate change 2022: Impacts, adaptation and vulnerability. Contribution of working group II to the sixth assessment report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/9781009325844>
- Putman AK, Contreras GA, Sordillo LM (2021) Isoprostanes in veterinary medicine: Beyond a biomarker. *Antioxidants* 10(2): 1-16. <https://doi.org/10.3390/antiox10020145>
- Qi Y, Wang H, Zou Y, Liu C, Liu Y, Wang Y, Zhang W (2011) Over-expression of mitochondrial heat shock protein 70 suppresses programmed cell death in rice. *FEBS Letters* 585(1): 231-239. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.11.051>
- Qin D, Wu H, Peng H, Yao Y, Ni Z, Li Z, Zhou C, Sun Q (2008) Heat stress-responsive transcriptome analysis in heat susceptible and tolerant wheat (*Triticum aestivum* L.) by using Wheat Genome Array. *BMC Genomics* 9: 1-19. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-432>
- Qirat M, Shahbaz M, Perveen S (2018) Beneficial role of foliar-applied proline on carrot (*Daucus carota* L.) under saline conditions. *Pakistan Journal of Botany* 50(5): 1735-1744.
- Qu AL, Ding YF, Jiang Q, Zhu C (2013) Molecular mechanisms of the plant heat stress response. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 432(2): 203-207. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.01.104>
- Rajametov SN, Yang EY, Cho MC, Chae SY, Jeong HB, Chae WB (2021) Heat-tolerant hot pepper exhibits constant photosynthesis via increased transpiration rate, high proline content and fast recovery in heat stress condition. *Scientific Reports* 11(1): 14328. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-93697-5>
- Ramakrishnan M, Papolu PK, Satish L, Vinod KK, Wei Q, Sharma A, Emamverdian A, Zou LH, Zhou M (2022) Redox status of the plant cell determines epigenetic modifications under abiotic stress conditions and during developmental processes. *Journal of Advanced Research* 42: 99-116. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2022.04.007>
- Ramel F, Birtic S, Ginies C, Soubigou-Taconnat L, Triantaphylidès C, Havaux M (2012) Carotenoid oxidation products are stress signals that mediate gene responses to singlet oxygen in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109(14): 5535-5540. <https://doi.org/10.1073/pnas.1115982109>
- Rhoads DM, Umbach AL, Subbaiah CC, Siedow JN (2006) Mitochondrial reactive oxygen species. Contribution to oxidative stress and interorganellar signaling. *Plant Physiology* 141(2): 357-366. <https://doi.org/10.1104/pp.106.079129>

- Ritchie GA (2005) Chlorophyll fluorescence: What is it and what do the numbers mean. U: Riley LE, Dumroese RK, Landis TD (ur.) National Proceedings: Forest and Conservation Nursery Associations-2005. Fort Collins, CO: U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Rocky Mountain Research Station, 34-43.
- Rizhsky L, Hallak-Herr E, Van Breusegem F, Rachmilevitch S, Barr JE, Rodermel S, Inzé D, Mittler R (2002) Double antisense plants lacking ascorbate peroxidase and catalase are less sensitive to oxidative stress than single antisense plants lacking ascorbate peroxidase or catalase. *Plant Journal* 32(3): 329-342. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2002.01427.x>
- Rizhsky L, Liang H, Shuman J, Shulaev V, Davletova S, Mittler R (2004) When defense pathways collide. The response of *Arabidopsis* to a combination of drought and heat stress. *Plant Physiology* 134(4): 1683-1696. <https://doi.org/10.1104/pp.103.033431>
- Rodríguez M, Canales E, Borrás-Hidalgo O (2005) Molecular aspects of abiotic stress in plants. *Biocnología Aplicada* 22(1): 1-10.
- Rosenwasser S, Rot I, Sollner E, Meyer AJ, Smith Y, Leviatan N, Fluhr R, Friedman H (2011) Organelles contribute differentially to reactive oxygen species-related events during extended darkness. *Plant Physiology* 156(1): 185-201. <https://doi.org/10.1104/pp.110.169797>
- Sadanandom A, Bailey M, Ewan R, Lee J, Nelis S (2012) The ubiquitin-proteasome system: central modifier of plant signalling. *New Phytologist* 196(1): 13-28. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2012.04266.x>
- Sadeghipour O (2020) Cadmium toxicity alleviates by seed priming with proline or glycine betaine in cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.). *Egyptian Journal of Agronomy* 42(2), 163-170. <https://doi.org/10.21608/agro.2020.23667.1204>
- Sage RF, Way DA, Kubien DS (2008) Rubisco, Rubisco activase, and global climate change. *Journal of Experimental Botany* 59(7): 1581-1595. <https://doi.org/10.1093/jxb/ern053>
- Sagi M, Fluhr R (2006) Production of reactive oxygen species by plant NADPH oxidases. *Plant Physiology* 141(2): 336-340. <https://doi.org/10.1104/pp.106.078089>
- Sajid M, Rashid B, Ali Q, Husnain T (2018) Mechanisms of heat sensing and responses in plants. It is not all about Ca<sup>2+</sup> ions. *Biologia Plantarum* 62: 409-420. <https://doi.org/10.1007/s10535-018-0795-2>
- Sakuma Y, Maruyama K, Qin F, Osakabe Y, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2006) Dual function of an *Arabidopsis* transcription factor DREB2A in water-stress-responsive and heat-stress-responsive gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103(49): 18822-18827. <https://doi.org/10.1073/pnas.0605639103>
- Sánchez-Rodríguez E, Moreno DA, Ferreres F, Rubio-Wilhelmi MDM, Ruiz JM (2011) Differential responses of five cherry tomato varieties to water stress: Changes on phenolic metabolites and related enzymes. *Phytochemistry* 72(8): 723-729. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2011.02.011>
- Sandalio LM, Rodríguez-Serrano M, Romero-Puertas MC, del Río LA (2013) Role of peroxisomes as a source of reactive oxygen species (ROS) signaling molecules. U: del Río LA (ur.) Peroxisomes and their key role in cellular signaling and metabolism. Springer Dordrecht, 231-255. <https://doi.org/10.1007/978-94-007-6889-5>

- Scandalios JG (1993) Oxygen stress and superoxide dismutases. *Plant Physiology* 101(1): 7-12. <https://doi.org/10.1104%2Fpp.101.1.7>
- Scharf KD, Berberich T, Ebersberger I, Nover L (2012) The plant heat stress transcription factor (Hsf) family: Structure, function and evolution. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms* 1819(2): 104-119. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2011.10.002>
- Schimke RT (1973) Control of enzyme levels in mammalian tissues. U: Meister A (ur.) *Advances in enzymology and related areas of molecular biology*. John Wiley and Sons, 135-188.
- Schramm F, Larkindale J, Kiehlmann E, Ganguli A, English G, Vierling E, von Koskull-Döring P (2008) A cascade of transcription factor DREB2A and heat stress transcription factor HsfA3 regulates the heat stress response of Arabidopsis. *Plant Journal* 53(2): 264-274. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03334.x>
- Schreiber U, Bilger W, Neubauer C (1995) Chlorophyll fluorescence as a noninvasive indicator for rapid assessment of in vivo photosynthesis. U: Schulze ED, Caldwell MM (ur.) *Ecophysiology of photosynthesis*. Springer, 49-70. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-79354-7>
- Sehar Z, Gautam H, Masood A, Khan NA (2023) Ethylene- and proline-dependent regulation of antioxidant enzymes to mitigate heat stress and boost photosynthetic efficacy in wheat plants. *Journal of Plant Growth Regulation* 42(5): 2683-2697. <https://doi.org/10.1007/s00344-022-10737-8>
- Seta A, Tabara M, Nishibori Y, Hiraguri A, Ohkama-Ohtsu N, Yokoyama T, Hara S, Yoshida K, Hisabori T, Fukudome A, Koiwa H, Moriyama H, Takahashi N, Fukuhara T (2017) Post-translational regulation of the dicing activities of Arabidopsis DICER-LIKE 3 and 4 by inorganic phosphate and the redox state. *Plant and Cell Physiology* 58(3): 485-495. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcw226>
- Sgobba A, Paradiso A, Dipierro S, De Gara L, de Pinto MC (2015) Changes in antioxidants are critical in determining cell responses to short- and long-term heat stress. *Physiologia Plantarum* 153(1): 68-78. <https://doi.org/10.1111/ppl.12220>
- Shah NH, Paulsen GM (2003). Interaction of drought and high temperature on photosynthesis and grain-filling of wheat. *Plant and Soil* 257: 219-226. <https://doi.org/10.1023/A:1026237816578>
- Sharma P, Jha AB, Dubey RS, Pessarakli M (2012) Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *Journal of Botany* 2012: 217037. <https://doi.org/10.1155/2012/217037>
- Sharma S, Joshi J, Kataria S, Verma SK, Chatterjee S, Jain M, Pathak K, Rastogi A, Brestic M (2020) Regulation of the Calvin cycle under abiotic stresses: an overview. U: Tripathi DK, Singh VP, Chauhan DK, Sharma S, Prasad SM, Dubey NK, Ramawat N (ur.) *Plant life under changing environment: responses and management*. Elsevier, 681-717. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818204-8.00030-8>
- Sherin G, Aswathi KPR, Puthur JT (2022) Photosynthetic functions in plants subjected to stresses are positively influenced by priming. *Plant Stress* 4: 100079. <https://doi.org/10.1016/j.stress.2022.100079>

- Shi Q, Zhu Z (2008) Effects of exogenous salicylic acid on manganese toxicity, element contents and antioxidative system in cucumber. *Environmental and Experimental Botany* 63: 317-326. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2007.11.003>
- Shirdelmoghanloo H, Lohraseb I, Rabie HS, Brien C, Parent B, Collins NC (2016) Heat susceptibility of grain filling in wheat (*Triticum aestivum* L.) linked with rapid chlorophyll loss during a 3-day heat treatment. *Acta Physiologiae Plantarum* 38(8): 1-11. <https://doi.org/10.1007/s11738-016-2208-5>
- Singh J, Mishra V, Wang F, Huang HY, Pikaard CS (2019) Reaction mechanisms of Pol IV, RDR2, and DCL3 drive RNA channeling in the siRNA-directed DNA methylation pathway. *Molecular Cell* 75(3): 576-589. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.07.008>
- Singh P, Yekondi S, Chen PW, Tsai CH, Yu CW, Wu K, Zimmerli L (2014) Environmental history modulates *Arabidopsis* pattern-triggered immunity in a HISTONE ACETYLTRANSFERASE1-dependent manner. *The Plant Cell* 26(6): 2676-2688. <https://doi.org/10.1105/tpc.114.123356>
- Song YY, Lu Y (2015) Decision tree methods: applications for classification and prediction. *Shanghai Archives of Psychiatry* 27(2): 130-135. <https://doi.org/10.11919/j.issn.1002-0829.215044>
- Spreitzer RJ, Salvucci ME (2002) RUBISCO: Structure, regulatory interactions, and possibilities for a better enzyme. *Annual Review of Plant Biology* 53: 449-475. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.53.100301.135233>
- Srivastava S, Dubey RS (2011) Manganese-excess induces oxidative stress, lowers the pool of antioxidants and elevates activities of key antioxidative enzymes in rice seedlings. *Plant Growth Regulation* 64(1): 1-16. <https://doi.org/10.1007/s10725-010-9526-1>
- Staller P, Sulitkova J, Lisztwan J, Moch H, Oakeley EJ, Krek W (2003) Chemokine receptor CXCR4 downregulated by von Hippel-Lindau tumour suppressor pVHL. *Nature* 425(6955): 307-311. <https://doi.org/10.1038/nature01874>
- Staples RC, Stahmann MA (1964) Changes in proteins and several enzymes in susceptible bean leaves after infection by the bean rust fungus. *Phytopathology* 54(7): 760-764.
- Stefanov D, Petkova V, Denev ID (2011) Screening for heat tolerance in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) lines and cultivars using *JIP*-test. *Scientia Horticulturae* 128(1): 1-6. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2010.12.003>
- Stirbet A, Lazár D, Kromdijk J, Govindjee (2018) Chlorophyll *a* fluorescence induction: can just a one-second measurement be used to quantify abiotic stress responses?. *Photosynthetica* 56(1): 86-104. <https://doi.org/10.1007/s11099-018-0770-3>
- Strasser RJ, Srivastava A, Tsimilli-Michael M (2000) The fluorescence transient as a tool to characterize and screen photosynthetic samples. U: Yunus M, Pathre U, Mohanty P (ur.) *Probing photosynthesis: mechanisms, regulation and adaptation*. Taylor and Francis Group, LLC, 445-483.
- Strasser RJ, Tsimilli-Michael M, Srivastava A (2004) Analysis of the chlorophyll *a* fluorescence transient. U: Papageorgiou GC, Govindjee (ur.) *Chlorophyll a fluorescence: a signature of photosynthesis*. Springer Dordrecht, 321-362.
- Škiljaica A, Jagić M, Vuk T, Lejak Levanić D, Bauer N, Markulin L (2022). Evaluation of reference genes for RT-qPCR gene expression analysis in *Arabidopsis thaliana* exposed to elevated temperatures. *Plant Biology* 24(2): 367-379. <https://doi.org/10.1111/plb.13382>

- Škiljaica A, Lechner E, Jagić M, Majsec K, Malenica N, Genschik P, Bauer N (2020) The protein turnover of Arabidopsis BPM1 is involved in regulation of flowering time and abiotic stress response. *Plant Molecular Biology* 102: 359-372. <https://doi.org/10.1007/s11103-019-00947-2>
- Takahashi MA, Asada K (1983). Superoxide anion permeability of phospholipid membranes and chloroplast thylakoids. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 226(2): 558-566. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(83\)90325-9](https://doi.org/10.1016/0003-9861(83)90325-9)
- Tan M (2010) Analysis of DNA methylation of maize in response to osmotic and salt stress based on methylation-sensitive amplified polymorphism. *Plant Physiology and Biochemistry* 48(1): 21-26. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2009.10.005>
- Teixeira FK, Menezes-Benavente L, Margis R, Margis-Pinheiro M (2004) Analysis of the molecular evolutionary history of the ascorbate peroxidase gene family: inferences from the rice genome. *Journal of Molecular Evolution* 59: 761-770. <https://doi.org/10.1007/s00239-004-2666-z>
- Tiwari M, Sharma D, Trivedi PK (2014) Artificial microRNA mediated gene silencing in plants: progress and perspectives. *Plant Molecular Biology* 86: 1-18. <https://doi.org/10.1007/s11103-014-0224-7>
- Tiwari S, Tiwari S, Singh M, Singh A, Prasad SM (2017) Generation mechanisms of reactive oxygen species in the plant cell: an overview. U: Singh VP, Singh S, Tripathi DK, Prasad SM, Chauhan DK (ur.) *Reactive oxygen species in plants: boon or bane-revisiting the role of ROS*. John Wiley and Sons Ltd, 1-22. <https://doi.org/10.1002/9781119324928.ch1>
- Toh S, Imamura A, Watanabe A, Nakabayashi K, Okamoto M, Jikumaru Y, Hanada A, Aso Y, Ishiyama K, Tamura N, Iuchi S, Kobayashi M, Yamaguchi S, Kamiya Y, Nambara E, Kawakami N (2008) High temperature-induced abscisic acid biosynthesis and its role in the inhibition of gibberellin action in Arabidopsis seeds. *Plant Physiology* 146(3): 1368-1385. <https://doi.org/10.1104/pp.107.113738>
- Tokić M (2024) The role of *de novo* DNA methylation in plant response to elevated temperature. *Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet*.
- Tonhati R, Mello SC, Momesso P, Pedroso RM (2020) L-proline alleviates heat stress of tomato plants grown under protected environment. *Scientia Horticulturae* 268: 109370. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2020.109370>
- Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M (2006) Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions* 160(1): 1-40. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2005.12.009>
- van Doorn WG, Ketsa S (2014) Cross reactivity between ascorbate peroxidase and phenol (guaiacol) peroxidase. *Postharvest Biology and Technology* 95: 64-69. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2014.04.002>
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome biology* 3(7): 1-12. <https://doi.org/10.1186/gb-2002-3-7-research0034>
- Verbruggen N, Hermans C (2008) Proline accumulation in plants: a review. *Amino Acids* 35(4): 753-759. <https://doi.org/10.1007/s00726-008-0061-6>

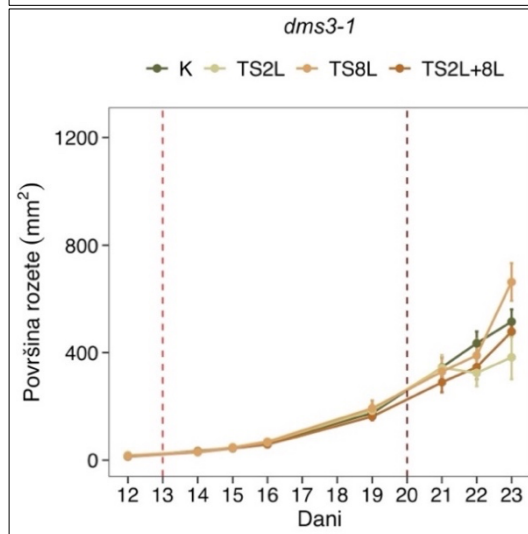
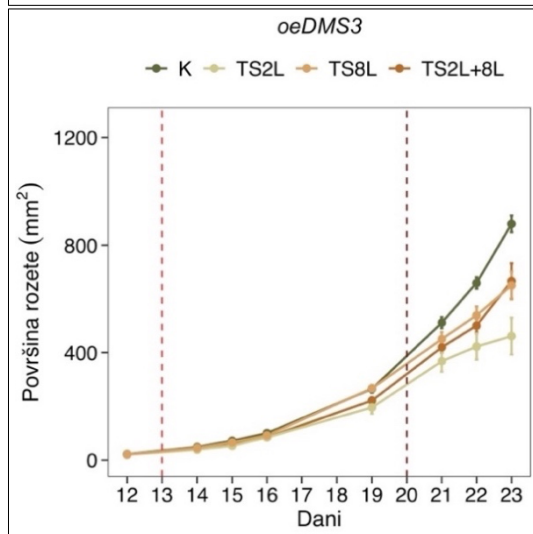
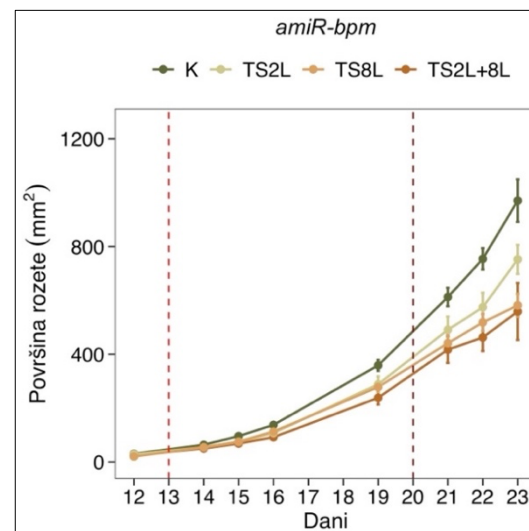
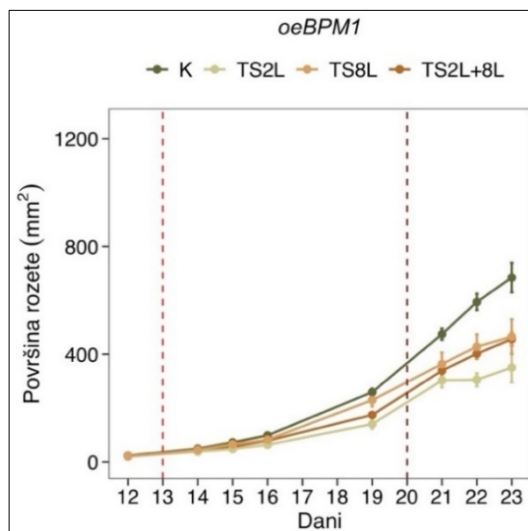
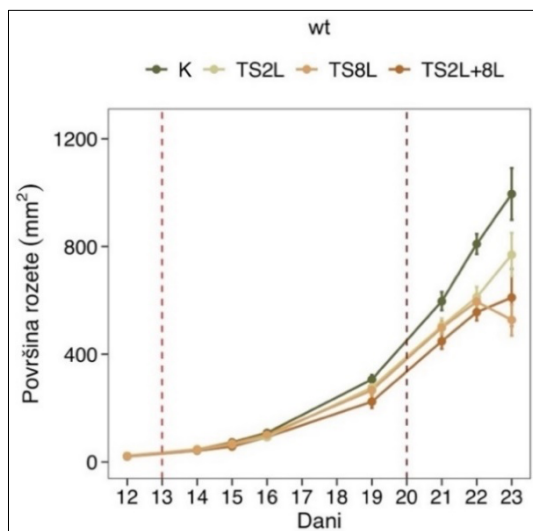
- Vitko S, Bauer N, Leljak-Levanić D, Vidaković-Cifrek Ž (2022) Effect of moderate heat stress on *Arabidopsis thaliana* with modified *BPMs* expression. *Acta Botanica Croatica* 81(2): 140-148. <https://doi.org/10.37427/botcro-2022-011>
- Volkov RA, Panchuk II, Mullineaux PM, Schöffl F (2006). Heat stress-induced H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is required for effective expression of heat shock genes in *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology* 61: 733-746. <https://doi.org/10.1007/s11103-006-0045-4>
- Wahid A, Close TJ (2007) Expression of dehydrins under heat stress and their relationship with water relations of sugarcane leaves. *Biologia Plantarum* 51(1): 104-109. <https://doi.org/10.1007/s10535-007-0021-0>
- Wahid A, Gelani S, Ashraf M, Foolad MR (2007) Heat tolerance in plants: An overview. *Environmental and Experimental Botany* 61(3): 199-223. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2007.05.011>
- Wang L, Guo Y, Jia L, Chu H, Zhou S, Chen K, Wu D, Zhao L (2014) Hydrogen peroxide acts upstream of nitric oxide in the heat shock pathway in *Arabidopsis* seedlings. *Plant Physiology* 164(4): 2184-2196. <https://doi.org/10.1104/pp.113.229369>
- Wang L, Ma KB, Lu ZG, Ren SX, Jiang HR, Cui JW, Chen G, Teng NJ, Lam HM, Jin B (2020) Differential physiological, transcriptomic and metabolomic responses of *Arabidopsis* leaves under prolonged warming and heat shock. *BMC Plant Biology* 20(1): 1-15. <https://doi.org/10.1186/s12870-020-2292-y>
- Wang W, Vinocur B, Shoseyov O, Altman A (2004) Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *Trends in Plant Science* 9(5): 244-252. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2004.03.006>
- Wang Y, Dai Y, Tao X, Wang JZ, Cheng HY, Yang H, Ma XR (2016) Heat shock factor genes of tall fescue and perennial ryegrass in response to temperature stress by RNA-seq analysis. *Frontiers in Plant Science* 6: 1226. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.01226>
- Wassie M, Zhang W, Zhang Q, Ji K, Chen L (2019) Effect of heat stress on growth and physiological traits of alfalfa (*Medicago sativa* L.) and a comprehensive evaluation for heat tolerance. *Agronomy* 9(10): 597. <https://doi.org/10.3390/agronomy9100597>
- Weber H, Hellmann H (2009) *Arabidopsis thaliana* BTB/POZ-MATH proteins interact with members of the ERF/AP2 transcription factor family. *FEBS Journal* 276(22): 6624-6635. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2009.07373.x>
- Wei D, Zhang T, Wang B, Zhang H, Ma M, Li S, Chen THH, Brestic M, Liu Y, Yang X (2022) Glycinebetaine mitigates tomato chilling stress by maintaining high-cyclic electron flow rate of photosystem I and stability of photosystem II. *Plant Cell Reports* 41(4): 1087-1101. <https://doi.org/10.1007/s00299-022-02839-0>
- Wellburn AR (1994) The spectral determination of chlorophylls *a* and *b*, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *Journal of Plant Physiology* 144(3): 307-313. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(11\)81192-2](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(11)81192-2)
- Wongpalee SP, Liu S, Gallego-Bartolomé J, Leitner A, Aebersold R, Liu W, Yen L, Nohales MA, Kuo PH, Vashisht AA, Wohlschlegel JA, Feng S, Kay SA, Zhou ZH, Jacobsen SE (2019) CryoEM structures of *Arabidopsis* DDR complexes involved in RNA-directed DNA methylation. *Nature Communications* 10(1): 3916. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11759-9>

- Xia Q, Tang H, Fu L, Tan J, Govindjee G, Guo Y (2023) Determination of  $F_v/F_m$  from chlorophyll *a* fluorescence without dark adaptation by an LSSVM model. *Plant Phenomics* 5: 0034. <https://doi.org/10.34133/plantphenomics.0034>
- Xiu Y, Iqbal A, Zhu C, Wu G, Chang Y, Li N, Cao Y, Zhang W, Zeng H, Chen S, Wang H (2016) Improvement and transcriptome analysis of root architecture by overexpression of *Fraxinus pennsylvanica* DREB2A transcription factor in *Robinia pseudoacacia* L. “Idaho“. *Plant Biotechnology Journal* 14(6): 1456-1469. <https://doi.org/10.1111/pbi.12509>
- Xu FQ, Xue HW (2019) The ubiquitin-proteasome system in plant responses to environments. *Plant Cell and Environment* 42(10): 2931-2944. <https://doi.org/10.1111/pce.13633>
- Xu PL, Guo YK, Bai JG, Shang L, Wang XJ (2008) Effects of long-term chilling on ultrastructure and antioxidant activity in leaves of two cucumber cultivars under low light. *Physiologia Plantarum* 132(4): 467-478. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2007.01036.x>
- Xuan Y, Zhou S, Wang L, Cheng Y, Zhao L (2010) Nitric oxide functions as a signal and acts upstream of AtCaM3 in thermotolerance in *Arabidopsis* seedlings. *Plant Physiology* 153(4): 1895-1906. <https://doi.org/10.1104/pp.110.160424>
- Yadav S, Gill SS, Passricha N, Gill R, Badhwar P, Anjum NA, francisco JBG, Tuteja N (2019) Genome-wide analysis and transcriptional expression pattern-assessment of superoxide dismutase (SOD) in rice and *Arabidopsis* under abiotic stresses. *Plant Gene* 17: 100165. <https://doi.org/10.1016/j.plgene.2018.10.001>
- Yamada K, Fukao Y, Hayashi M, Fukazawa M, Suzuki I, Nishimura M (2007) Cytosolic HSP90 regulates the heat shock response that is responsible for heat acclimation in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry* 282(52): 37794-37804. <https://doi.org/10.1074/jbc.M707168200>
- Yoshida T, Ohama N, Nakajima J, Kidokoro S, Mizoi J, Nakashima K, Maruyama K, Kim JM, Seki M, Todaka D, Osakabe Y, Sakuma Y, Schöffl F, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2011) *Arabidopsis* HsfA1 transcription factors function as the main positive regulators in heat shock-responsive gene expression. *Molecular Genetics and Genomics* 286: 321-332. <https://doi.org/10.1007/s00438-011-0647-7>
- Zhai J, Bischof S, Wang H, Feng S, Lee TF, Teng C, Chen X, Park SY, Liu L, Gallego-Bartolome J, Liu W, Henderson IR, Meyers BC, Ausin I, Jacobsen SE (2015) A one precursor one siRNA model for pol IV-dependent siRNA biogenesis. *Cell* 163(2): 445–455. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.09.032>
- Zhang CY, Wang NN, Zhang YH, Feng QZ, Yang CW, Liu B (2013) DNA methylation involved in proline accumulation in response to osmotic stress in rice (*Oryza sativa*). *Genetics and Molecular Research* 12(2): 1269-1277. <https://doi.org/10.4238/2013.april.17.5>
- Zhang H, Lang Z, Zhu JK (2018) Dynamics and function of DNA methylation in plants. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 19(8): 489-506. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0016-z>
- Zhao J, Lu Z, Wang L, Jin B (2021) Plant responses to heat stress: Physiology, transcription, noncoding RNAs, and epigenetics. *International Journal of Molecular Sciences* 22(1): 1-14. <https://doi.org/10.3390/ijms22010117>

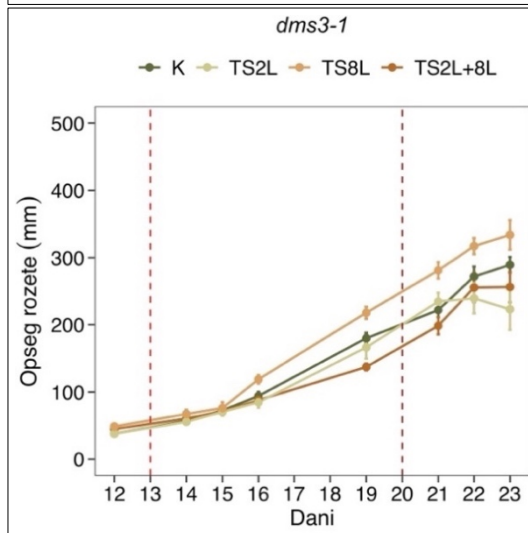
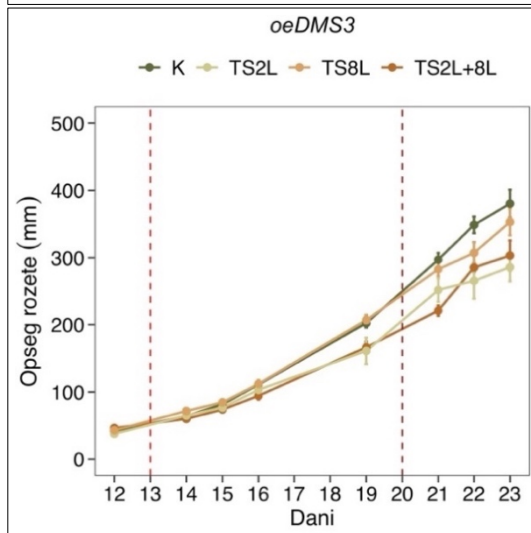
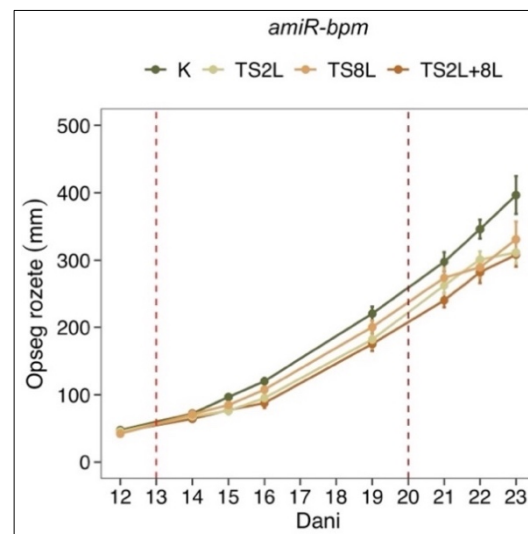
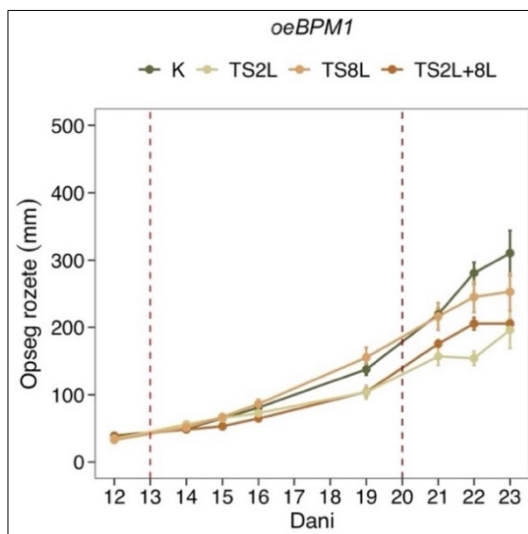
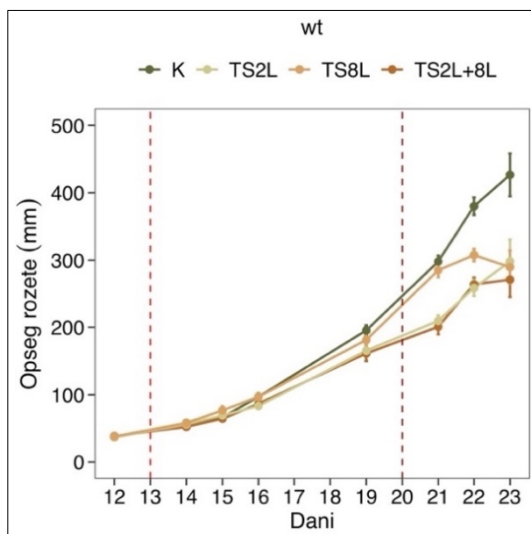


- Zhao L, Huang Y, Hu Y, He X, Shen W, Liu C, Ruan Y (2013). Phylogenetic analysis of *Brassica rapa* MATH-domain proteins. *Current Genomics* 14(3): 214-223. <https://doi.org/10.2174/1389202911314030007>
- Zhong S, Xu Y, Yu C, Zhang X, Li L, Ge H, Ren G, Wang Y, Ma J, Zheng Y, Zheng B (2019) Anaphase-promoting complex/cyclosome regulates RdDM activity by degrading DMS3 in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 116(9): 3899-3908. <https://doi.org/10.1073/pnas.1816652116>
- Zhong X, Wang ZQ, Xiao R, Wang Y, Xie Y, Zhou X (2017) iTRAQ analysis of the tobacco leaf proteome reveals that RNA-directed DNA methylation (RdDM) has important roles in defense against geminivirus-betasatellite infection. *Journal of Proteomics* 152: 88-101. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2016.10.015>
- Zhou J, Zhang Y, Qi J, Chi Y, Fan B, Yu JQ, Chen Z (2014) E3 ubiquitin ligase CHIP and NBR1-mediated selective autophagy protect additively against proteotoxicity in plant stress responses. *PLoS Genetics* 10(1): e1004116. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004116>
- Zhou R, Kjær KH, Rosenqvist E, Yu X, Wu Z, Ottosen CO (2017) Physiological response to heat stress during seedling and anthesis stage in tomato genotypes differing in heat tolerance. *Journal of Agronomy and Crop Science* 203(1): 68-80. <https://doi.org/10.1111/jac.12166>
- Zhou R, Kong L, Yu X, Ottosen CO, Zhao T, Jiang F, Wu Z (2019) Oxidative damage and antioxidant mechanism in tomatoes responding to drought and heat stress. *Acta Physiologiae Plantarum* 41(2): 1-11. <https://doi.org/10.1007/s11738-019-2805-1>
- Zhuang L, Cao W, Wang J, Yu J, Yang Z, Huang B (2018) Characterization and functional analysis of *FaHsfC1b* from *Festuca arundinacea* conferring heat tolerance in *Arabidopsis*. *International Journal of Molecular Sciences* 19(9): 2702. <https://doi.org/10.3390/ijms19092702>
- Zorman M, Štiglic MM, Kokol P, Malčić I (1997) The limitations of decision trees and automatic learning in real world medical decision making. *Journal of Medical Systems* 21(6): 403-415. <https://doi.org/10.1023/A:1022876330390>
- Zushi K, Kajiwara S, Matsuzoe N (2012) Chlorophyll *a* fluorescence OJIP transient as a tool to characterize and evaluate response to heat and chilling stress in tomato leaf and fruit. *Scientia Horticulturae* 148: 39-46. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2012.09.022>
- Živčák M, Brestič M, Olšovská K, Slamka P (2008) Performance index as a sensitive indicator of water stress in *Triticum aestivum* L. *Plant, Soil and Environment* 54(4): 133-139. <https://doi.org/10.17221/392-pse>

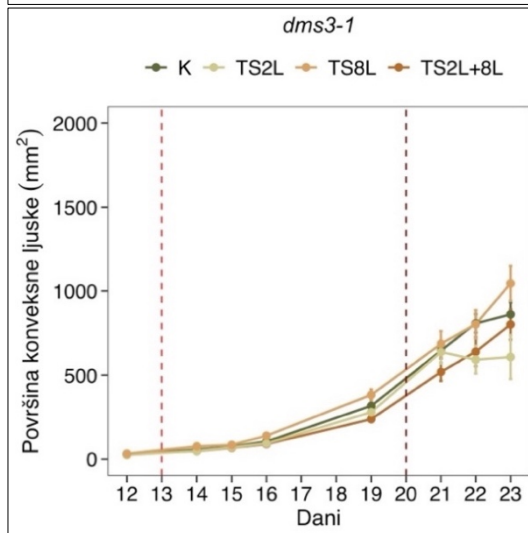
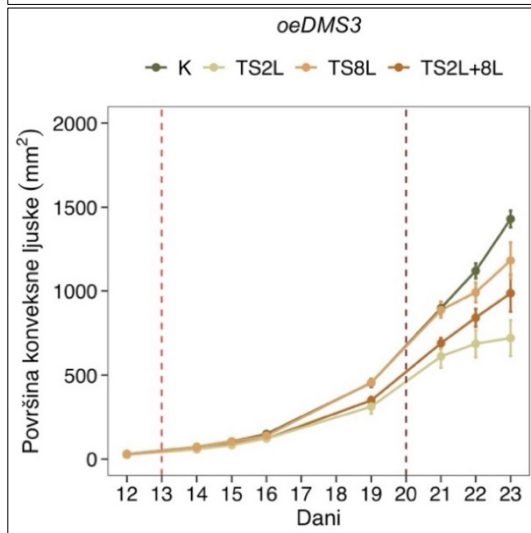
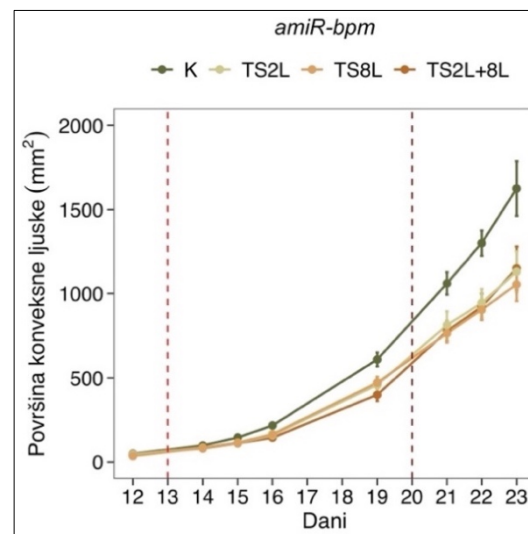
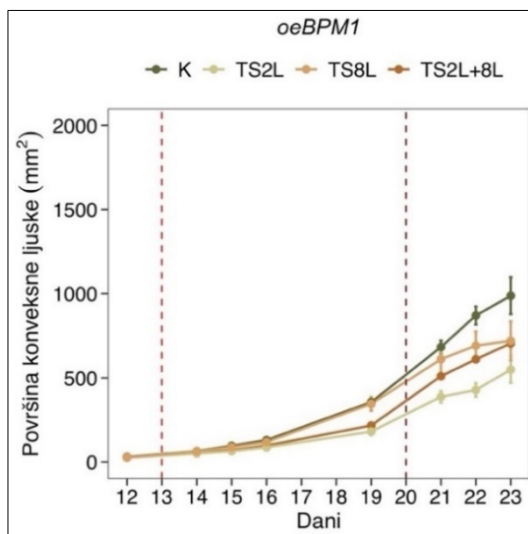
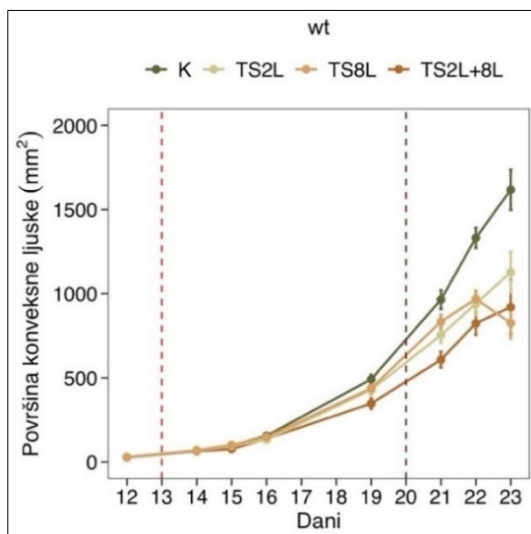
## 8. PRILOZI



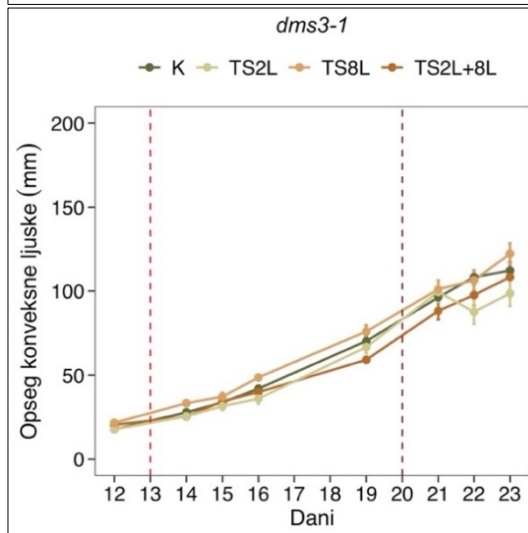
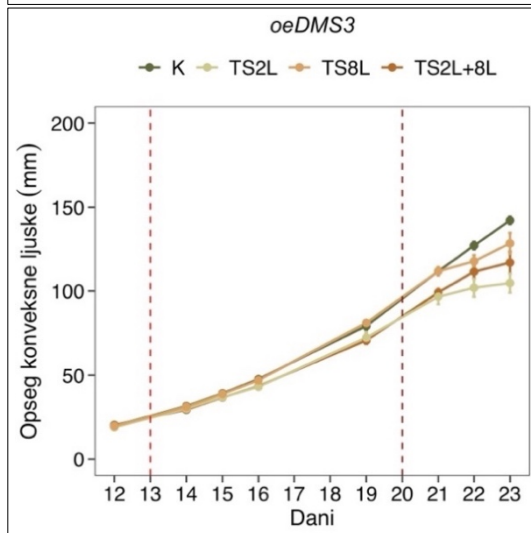
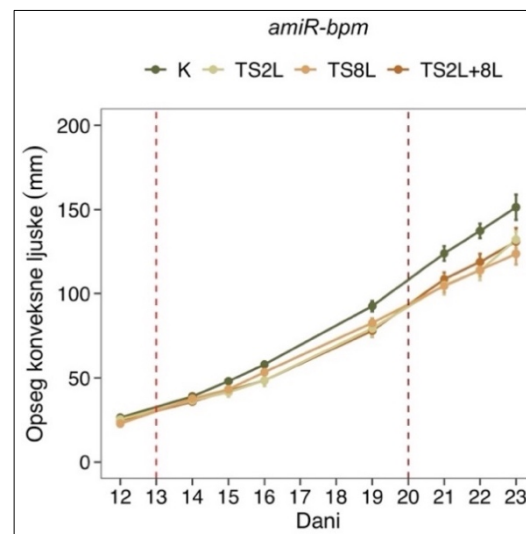
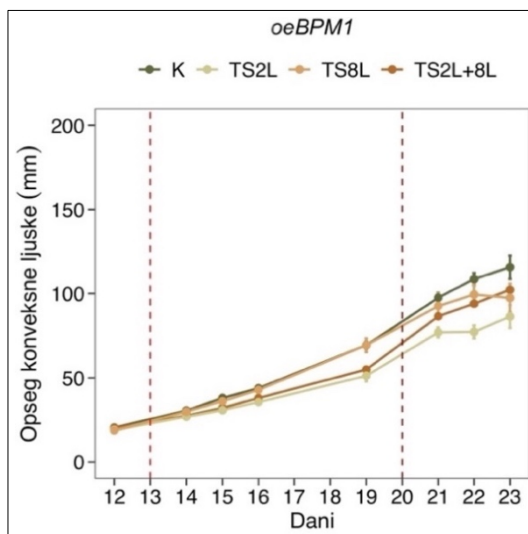
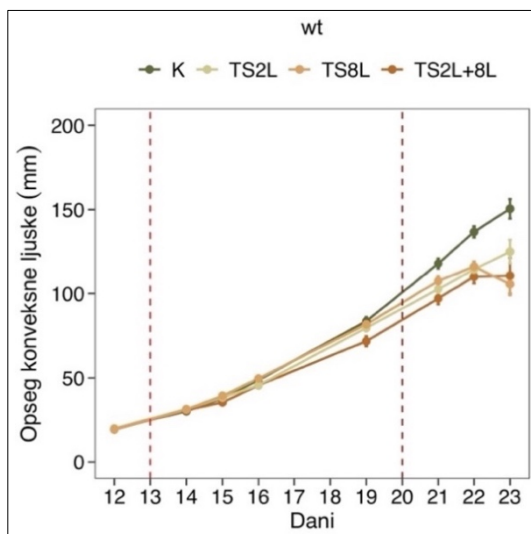
**Prilog 1.** Površina rozete biljaka uročnjaka (*Arabidopsis thaliana*) izloženih temperaturi od 40 °C tijekom šest sati. Istraživane su biljke divljeg tipa, linije s prekomjernom ekspresijom gena *BPM1* (*oeBPM1*), linije sa smanjenom ekspresijom gena *BPM1*, 4, 5 i 6 (*amiR-bpm*), linije s prekomjernom ekspresijom gena *DMS3* (*oeDMS3*) i linije s mutiranim genom *DMS3* (*dms3-1*). Biljke su izložene 40 °C u razvojnom stadiju s dva prava lista (TS2L), osam pravih listova (TS8L) ili u oba stadija (TS2L+8L). Kontrolne skupine (K) svake linije rasle su tijekom pokusa na 24 °C. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost najmanje deset bioloških replika ± standardna pogreška. Crvena okomita crta označava vremensku točku tretmana biljaka u stadiju TS2L, a tamnocrvena u stadiju TS8L.



**Prilog 2.** Opseg rozete biljaka uročnjaka (*Arabidopsis thaliana*) izloženih temperaturi od 40 °C tijekom šest sati. Istraživane su biljke divljeg tipa, linije s prekomjernom ekspresijom gena *BPM1* (*oeBPM1*), linije sa smanjenom ekspresijom gena *BPM1*, 4, 5 i 6 (*amiR-bpm*), linije s prekomjernom ekspresijom gena *DMS3* (*oeDMS3*) i linije s mutiranim genom *DMS3* (*dms3-1*). Biljke su izložene 40 °C u razvojnom stadiju s dva prava lista (TS2L), osam pravih listova (TS8L) ili u oba stadija (TS2L+8L). Kontrolne skupine (K) svake linije rasle su tijekom pokusa na 24 °C. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost najmanje deset bioloških replika ± standardna pogreška. Crvena okomita crta označava vremensku točku tretmana biljaka u stadiju TS2L, a tamnocrvena u stadiju TS8L.



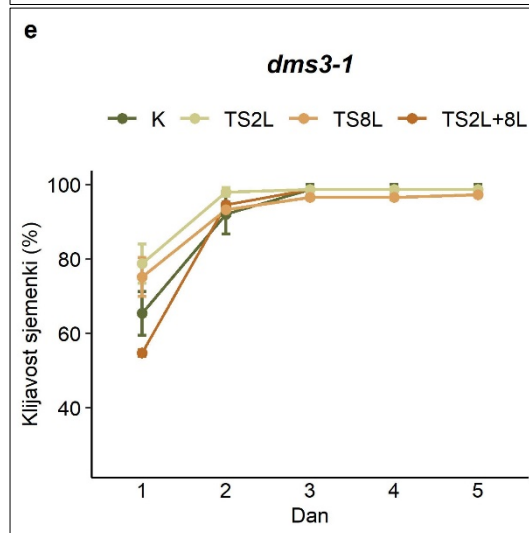
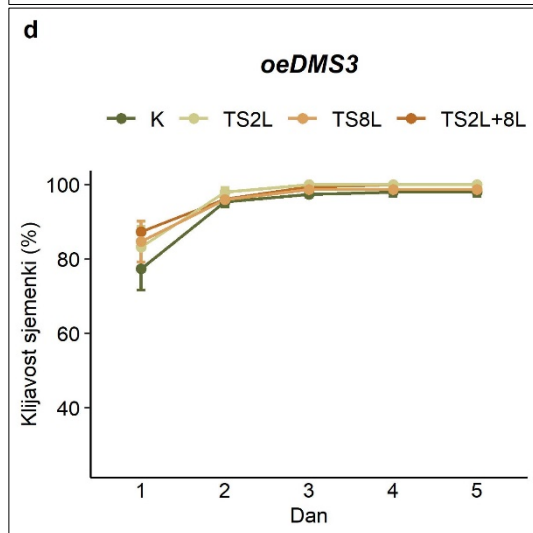
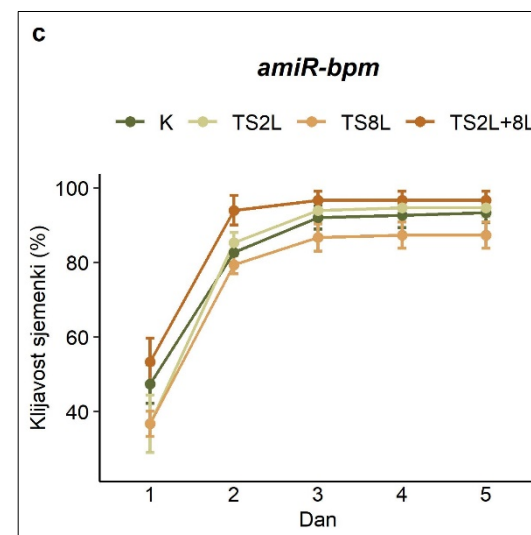
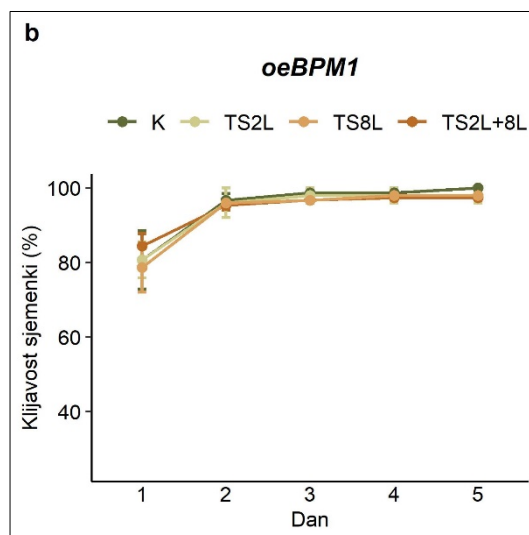
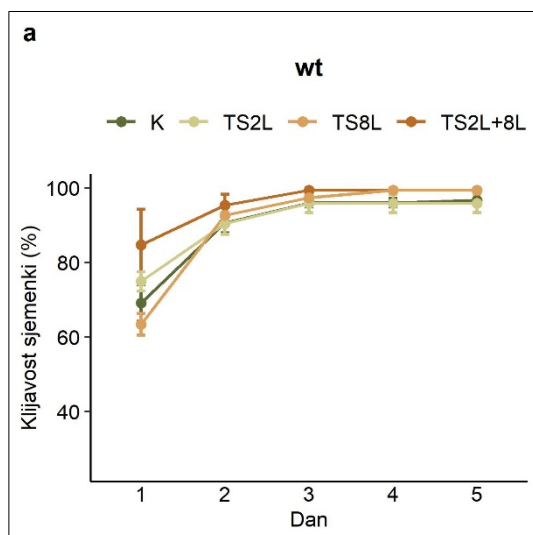
**Prilog 3.** Površina konveksne ljuške biljaka uročnjaka (*Arabidopsis thaliana*) izloženih temperaturi od 40 °C tijekom šest sati. Istraživane su biljke divljeg tipa, linije s prekomjernom ekspresijom gena *BPM1* (*oeBPM1*), linije sa smanjenom ekspresijom gena *BPM1*, 4, 5 i 6 (*amiR-bpm*), linije s prekomjernom ekspresijom gena *DMS3* (*oeDMS3*) i linije s mutiranim genom *DMS3* (*dms3-1*). Biljke su izložene 40 °C u razvojnom stadiju s dva prava lista (TS2L), osam pravih listova (TS8L) ili u oba stadija (TS2L+8L). Kontrolne skupine (K) svake linije rasle su tijekom pokusa na 24 °C. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost najmanje deset bioloških replika ± standardna pogreška. Crvena okomita crta označava vremensku točku tretmana biljaka u stadiju TS2L, a tamnocrvena u stadiju TS8L.



**Prilog 4.** Opseg konveksne ljuške biljaka uročnjaka (*Arabidopsis thaliana*) izloženih temperaturi od 40 °C tijekom šest sati. Istraživane su biljke divljeg tipa, linije s prekomjernom ekspresijom gena *BPM1* (*oeBPM1*), linije sa smanjenom ekspresijom gena *BPM1*, 4, 5 i 6 (*amiR-bpm*), linije s prekomjernom ekspresijom gena *DMS3* (*oeDMS3*) i linije s mutiranim genom *DMS3* (*dms3-1*). Biljke su izložene 40 °C u razvojnom stadiju s dva prava lista (TS2L), osam pravih listova (TS8L) ili u oba stadija (TS2L+8L). Kontrolne skupine (K) svake linije rasle su tijekom pokusa na 24 °C. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost najmanje deset bioloških replika ± standardna pogreška. Crvena okomita crta označava vremensku točku tretmana biljaka u stadiju TS2L, a tamnocrvena u stadiju TS8L.

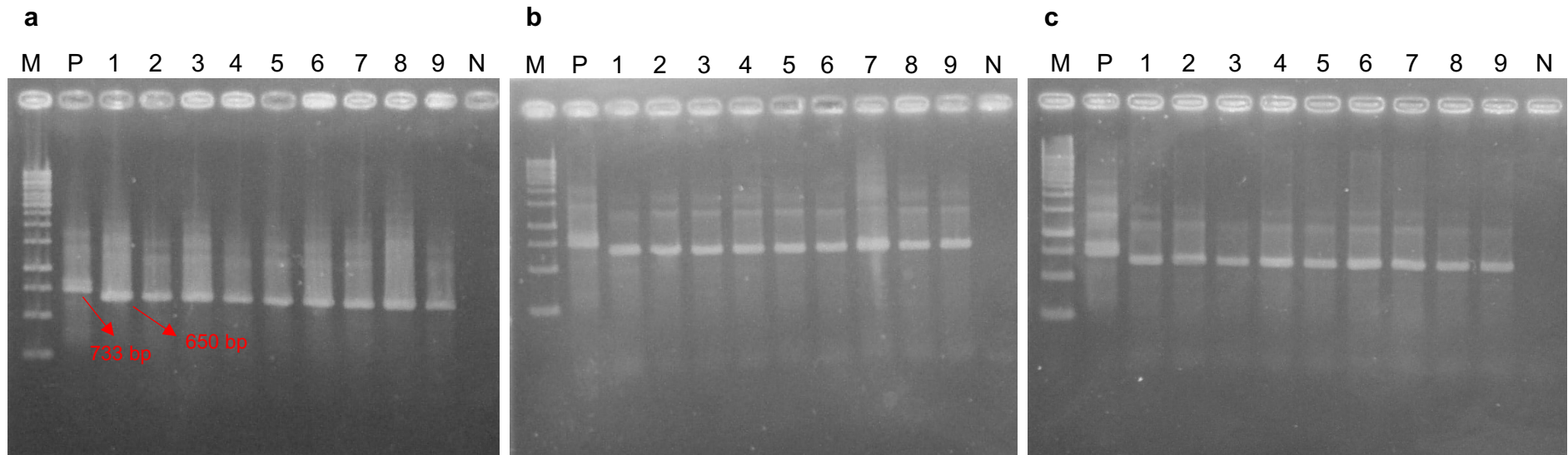
**Prilog 5.** Prikaz točnosti klasifikacije za modele stabla generiranih za svaki dan praćenja morfoloških parametara i svaku istraživanu liniju.

Dan	wt	<i>oeBPM1</i>	<i>amiR-bpm</i>	<i>oeDMS3</i>	<i>dms3-1</i>
13.		tretman u razvojnem stadiju s dva prava lista			
14.	36,36%	80%	46,15%	36,36%	70%
15.	36,36%	76,92%	61,53%	46,67%	46,15%
16.	64,28%	77,77%	70%	44,44%	64,28%
17.		vikend, nije bilo mjerenja			
18.		vikend, nije bilo mjerenja			
19.	23,07%	82,35%	55,55%	60%	62,5%
20.		tretman u razvojnem stadiju s osam pravih listova			
21.	57,89%	58,33%	0%	33,33%	40%
22.	28,57%	35,71%	31,57%	54,54%	13,33%
23.	22,22%	0%	14,28%	30%	20%



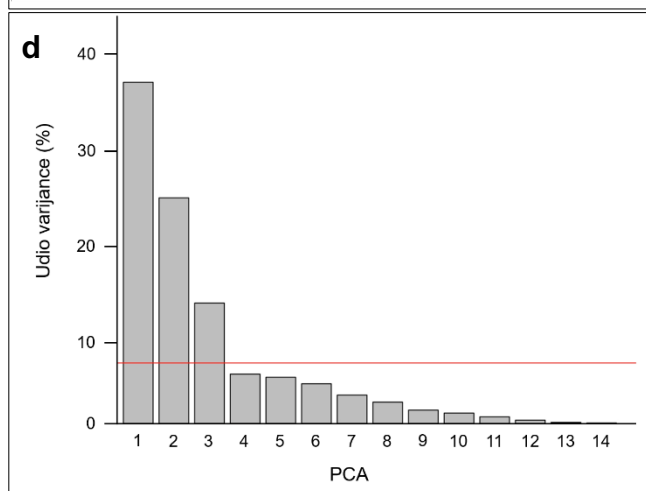
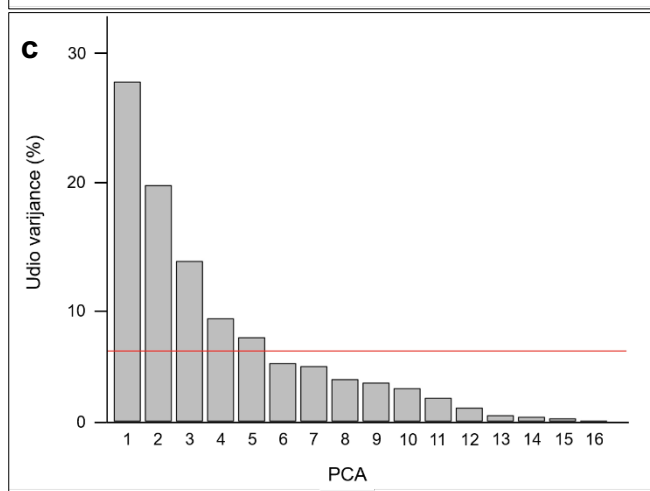
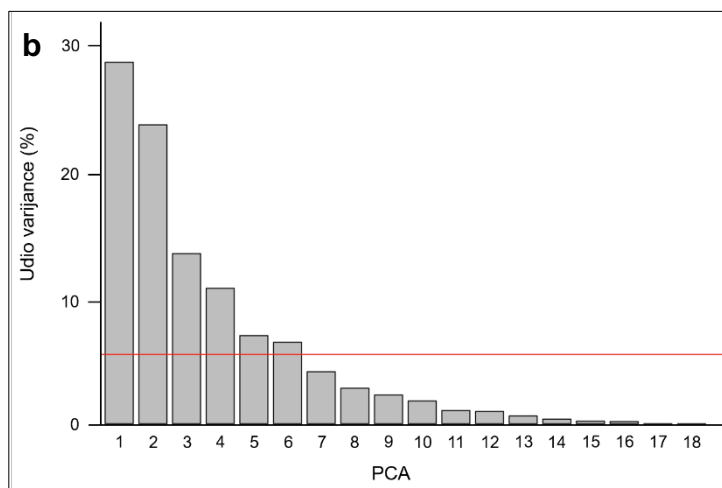
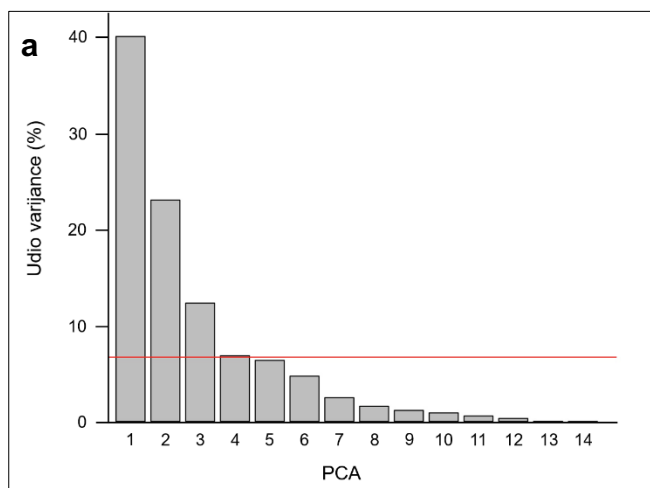
**Prilog 6.** Klijavost sjemenki uročnjaka (*Arabidopsis thaliana*) prikupljenih od biljaka izloženih temperaturi od 40 °C u različitim razvojnim stadijima. Istraživano je pet linija uročnjaka – (a) divlji tip (wt), (b) linija s prekomjernom ekspresijom gena *BPM1* (*oeBPM1*), (c) linija sa smanjenom ekspresijom gena *BPM1*, 4, 5 i 6 (*amiR-bpm*), (d) linija s prekomjernom ekspresijom gena *DMS3* (*oeDMS3*) i (e) linija s mutiranim genom *DMS3* (*dms3-1*). Biljke su izložene 40 °C u razvojnom stadiju s dva prava lista (TS2L), osam pravih listova (TS8L) ili u oba stadija – s dva i osam pravih listova (TS2L+8L). Kontrolne skupine (K) svake linije rasle su tijekom pokusa na 24 °C. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost tri biološke replike ± standardna pogreška.



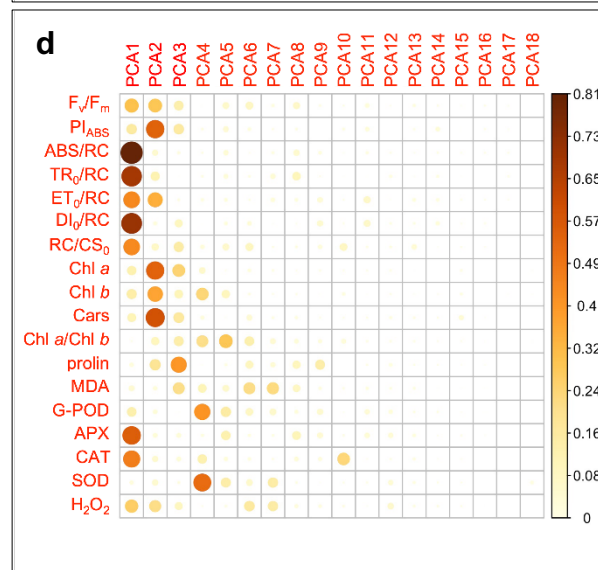
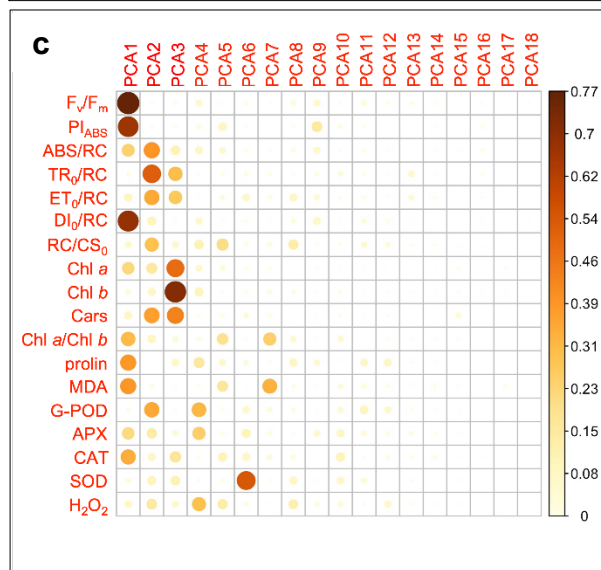
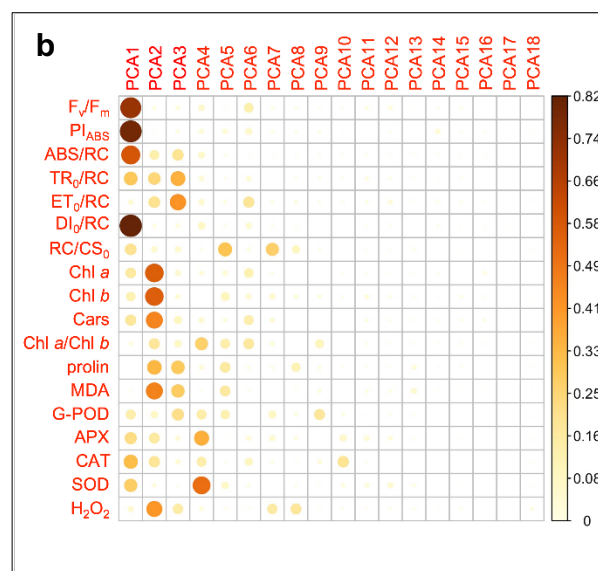
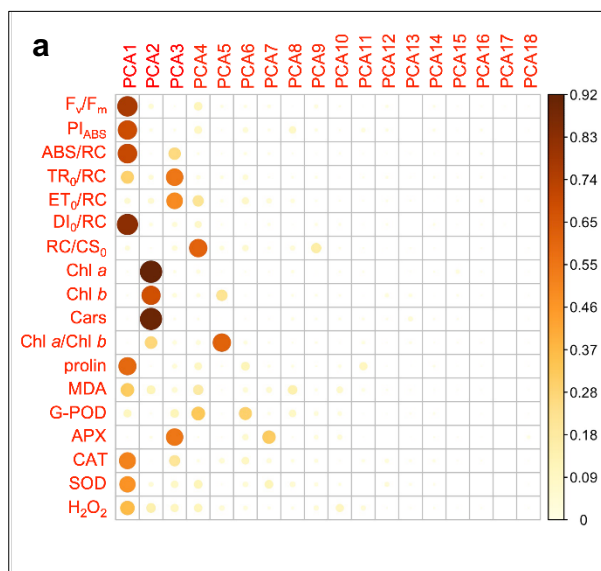


**Prilog 7.** Provjera čistoće sintetizirane cDNA u (a) prvoj, (b) drugoj i (c) trećoj biološkoj replici. Veličina fragmenta gena *ACT3* dobivenog umnažanjem genomske DNA iznosi 733 parova baza (bp), a fragmenta dobivenog umnažanjem cDNA 650 bp. M – biljeg molekularnih masa, P – pozitivna kontrola, 1 – wt K, 2 – wt TS, 3 – wt OPO, 4 – *oeBPM1* K, 5 – *oeBPM1* TS, 6 – *oeBPM1* OPO, 7 – *amiR-bpm* K, 8 – *amiR-bpm* TS, 9 – *amiR-bpm* OPO, N – negativna kontrola.





**Prilog 8.** Prikaz udjela varijanci koje doprinose objašnjenju uočenih razlika u analizi glavnih komponenti (PCA) parametara mjenjenih u klijanaca s promijenjenom ekspresijom gena *BPM* i *DMS3*. Komponente koje prelaze prag značajnosti, označen crvenom linijom, smatraju se značajnima za analizu. Obuhvaćeni su podaci za klijance s promijenjenom ekspresijom gena *BPM* prikupljene u dvije vremenske točke: (a) odmah nakon izlaganja temperaturi od 37 °C, i (b) nakon 24 sata oporavka. Klijanci s promijenjenom ekspresijom gena *DMS3* prikupljeni su u istim vremenskim točkama: (c) odmah nakon izlaganja, i (d) nakon oporavka.



**Prilog 9.** Vrijednosti  $\cos^2$  za mjerene parametre na određenoj komponenti. Obuhvaćeni su podaci za klijance s promijenjenom ekspresijom gena *BPM* prikupljene u dvije vremenske točke: (a) odmah nakon izlaganja temperaturi od 37 °C, i (b) nakon 24 sata oporavka. Klijanci s promijenjenom ekspresijom gena *DMS3* prikupljeni su u istim vremenskim točkama: (c) odmah nakon izlaganja, i (d) nakon oporavka. Vrijednosti  $\cos^2$  predstavljene su bojom i veličinom kruga.



## 9. ŽIVOTOPIS

Sandra Vitko (MBZ: 378370) stekla je titulu magistre eksperimentalne biologije 2014. godine, a 2017. godine završila je Program za stjecanja kompetencija nastavnika. Tijekom 2015. i 2016. godine bila je zaposlena kao stručna suradnica u Javnoj ustanovi „Park prirode Žumberak-Samoborsko gorje“, a tijekom 2017. i 2018. godine kao profesorica prirode i biologije u Osnovnoj školi Čazma. Od listopada 2018. godine zaposlena je kao asistentica u Botaničkom zavodu Biološkog odsjeka PMF-a. Sudjeluje u izvođenju praktične nastave iz kolegija Fiziologija bilja i srodnih izbornih kolegija te je pomagala u izradi jednog diplomskog rada u svojstvu komentora. Područje znanstvenog interesa Sandre Vitko je fiziologija stresa u biljaka. Doktorsku disertaciju izradila je u okviru projekta HRZZ „MATH-BTB proteini kao regulatori transkripcije i RNA posredovane metilacije DNA u biljnom razvitku“ (voditeljica: prof. dr. sc. Dunja Leljak-Levanić) i projekta dobivenog od EPPN-a (European Plant Phenotyping Network) pod naslovom „Phenotyping of BPM1-mediated heat stress response in *Arabidopsis thaliana*“ (voditeljica: prof. dr. sc. Željka Vidaković-Cifrek). Trenutno je suradnica na projektu HRZZ „Alternativno prekrajanje gena *BPM2* kao mehanizam uspostave funkcionalne raznolikosti porodice proteina MATH-BTB u uročnjaku *Arabidopsis thaliana*“ (voditeljica: prof. dr. sc. Nataša Bauer). Autorica je četiri znanstvena rada objavljena u časopisima s međunarodnom recenzijom. Svoje rezultate predstavila je na deset međunarodnih i pet domaćih skupova. Usavršavala se na dvije inozemne institucije – znanstveno-istraživačkom centru Jülich, Njemačka i Laboratory of Growth Regulators, Olomouc, Češka. Dobitnica je stipendije za mobilnost mladih istraživača dodijeljene od organizacije Federation of European Societies of Plant Biology (FESPB). Od ostalih aktivnosti, bila je članica organizacijskog odbora 7. Simpozija studenata doktorskih studija PMF-a, a od rujna 2023. godine uključena je u rad uredništva časopisa *Acta Botanica Croatica* u svojstvu tehničkog urednika.