

Biokemijski i molekularni odgovori uročnjaka (*Arabidopsis thaliana*) na kratkotrajni toplinski šok

Merkaš, Davor

Master's thesis / Diplomski rad

2025

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:217:951908>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-14**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Davor Merkaš

**Biokemijski i molekularni odgovori uročnjaka
(*Arabidopsis thaliana*) na kratkotrajni toplinski šok**

Diplomski rad

Zagreb, 2025.

Ovaj rad je izrađen na Botaničkom zavodu Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu, pod mentorstvom prof. dr. sc. Željke Vidaković-Cifrek i komentorstvom dr. sc. Sandre Vitko. Rad je financiran sredstvima Hrvatske zaklade za znanost u sklopu projekta „Alternativno prekrajanje gena *BPM2* kao mehanizam uspostave funkcionalne raznolikosti porodice proteina MATH-BTB u uročnjaku *Arabidopsis thaliana*“ IP-2022-10-7874. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistar eksperimentalne biologije.

Zahvale

Ovim putem iskreno zahvaljujem svojoj mentorici, prof. dr. sc. Željki Vidaković-Cifrek, na neizmjerne podršci, stručnim savjetima, ljubaznosti i pristupačnosti tijekom cijelog procesa istraživanja i pisanja ovog rada.

Posebno zahvaljujem svojoj komentorici, dr. sc. Sandri Vitko, na vodstvu, korisnim savjetima i nesebičnoj pomoći tijekom eksperimentalnog dijela rada. Također, izražavam veliku zahvalnost za ugodnu i poticajnu atmosferu u laboratoriju, podršku pri provedbi studentskih projekata i savjetima koji su mi pomogli da rastem kao znanstvenik, posebno u razumijevanju i primjeni statistike.

Zahvaljujem svim profesorima i asistentima koji su me tijekom pet godina studija pratili i podupirali, omogućujući mi da se razvijem u osobu i istraživača kakav sam danas.

Neizmjerne sam zahvalan svojoj obitelji na neprekidnoj podršci i ohrabrenju, kako u profesionalnom razvoju, tako i u svim životnim izazovima.

Na kraju, hvala svim kolegama i prijateljima s kojima sam dijelio ovo putovanje kroz studij. Bila mi je istinska čast dijeliti ovo iskustvo s vama, te sam iznimno ponosan na ljude u koje smo zajedno izrasli.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

Biokemijski i molekularni odgovori uročnjaka (*Arabidopsis thaliana*) na kratkotrajni toplinski šok

Davor Merkaš

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Toplinski stres smatra se jednim od glavnih abiotičkih faktora koji negativno utječu na rast i razvoj biljaka. Cilj ovog rada bio je istražiti biokemijski i molekularni odgovor klijanaca uročnjaka (*Arabidopsis thaliana*) na toplinski šok određivanjem sadržaja H₂O₂, stupnja lipidne peroksidacije, fotosintetske učinkovitosti, količine enzima RuBisCO, indukcije proteina toplinskog šoka HSP90 i ekspresije nekoliko gena uključenih u odgovor na toplinski stres. Uzorci su analizirani odmah nakon izlaganja klijanaca temperaturi od 45 °C u trajanju 45 minuta te nakon oporavka u ukupnom trajanju 11 sati i 15 minuta. Rezultati su pokazali da neposredno nakon tretmana, a niti nakon oporavka, nije došlo do značajnog porasta količine H₂O₂ i stupnja lipidne peroksidacije, tj. na temelju spomenutih parametara nije potvrđen oksidacijski stres. Fotosintetska učinkovitost bila je smanjena, uz povećano rasipanje energije, što sugerira oštećenje fotosustava II (PSII). Primijenjeni tretman nije djelovao na količinu enzima RuBisCO. Potvrđena je indukcija proteina HSP90 te pojačana ekspresija gena *HSFA3* i *DREB2A*. Dobiveni rezultati potvrđuju da su klijanci uročnjaka pokazali biokemijske i molekularne promjene nakon izlaganja toplinskom šoku, pružajući osnovu za daljnje istraživanje koje bi se temeljilo na uzorkovanju u više vremenskih točaka nakon tretmana te mjerenju aktivnosti antioksidacijskih enzima i količine neenzimskih antioksidansa.

Ključne riječi: *DREB2A*, fotosintetska učinkovitost, *HSFA3*, HSP90, lipidna peroksidacija, oksidacijski stres

(61 stranica, 6 slika, 6 tablica, 89 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.

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

Komentor: dr. sc. Sandra Vitko

Ocjenitelji:

Prof. dr. sc. Željka Vidaković-Cifrek.

Prof. dr. sc. Biljana Balen

Doc. dr. sc. Josip Skejo

Rad prihvaćen: 16. 1. 2025.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Master thesis

Biochemical and molecular responses of thale cress (*Arabidopsis thaliana*) to short-term heat shock

Davor Merkaš

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Heat stress is considered one of the most important abiotic factors that affect plant growth and development. The aim of this work was to investigate the biochemical and molecular responses of the *Arabidopsis thaliana* seedlings to heat shock by determining the content of H₂O₂, the level of lipid peroxidation, the photosynthetic efficiency, the amount of the enzyme RuBisCO, the induction of heat shock proteins HSP90 and the expression of several genes involved in the response to heat stress. Samples were analyzed immediately after a 45-minute heat treatment at 45 °C and after a recovery period of 11 hours and 15 minutes. The results showed no significant increase in the amount of H₂O₂ and lipid peroxidation, i.e. oxidative stress was not confirmed by the mentioned parameters. Photosynthetic efficiency was reduced, with increased energy dissipation, indicating damage of photosystem II (PSII). The amount of RuBisCO enzyme was not changed. Induction of HSP90 proteins and increased expression of *HSFA3* and *DREB2A* genes were confirmed. The results obtained show biochemical and molecular changes in *A.thaliana* seedlings after heat shock exposure and provide a basis for further research based on sampling at multiple time points and measuring the activity of antioxidant enzymes and the content of non-enzymatic antioxidants.

Keywords: *DREB2A*, *HSFA3*, HSP90, lipid peroxidation, oxidative stress, photosynthetic efficiency

(61 pages, 6 figures, 6 tables, 89 references, original in: Croatian)

Thesis is deposited in Central Biological Library.

Mentor: Prof. Željka Vidaković-Cifrek, PhD
Co-mentor: Sandra Viko, PhD

Reviewers:

Prof. Željka Vidaković-Cifrek, PhD

Prof. Biljana Balen, PhD

Asst. Prof. Josip Skejo, PhD

Thesis accepted: 16.1.2025

Popis kratica

- ABA – Apscizinska kiselina (engl. *abscisic acid*)
- APX – Askorbat peroksidaza (engl. *ascorbat peroxidase*)
- APS – Amonij persulfat
- ATP – Adenozin trifosfat (engl. *adenosine triphosphate*)
- BPM – Proteini iz porodice proteina BTB-MATH, sadrže domene BTB i MATH
- BR – Brasinosteroidi
- BSA – Albumin iz goveđeg seruma (engl. *bovine serum albumin*)
- CAM – Biljke koje provode CAM-fotosintezu (engl. *crassulacean acid metabolism*)
- CAT – Katalaza (engl. *catalase*)
- CEF – Ciklični tok elektrona (engl. *cyclic electron flow*)
- Chl *a* – Klorofil *a* (engl. *chlorophyll a*)
- CK – Citokinini
- CO₂ – Ugljikov dioksid
- DREB2A* – Gen koji kodira protein *DREB2A* (engl. *dehydration-responsive element-binding protein 2A*)
- DTT – Ditiotritol (engl. *dithiothreitol*)
- EDTA – Etilendiamintetraoctena kiselina (engl. *ethylenediaminetetraacetic acid*)
- ET – Etilen
- F_v/F_m – Maksimalni kvantni prinos fotosustava II
- FW – Masa svježeg biljnog tkiva (engl. *fresh weight*)
- G-POD – Gvajakol peroksidaza (engl. *guaiacol peroxidase*)
- H₂O₂ – Vodikov peroksid (engl. *hydrogen peroxide*)
- HSFA1/HSFA3 – Proteini iz porodice HSF-a (engl. *heat shock factor*)
- HSP – Proteini toplinskog šoka (engl. *heat shock proteins*)
- JA – Jasmonska kiselina (engl. *jasmonic acid*)
- K – Kontrolna grupa biljaka
- LEF – Linearni tok elektrona (engl. *linear electron flow*)
- MDA – Malondialdehid (engl. *malondialdehyde*)
- MS – Hranjivi medij prema Murashige i Skoog (1962)

NADPH oksidaza – enzim koji katalizira formiranje superoksidnog radikala prijenosom elektrona s NADPH na kisik (engl. *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase*)

$O_2^{\cdot-}$ – Superoksidni radikal

$\cdot OH$ – Hidroksilni radikal

1O_2 – Singletni kisik

OJIP – Polifazni porast fluorescencije klorofila *a* od faze O do faze P

PAGE– Elektroforeza u poliakrilamidnom gelu (engl. *polyacrylamide gel electrophoresis*).

PCR – Lančana reakcija polimerazom (engl. *polymerase chain reaction*)

PI_{ABS} – Indeks fotosintetske učinkovitosti (engl. *photosynthetic performance index*)

PSI – Fotosustav I u prijenosu elektrona u fotosintezi (engl. *photosystem I*)

PSII – Fotosustav II u prijenosu elektrona u fotosintezi (engl. *photosystem II*)

PQ – Plastokinon (engl. *plastoquinone*).

PVPP – Polivinilpolipirrolidon (engl. *polyvinylpolypyrrolidone*)

RC – Reakcijski centar fotosustava II (engl. *reaction center*)

ROS – Reaktivni kisikovi oblici (engl. *reactive oxygen species*)

RuBisCO – Ribuloza-1,5-disfosfat karboksilaza/oksigenaza (engl. *ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase*)

SA – Salicilna kiselina (engl. *salicylic acid*)

SDS – Natrijev dodecil sulfat (engl. *sodium dodecyl sulfate*)

SDS-PAGE – Elektroforeza u poliakrilamidnom gelu s natrijevim dodecil sulfatom (engl. *sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis*)

SOD – Superoksid dismutaza (engl. *superoxide dismutase*)

T – Tretirana grupa biljaka

TEMED – Tetrametiletildiamin

TBA – Tiobarbituratna kiselina (engl. *thiobarbituric acid*)

TCA – Trikloroctena kiselina (engl. *trichloroacetic acid*)

VT – Vremenska točka prikupljanja uzoraka (1-VT: odmah nakon tretmana, 2-VT: nakon perioda oporavka)

wt – Biljke divljeg tipa (engl. *wild type*)

Sadržaj

1. Uvod	1
1.1 Stres u biljaka	1
1.2 Pokazatelji učinka stresnih uvjeta na biljke.....	2
1.3 Oksidacijski stres i antioksidacijski sustav.....	3
1.4 Utjecaj toplinskog stresa na biljke.....	5
1.5 Odgovor i prilagodbe biljaka na toplinski stres.....	7
1.6 Značenje istraživanja toplinskog stresa i primjeri metoda istraživanja	12
1.7 Biljka <i>Arabidopsis thaliana</i> kao modelna biljka	15
2. Cilj istraživanja	16
3. Materijal i metode	17
3.1 Biljni materijal, uzgoj i tretman klijanaca	22
3.2 Mjerenje polifaznog rasta fluorescencije klorofila <i>a</i> JIP-testom.....	23
3.3 Određivanje sadržaja vodikovog peroksida.....	24
3.4 Određivanje stupnja lipidne peroksidacije	25
3.5 Imunodetekcija proteina HSP90 i RuBisCO	27
3.5.1 Ekstrakcija i mjerenje ukupnih topivih proteina.....	27
3.5.2 Razdvajanje proteina poliakrilamid-gel elektroforezom u denaturirajućim uvjetima	28
3.5.3 Western blot analiza	29
3.6 Analiza ekspresije gena <i>BPM</i> , <i>DREB2A</i> i <i>HSFA3</i>	30
3.6.1 Izolacija ukupne RNA	30
3.6.2 Reverzna transkripcija RNA.....	32
3.6.3 Provjera čistoće dobivene cDNA	32
3.6.4 Kvantifikacija ekspresije gena.....	33
3.6.5 Analiza ekspresije gena	34
3.7 Statistička obrada podataka	35
4. Rezultati	36
4.1 Fluorescencija klorofila <i>a</i>	36
4.2 Sadržaj vodikovog peroksida	38
4.3 Stupanj lipidne peroksidacije	39
4.4 Imunodetekcija proteina HSP90 i RuBisCO	39

4.5 Uspješnost izolacije ukupne RNA i sinteze cDNA	40
4.5.1 Koncentracija i čistoća RNA nakon izolacije.....	40
4.5.2 Kvaliteta cDNA sintetizirane reverznom transkripcijom	41
4.6 Analiza ekspresije gena <i>BPM</i> , <i>DREB2A</i> i <i>HSFA3</i>	42
5. Rasprava	44
6. Zaključak.....	52
7. Literatura	53
Životopis.....	

1. Uvod

1.1 Stres u biljaka

Stresnim čimbenikom se mogu nazvati utjecaji koji su direktno ili indirektno nepovoljni za organizam, njegov razvoj, reprodukciju i fiziološke procese. Stresni čimbenici mogu biti abiotički i biotički. Abiotički uključuju elemente klime – temperaturu zraka, vlagu, padaline te elemente tla – sadržaj mineralnih tvari, vode, soli i teških metala u tlu, dok biotički uključuju negativni utjecaj drugih organizama (Suzuki i sur., 2014, Buchanan i sur., 2015; Freeman i Beattie, 2008). U prirodnim staništima biljke mogu biti izložene pojedinačnim stresnim uvjetima, ali često i njihovoj kombinaciji, tj. istovremenom djelovanju više stresnih uvjeta (Devireddy i sur., 2021, Suzuki i sur., 2014).

Biljke, za razliku od životinja, nemaju mogućnost izbjegavanja stresnih uvjeta promjenom lokacije, već zbog svoje vezanosti uz supstrat moraju ostvariti drugačije mehanizme zaštite. Iz tog razloga pri djelovanju stresnih uvjeta biljke pokreću brojne biokemijske reakcije koje im omogućuju širok spektar ublažavanja utjecaja ili štete koje bi mogli izazvati stresni čimbenici. Kompleksnom signalizacijom biljke su se prilagodile promjenjivim i stresnim okolišnim faktorima i razvile sposobnost aklimatizacije (Buchanan i sur., 2015). Stresni čimbenici mogu biti primarni ili sekundarni, pri čemu sekundarni nastaju kao posljedica štetnog djelovanja primarnih, a najčešći su reaktivni kisikovi oblici (engl. *reactive oxygen species*, ROS) (Zhu, 2016). Biljke imaju dva tipa tolerancije na okolišne stresne faktore – bazalnu i stečenu. Bazalna tolerancija se temelji na odgovoru na okolišne čimbenike aktivacijom signalnih puteva i uobičajenim kemijskim sastavom. Npr. biljke s višim sadržajem nekih antioksidansa imat će bolju otpornost na akumulaciju ROS-ova. Stečena tolerancija nastaje predizlaganjem biljaka subletalnim dozama ili jačinama nekog stresnog faktora, što potiče stresni odgovor i omogućuje pripremljenost biljke za potencijalno letalne stresne uvjete (Devireddy i sur., 2021). Stečena tolerancija temelji se na aklimatizaciji biljaka koju možemo opisati kao pojavu prilagodbe organizma na utjecaj umjerene doze nekog stresnog čimbenika, koja potiče fiziološki, anatomski i biokemijski odgovor biljke. Aklimatizacija omogućuje otpornost na doze istovrsnog ili drugog okolišnog stresa koje bi bez aklimatizacije bile letalne za biljku pa na taj način aklimatizacija povećava opstanak i produktivnost biljaka (Larkindale i sur., 2005).

1.2 Pokazatelji učinka stresnih uvjeta na biljke

Pokazatelje učinka stresnih uvjeta možemo promatrati kao preživljavanje biljaka, utjecaj na stopu rasta i druge biološke procese. Učinak stresnih uvjeta na biljni organizam može se detektirati na nekoliko razina, uključujući morfološku razinu, staničnu te molekularnu razinu (Hasanuzzaman i sur., 2013). Primjeri djelovanja na morfologiju biljke izložene nekom stresnom uvjetu su pojava sušenja ili odbacivanja listova, promjene strukture nadzemnog dijela biljke ili vidljiva oštećenja poput lezija ili nekrotičnog tkiva. Na staničnoj razini, odgovor na stresne uvjete može uključivati promjene poput vakuolizacije, promjene strukture stanične membrane i stanične stijenke te dinamike staničnog ciklusa i diobe. Promjene na molekularnoj razini nastaju kao oštećenja uslijed djelovanja stresa ili kao prilagodba biljaka okolišnim čimbenicima (Taiz i Zeiger, 2010). Primjeri takvih promjena su nastajanje ROS-ova te aktivacija gena i biosinteza proteina koji imaju ulogu u obrani od specifičnih stresnih uvjeta. Proteini, poput proteina toplinskog šoka (engl. *heat shock proteins*, HSP), iako su najčešće povezani s odgovorom na toplinski stres, mogu sudjelovati i u odgovoru na druge stresne uvjete poput suše, povišenog saliniteta i prisutnosti toksične količine teških metala. Ti proteini najčešće imaju ulogu molekularnih šaperona jer pomažu u uspostavljanju i održavanju strukture i funkcionalnosti drugih proteina te sudjeluju u sprječavanju njihove denaturacije ili agregacije (Buchanan i sur., 2015). Proces fotosinteze je izrazito osjetljiv na nepovoljne uvjete okoliša, poput visokih temperatura, suše, povišenog saliniteta ili manjka hranjivih tvari. Zbog toga se njegova učinkovitost često koristi kao pokazatelj djelovanja stresa te za procjenu utjecaja na metabolizam biljke. Procjena učinkovitosti fotosinteze uključuje određivanje sadržaja klorofila, kao i karotenoida koji u fotosintezi imaju ulogu pomoćnih pigmenta u apsorpciji svjetlosti te ulogu zaštite fotosintetskog aparata. Mjerenje fluorescencije klorofila *a* se također često koristi za procjenu učinkovitosti fotosinteze. To je brza, visokoosjetljiva, nedestruktivna i pouzdana metoda za analizu funkcionalnosti fotosustava II (engl. *photosystem II*, PSII), koja može pružiti informacije o učinkovitosti i razini oštećenja fotosintetskog sustava u stresnim uvjetima (Stirbet i sur., 2018; Küpper i sur., 2019; Maxwell i Johnson, 2000). Zajedničko svojstvo djelovanja brojnih stresnih čimbenika je nakupljanje ROS-ova koji uzrokuju pojavu oksidacijskog stresa, tj. neselektivnu oksidaciju staničnih molekula. Povećanje količine ROS-ova ujedno je i poticaj za aktivaciju antioksidacijskog sustava. Promjenu količine ROS-ova možemo određivati primjenom neke od metoda za mjerenje njihovog sadržaja, kao što je npr. mjerenje količine vodikova peroksida (H_2O_2). Indikacija promjene količine ROS-

ova su također aktivacija antioksidacijskog sustava te povećanja sadržaja antioksidansa poput askorbata i prolina (Quan i sur., 2008; Davies, 2000; Mattioli i sur., 2009).

1.3 Oksidacijski stres i antioksidacijski sustav

Svaki okolišni stresni uvjet uzrokuje pojavu ROS-ova koji uzrokuju oksidacijski stres u stanicama. ROS-ovi predstavljaju skupinu djelomično reduciranih ili aktiviranih oblika atmosferskog kisika (O_2), poput singletnog kisika (1O_2), superoksidnog radikala ($O_2^{\cdot-}$), H_2O_2 i hidroksilnog radikala ($\cdot OH$) (Gill i Tuteja, 2010). ROS-ovi nastaju u određenoj količini pri prijenosu elektrona u procesu fotosinteze, u lancu prijenosa elektrona u mitohondriju te reakcijama kataliziranim oksidazama u mikrotjelešcima i području stanične stijenke. U povoljnim uvjetima ROS-ovi imaju široki spektar signalnih uloga u stanici, te je njihova koncentracija i zastupljenost pod kontrolom antioksidacijskog sustava (Hasanuzzaman i sur., 2020; Devireddy i sur., 2021). Kloroplasti se smatraju velikim izvorom ROS-ova, no za vrijeme toplinskog stresa ROS-ovi se pretežito razvijaju na staničnoj membrani pod utjecajem kalcijevih iona koji aktiviraju NADPH oksidaze (engl. *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*). NADPH oksidaze proizvode ROS-ove koji dovode do prijenosa signala s ciljem aktivacije staničnog odgovora na stres (Devireddy i sur., 2021).

Za razliku od drugih ROS-ova, H_2O_2 je relativno stabilan i dulje se zadržava u tkivu, što omogućuje bolje praćenje njegova nastanka (Demidchik, 2015). Kao i drugi ROS-ovi, pri niskim koncentracijama i povoljnim uvjetima H_2O_2 služi kao signalna molekula za različite signalne puteve, dok pri višim koncentracijama pokreće staničnu smrt (Quan i sur., 2008). Također može oksidirati tiolne skupine (-SH) cisteina u enzimima, čime uzrokuje promjene rasporeda disulfidnih veza i modifikacije strukture i funkcije enzima. H_2O_2 nastaje od $O_2^{\cdot-}$ uz djelovanje superoksid dismutaze (engl. *superoxide dismutase*, SOD), u lancu prijenosa elektrona u kloroplastima i mitohondrijima, djelovanjem NADPH oksidaza u staničnoj membrani, peroksisomalnih oksidaza, peroksidaza tipa III i drugih apoplastnih oksidaza. H_2O_2 prolazi membrane kroz membranske kanale akvaporine (Smirnov i Arnaud, 2019).

Izuzetno štetan učinak ROS-ova, prvenstveno $\cdot OH$, je poticanje lipidne peroksidacije. Kao reakcija izazvana ROS-ovima smatra se sekundarnom reakcijom na stres, a odvija se kao lančana reakcija od tri faze: inicijacije, propagacije i terminacije. Početnim uklanjanjem vodikova atoma iz masne kiseline membranskih lipida djelovanjem $\cdot OH$ nastaju lipidni radikali koji mogu nastaviti

proces oksidacije lipida (Noctor i sur., 2015; Blokhina i sur., 2003; Catalá, 2006). H_2O_2 nema dovoljnu oksidacijsku moć za oksidaciju masnih kiselina, no u prisutnosti slobodnih željezovih iona u mitohondrijima, kloroplastima, peroksisomima, lizosomima i citoplazmi, Fentonovom reakcijom može doći do nastanka $\cdot OH$ koji iniciraju stvaranje lipidnih radikala. Lipidni radikali prelaze u lipidne alkoksilne radikale, alkane, alkohole te aldehide, poput malondialdehida (MDA) (Davies, 2000). Lipidna peroksidacija negativno djeluje na fluidnost membrane, membranske proteine, stanični transport, prijenos signala te stabilnost organela (Demidchik, 2015).

Osim međustanične signalizacije, ROS-ovi imaju i ulogu u unutarstaničnoj signalizaciji i sistemskom odgovoru biljke na stres (Baxter i sur., 2014). U nekim tipovima stanica prilikom percepcije utjecaja toplinskog stresa od strane receptora, fitohormoni poput abscizinske kiseline (engl. *abscisic acid*, ABA) i jasmonske kiseline (engl. *jasmonic acid*, JA) induciraju produkciju ROS-ova koji aktiviraju NADPH oksidaze i na membranama susjednih stanica. Ovaj prijenos ROS-ova izgleda kao val aktivacije proizvodnje radikala koji se širi kroz cijeli sustav (Choudhury i sur., 2017).

Oksidacijski stres je stanje koje karakterizira neravnoteža između proizvodnje ROS i mogućnosti mehanizama u biljnim stanicama da ih uklone ili poprave nastala oštećenja (Demidchik, 2015). Funkcionalnost stanice održava se ravnotežom između koncentracije ROS-ova i aktivnosti antioksidacijskog sustava. Naime, količina ROS-ova ovisi o aktivnosti antioksidacijskog sustava i ta se ravnoteža gubi samo u stresnim uvjetima (Apel i Hirt, 2004; Kapoor i sur., 2019). Djelovanje stresa inducira antioksidacijski sustav i povećava njegov kapacitet kako bi se kontrolirala koncentracija nastalih ROS-ova. Antioksidacijski sustav tvore enzimski i neenzimski antioksidansi (Arora i sur., 2002; Hasanuzzaman i sur., 2020). Antioksidansom se smatra svaka molekula koja inaktivira ROS, a da se pritom sama ne pretvori u neki destruktivni oblik. Stoga su većina antioksidansa donori elektrona koji reduciraju oksidirane radikale. U enzimске antioksidanse ubrajaju se ključni enzimi poput SOD koja katalizira pretvorbu $O_2^{\cdot -}$ u H_2O_2 i O_2 , katalaze (engl. *catalase*, CAT) koja razgrađuje H_2O_2 u vodu i O_2 te askorbat peroksidaze (engl. *ascorbat peroxidase*, APX) koja razgrađuje H_2O_2 korištenjem askorbata kao donora elektrona (Gill i Tuteja, 2010). Neenzimski antioksidansi obuhvaćaju molekule poput askorbinske kiseline (vitamin C), glutationa, karotenoida, tokoferola (vitamin E), fenolnih spojeva, flavonoida i kompatibilnih osmolita poput prolina i betaina. Neke od spomenutih molekula imaju višestruku ulogu, jer osim neutraliziranja ROS-ova, mogu djelovati npr. kao signalne molekule ili

kompatibilni osmoliti (Hasanuzzaman i sur., 2020). Kao što je ranije spomenuto, ROS-ovi imaju ulogu u velikom broju signalnih puteva stoga je njihova koncentracija važna za normalno funkcioniranje biljnog organizma (Choudhury i sur., 2017). Kao što postoje različita mjesta nastajanja ROS-ova u tkivima i stanicama, tako je u skladu s tim i antioksidacijski sustav raspoređen u staničnim odjeljcima. Na primjer, SOD se nalazi u kloroplastima, mitohondrijima i citoplazmi, dok se CAT primarno nalazi u peroksisomima i citosolu (Apel i Hirt, 2004).

1.4 Utjecaj toplinskog stresa na biljke

Klimatske promjene i nagli porast globalne temperature značajno utječu na ekosustave, ugrožavajući opstanak organizama. Temperatura atmosfere se značajno povećala u zadnja dva desetljeća, a očekuje se daljnji rast od 1,7 °C do 2025. te od 5 °C do kraja 21. stoljeća, kada će toplinski stres biti jedan od najčešćih abiotičkih stresnih uvjeta (Devireddy i sur., 2021). Temperatura je jedan od glavnih okolišnih uvjeta koji utječe na biološke funkcije biljke (Devireddy i sur., 2021). Toplinski stres može se definirati kao učinak povišene temperature koja uzrokuje nepovratne poremećaje rasta i razvoja biljaka. Karakteriziraju ga intenzitet, trajanje i brzina porasta temperature. Uobičajeno, prolazno povišenje temperature za 10-15 °C iznad razine optimalne temperature okoline uzrokuje toplinski stres (Wahid i sur., 2007).

Neposredni učinci toplinskog stresa kod biljaka uključuju denaturaciju staničnih proteina, promjene fluidnosti membrana i narušavanje stanične organizacije. Dugotrajna izloženost povišenoj temperaturi dovodi do inaktivacije enzima, inhibicije sinteze proteina i strukturne dezintegracije staničnih komponenti, poput mikrotubula i drugih elemenata citoskeleta. Toplinski stres utječe na fotosintezu, disanje, kretanje vode kroz biljku i unos hranjivih tvari (Wahid i sur., 2007; Mathur i sur., 2014). Također inducira pojavu oksidacijskog stresa, pri čemu nastaju ROS-ovi poput H₂O₂ i [•]OH, koji mogu oštetiti stanične membrane, proteine i nukleinske kiseline (Wani i Kumar, 2020). ROS-ovi potiču aktivaciju složenih signalnih puteva koji dovode do indukcije HSP, poput HSP90, koji pomažu u održavanju stabilnosti i funkcije staničnih proteina pri visokim temperaturama (Devireddy i sur., 2021).

Utjecaj toplinskog stresa na biljke uvelike ovisi o biljnoj vrsti i razvojnom stadiju (Wahid i sur., 2007). Istraživanjima na pšenici, Wahid (2007) je primijetio da je optimalni temperaturni raspon za fotosintezu 20-30 °C, a nakon 30 °C dolazi do brzog smanjenja stope fotosinteze. Izloženost sjemenki u razvoju toplinskom stresu može prouzročiti sporije klijanje te slabiju stopu

rasta i razvoja. Kod kukuruza, razvoj koleoptila se usporava pri 40 °C, a potpuno zastaje na 45 °C (Devireddy i sur., 2021), dok se kod pšenice zabilježilo smanjenje mase i količine sjemenki nakon toplinskog stresa (Ferris i sur., 1998). U reproduktivnoj fazi razvoja osjetljiv je i cvijet, pa tako visoke temperature značajno utječu na razvoj peluda i prašnika rajčice, što je ključni uzrok smanjenog zametanja plodova. Oplodnja cvjetova peludom, prethodno izloženim toplinskom stresu, ili oplodnja cvjetova izloženih stresu s kontrolnom peludi u svakom slučaju uzrokuje manju stopu zametanja i proizvodnje plodova te utječe na brojnost sjemenki po plodu (Peet i sur., 1998). Osim negativnog utjecaja toplinskog stresa, kraća izlaganja subletalnom toplinskom stresu u fazi reprodukcije mogu potaknuti povećanje cvjetnih pupova, dok za vrijeme razvoja sjemenki ratarskih kultura može doći do povećanja kvalitete proizvoda poput brašna i kruha (Wahid i sur., 2007).

Toplinski stres narušava aktivnost enzima, što dovodi do poremećaja ključnih biokemijskih procesa poput fotosinteze (Wani i Kumar, 2020). Fotosinteza je izrazito osjetljiv fiziološki proces te je pri porastu temperature često inhibirana prije učinka na druge fiziološke i biokemijske procese. Među najosjetljivije strukture koje sudjeluju u fotosintezi ubrajaju se PSII i enzim ribuloza-1,5-bifosfat karboksilaza/oksigenaza (RuBisCO), ali i druge sastavnice fotosintetskog aparata mogu biti oštećene, poput kompleksa citokroma *b₆f* i plastokinona (engl. *plastoquinone*, PQ). PQ je mobilni nosač elektrona koji prenosi elektrone između PSII i kompleksa citokroma *b₆f* te doprinosi stvaranju protonskog gradijenta potrebnog za sintezu adenozin trifosfata (engl. *adenosine triphosphate*, ATP). U usporedbi s PSII, fotosustav I (PSI) je stabilniji pri povišenim temperaturama (Mathur i sur., 2014). Blago povećanje temperature čak može pozitivno djelovati na PSI zbog poticanja cikličkog toka elektrona (engl. *cyclic electron flow*, CEF), pri čemu dolazi do sinteze molekula ATP-a (Mathur i sur., 2014). Uzroci koji čine fotosintetski sustav toliko osjetljivim na visoke temperature uključuju neželjeno povećanje fluidnosti membrana, što može dovesti do disocijacije membranskih proteina, uključujući podjedinice kompleksa PSII. Nadalje, moguća su i oštećenja reakcijskog središta PSII, čime se narušava ravnoteža između količine apsorbirane energije i prijenosa elektrona u lancu prijenosa elektrona u tilakoidnim membranama (Mathur i sur., 2014). Povišena temperatura također utječe na redukciju sinteze klorofila te na degradaciju tih molekula, čime se smanjuje stopa fotosinteze kod biljaka (Mathur i sur., 2014). Kao odgovor na toplinski stres, kloroplasti mezofilnih stanica vinove loze mijenjaju morfologiju pa je umjesto izduženog prisutan okruglasti oblik, uočene su i strukturne promjene u stromi, dolazi

do gubitka vode iz vakuole, dok mitohondriji pokazuju degradaciju unutarnje membrane i promjene sadržaja matriksa (Zhang i sur., 1997).

RuBisCO je odgovoran za godišnju fiksaciju i do 1000 tona ugljikov dioksid (CO_2) iz atmosfere što ukazuje na njegovo značenje u prirodi (Mathur i sur., 2014). Ovaj enzim je glavna komponenta Calvinovog ciklusa u procesu fotosinteze, gdje fiksira CO_2 u organske spojeve. Može provoditi dvije aktivnosti: karboksilaciju i oksigenaciju. Karboksilacija je proces vezanja CO_2 , pri čemu nastaje 3-fosfoglicerat, spoj koji prelazi u gliceraldehid 3-fosfat koji je prekursor za sintezu šećera. S druge strane, oksigenacija je proces u kojem RuBisCO proizvodi 2-fosfoglikolat, molekulu koja nije izravno korisna za metabolizam biljke, već ulazi u proces fotorespiracije koji predstavlja gubitak energije za biljku (Peterhansel i sur., 2010). Pri povišenim temperaturama dolazi do povećanja oksigenazne aktivnosti proteina RuBisCO i procesa fotorespiracije. Nadalje, povišene temperature u uvjetima manjka vode doprinose i zatvaranju puči, procesu važnom za očuvanje vode u biljci, no pri tome se smanjuje unos CO_2 u biljku pa je i iz tog razloga povećana oksigenazna aktivnost enzima RuBisCO. Nadalje, oksigenazna aktivnost raste i zbog smanjene topivosti CO_2 pri povišenim temperaturama (Mathur i sur., 2014).

1.5 Odgovor i prilagodbe biljaka na toplinski stres

Promjenu temperature biljke će prvo detektirati „termosenzorima“ koji uključuju strukture poput kalcijevih kanala na membrani, histonske senzore u jezgri, ROS-ove u stanici te promjene poput denaturiranih proteina u endoplazmatskom retikulumu i citosolu. Ovi „senzori“ su na početku kaskade signalizacije koja rezultira ekspresijom gena koji doprinose termotoleranciji biljke (Devireddy i sur., 2021).

Mehanizmi kojima se biljke prilagođavaju toplinskom stresu mogu biti podijeljeni u dvije kategorije: mehanizme izbjegavanja i tolerancije stresa. Izbjegavanje uključuje promjenu orijentacije lista, hlađenje transpiracijom i strukture poput dlačica. Tolerancija uključuje biokemijske strategije poput nakupljanja osmolita, aktivacije antioksidacijskog sustava, promjene sastava membranskih lipida i indukcije gena uključenih u odgovor na toplinski stres (Mathur i sur., 2014). Ti procesi omogućuju npr. održavanje stabilnosti membrana kako ne bi došlo do pretjerane permeabilnosti i disocijacije membranskih proteina, uklanjanje nastalih ROS-ova, održavanje osmotske ravnoteže akumulacijom topivih tvari poput prolina, signalizaciju i transkripciju gena koji sudjeluju u odgovoru na toplinski stres (Wahid i sur., 2007). Za vrijeme toplinskog stresa

važnu ulogu imaju HSP, hormoni i geni poput porodica gena *BPM* (Wahid i sur., 2007). U biljaka su poznata dva oblika tolerancije na promjene temperature: bazalna i stečena termotolerancija. Sposobnost preživljavanja naglog porasta temperature naziva se bazalna termotolerancija. Stečena termotolerancija uključuje aklimatizacijski odgovor biljaka pri kojem prethodno izlaganje subletalnim temperaturama može potaknuti reprogramiranje signalnih puteva i uzrokovati prilagodbu organizma (Devireddy i sur., 2021). Mutanti uročnjaka (*Arabidopsis thaliana*) s promjenama u antioksidacijskim putevima imaju oslabljenu bazalnu termotoleranciju (Devireddy i sur., 2021). Izlaganje biljaka subletalnim stresnim uvjetima rezultira poboljšanjem stope fotosinteze zbog povećanja sinteze sekundarnih metabolita s antioksidacijskim svojstvima. Takve promjene dovode do stabilizacije membrane i sprečavanja narušavanja integriteta membranskih proteina pri višim temperaturama, do povećanja kapaciteta antioksidacijskog sustava i smanjenja nakupljanja ROS-ova (Li i sur., 2019). Kompleksnost i umreženost signalnih puteva biljaka ponekad omogućuje da izlaganje jednom stresu pozitivno utječe na toleranciju i drugih stresnih čimbenika. Tako djelovanje natrijevog klorida (NaCl) na biljku *Atriplex centralasiatica* povećava termotoleranciju zbog smanjenog učinka toplinskog stresa na PSII, dok kod biljke *Suaeda salsa* L. povećava toleranciju smrzavanja zbog održavanja učinkovitosti PSII i povećavanja udjela nezasićenih masnih kiselina u membrani (Qiu i Lu, 2003; Cheng i sur., 2014). Nadalje, predizlaganje pšenice visokim koncentracijama NaCl dovelo je i do povećanja rasipanja apsorbirane energije u obliku topline u reakcijskim centrima (Li i sur., 2019).

Zbog osjetljivosti procesa fotosinteze na toplinski stres, odgovor i održavanje normalne funkcije fotosintetskog sustava uključuje više mehanizama, npr. rasipanje energije u obliku topline i CEF. Kod fotosinteze u optimalnim uvjetima dolazi do linearnog toka elektrona (engl. *linear electron flow*, LEF) i proizvodnje molekula ATP-a i NADPH. Pri toplinskom stresu može doći do aktivacije CEF oko PSI (Strand i sur., 2015). U CEF-u se elektroni preusmjeravaju od feredoksina (Fd) natrag na PQ. Rezultat ovog ciklusa je proizvodnja ATP-a bez proizvodnje NADPH i povećanje omjera ATP/NADPH unutar kloroplasta što predstavlja prilagodbu fotosintetskog sustava na rad u stresnim uvjetima u kojima je često prisutan nedostatak molekula ATP-a (Mathur i sur., 2014). Tijekom LEF-a dolazi do stvaranja više ROS-ova, nego kod CEF-a. U CEF-u se to izbjegava što je u najvećoj mjeri izraženo u uvjetima svjetlosnog stresa. Naime, CEF doprinosi formiranju trans-tilakoidnog protonskog gradijenta, koji pokreće mehanizam oslobađanja viška svjetlosne energije u obliku topline, čime se štiti fotosustave od fotooštećenja (Suorsa, 2015).

Kao što je ranije spomenuto, u uvjetima toplinskog stresa povećava se oksigenazna aktivnost enzima RuBisCO i fotorespiracija. Prilagodba na fotorespiraciju prisutna je kod C4 i CAM (engl. *crassulacean acid metabolism*) biljaka. Fotorespiracija je kod tih biljaka značajno smanjena zahvaljujući specifičnim prilagodbama metabolizma ugljika. Kod C4 biljaka, oksigenazna aktivnost enzima RuBisCO smanjuje se prostornom odvojenošću. Naime, inicijalna fiksacija CO₂ se odvija u stanicama lisnog mezofila pomoću enzima fosfoenolpiruvat karboksilaze pri čemu nastaje malat. RuBisCO se nalazi u stanicama smještenim uz provodna tkiva (tzv. štapićastim stanicama). U tim je stanicama koncentracija CO₂ povećana zbog dekarboksilacije C4 kiseline (malata) dopremljene iz mezofilnih stanica. U takvim se uvjetima rjeđe događa oksigenacijska reakcija RuBisCO. S druge strane, CAM biljke su prilagođene sušnim uvjetima, zbog čega danju imaju zatvorene puči, a otvaraju ih noću kada je temperatura niža i stoga manji gubitak vode iz biljke. U tih je biljaka inicijalna fiksacija CO₂ fosfoenolpiruvat karboksilazom vremenski odvojena od dekarboksilacije malata i korištenja CO₂ kao supstrata enzima RuBisCO. CO₂, koji biljka primi noću, pohranjuje se u obliku organskih kiselina (malata) u vakuolu, a tijekom dana, kada je zbog prisustva svjetlosti moguća fotosinteza, iz tih se kiselina CO₂ oslobađa i koristi u Calvinovom ciklusu. Tim mehanizmom se minimizira gubitak vode iz biljke kao i fotorespiracija (Kumar i sur., 2017).

Toplinski stres može uzrokovati pad proizvodnje organskih tvari u listovima kao i smanjeno skladištenje u spremišnim tkivima i sjemenkama. To dovodi do smanjenja rasta i pada prinosa poljoprivrednih biljaka. Dolazi i do promjene u raspodjeli asimilata u biljci. U uvjetima toplinskog stresa i spomenutih promjena u raspodjeli i pohranjivanju škroba, biljke mogu povećati proizvodnju spojeva niske molekulske mase poznatih kao kompatibilni osmoliti. Njihova najznačajnija uloga je održavanje osmotske ravnoteže u uvjetima manjka vode, ali u toplinskom stresu neki od njih imaju i ulogu stabilizacije proteina i membrana (Wahid i sur., 2007). Sekundarni metaboliti, poput fenola i flavonoida, također imaju ključnu ulogu u toleranciji stresa ublažavanjem oksidacijskog oštećenja (Mathur i sur., 2014).

Vjerojatno najvažniji proteini koji se induciraju prilikom toplinskog stresa su skupina proteina HSP. Oni najčešće djeluju kao molekularni šaperoni što znači da sprečavaju agregaciju ili potiču deagregaciju peptidnih lanaca, pomažu pri smatanju peptidnih lanaca, štite i stabiliziraju stanične strukture i procese tijekom toplinskog stresa te sudjeluju u aktivnosti antioksidacijskog sustava. Predstavljaju raznoliku skupinu proteina o čijim se ulogama kontinuirano proširuje

znanje. Podijeljeni su po molekularnoj masi u nekoliko skupina, stoga razlikujemo HSP100, HSP90, HSP70, HSP60, te male sHSPs. Raznolikost porodica HSP-a i raspodjela u stanične odjeljke, uključujući citosol, mitohondrije i tilakoide, osigurava im široku funkcionalnost (Buchanan i sur., 2015; Hasanuzzaman i sur., 2013). Ovisno o lokaciji unutar biljne stanice, imaju specifične uloge, poput sHSP21 u kloroplastu rajčice, koji sprječava oštećenje PSII i stabilizira lanac prijenosa elektrona (Mathur i sur., 2014). Istraživanjima na staničnim kulturama uročnjaka utvrđena je indukcija HSP17,6 i HSP18,2 u uvjetima toplinskog stresa. No, primjena inhibitora nastanka ROS-ova, poput difenilenjodonijevog klorida, uzrokuje značajnu redukciju ekspresije gena za HSP, što sugerira da su ROS-ovi važni za pravilnu aktivaciju gena za proteine HSP kod uročnjaka (Devireddy i sur., 2021). Za sHSP21 dokazana je uloga u razvoju kloroplasta u biljci uročnjaka za vrijeme toplinskog stresa. (Chauhan i sur., 2012). Proteini skupine HSP100 sudjeluju u razgradnji proteina koji u nepovoljnim uvjetima stvaraju agregate, čime bi mogli narušiti normalne stanične funkcije. Proteini porodice HSP90 djeluju kao ko-regulatori signalnih puteva koji se aktiviraju tijekom toplinskog stresa, a također su uključeni u proces smatanja proteina, što je ključno za njihovu funkcionalnost. U ovom procesu značajnu ulogu imaju proteini skupina HSP70 i HSP60, koji stabiliziraju novoformirane proteine kako bi se osigurala njihova pravilna trodimenzionalna struktura (Yamada i sur., 2007). Proteini HSP imaju ulogu i u odgovoru biljke na nedostatak vode pa tako proteini AtHSP90-1, ali i AtHSP70-5, uz značajni doprinos termotoleranciji sjemena i sadnica, također pozitivno djeluju na rast u uvjetima deficita vode (Kozeko, 2021). Proteini HSP70 i HSP90 također imaju ulogu u regulaciji aktivnosti regulatornog proteina HSFA1 (engl. *heat stress transcription factor A-1*) tijekom stresnih uvjeta. Kompleks proteina HSP70/HSP90 veže se na protein HSFA1 i utišava njegovo djelovanje, do pojave stresa gdje dolazi do otpuštanja kompleksa od proteina HSFA1 čime se on aktivira (Yamada i sur., 2007).

Osim akumulacije molekula specifičnih u odgovoru na stres, pri djelovanju povišene temperature primjećuje se i obrazac promjene aktivnosti određenih gena i enzima. Brojni geni kodiraju proteine koji sudjeluju u regulatornim i signalnim procesima odgovora na stresne uvjete, poput produkata gena *BPM*, *DREB2A* (engl. *dehydration-responsive element-binding protein 2A*) i *HSF*. Tako proteini BPM, osim u fiziološkim procesima poput cvjetanja i razvoja sjemenki, imaju i ulogu u odgovoru biljke na abiotički stres. Sudjelovanjem u kompleksu ligaze E3 ovisne o kulinu CUL3, proteini BPM utječu na nekoliko skupina transkripcijskih faktora, npr. ERF/AP2 i R2R3 MYB. Vezanjem tih transkripcijskih faktora potiču njihovu ubikvitinaciju te proteosomalnu

razgradnju, čime kontroliraju njihovu aktivnost (Škiljaica i sur., 2020). Proteini BPM su kodirani sa šest različitih gena u genomu uročnjaka i razlikuju se po načinu i mjestu djelovanja. Utvrđeno je da geni *BPM1*, *BPM4* i *BPM5* sudjeluje u odgovoru na abiotički stres (Weber i Hellmann, 2009; Škiljaica i sur., 2020). Biljke s prekomjernom ekspresijom gena *BPM1* pokazale su značajnu promjenu u vremenu cvjetanja, odgovoru na apscizinsku kiselinu i osmotski stres. Također je potvrđeno kako izloženost visokoj koncentraciji soli potiče degradaciju *BPM1*, dok povišena temperatura povećava akumulaciju tog proteina u biljkama (Škiljaica i sur., 2020). Kod uročnjaka, geni *HSF* su identificirani kao ključni regulatori u odgovoru na toplinski stres, gdje njihova ekspresija dovodi do povećane tolerancije na visoke temperature aktivacijom proteina HSP i drugih gena povezanih s odgovorom na različite abiotičke stresne uvjete (Guo i sur., 2016). Porodica gena *HSFA1* potaknuta je signalizacijom od strane kalcijevih iona i kinaza ovisnih o kalciju. Svojom ekspresijom utječu na proteine i gene koji sudjeluju u odgovoru na toplinski stres, čime doprinose ostvarivanju termotolerancije u biljkama. Transkripcijski faktor *HSFA1* smatra se čimbenikom koji direktno regulira ekspresiju gena koji kodiraju proteine važne u odgovoru na toplinski stres, poput *DREB2A*, *HSFA2*, *HSFA7a*, *HSFBs*, te *MBF1C* (Ohama i sur., 2017). Protein *DREB2A* ima ulogu u odgovoru na temperaturni stres i manjak vode sudjelovanjem u aktivaciji specifičnih gena. Ekspresija samog proteina inducirana je stresom, no proteinska stabilizacija i aktivacija proteina postiže se delecijom regije proteina nazvane „negativnom regulacijskom domenom“ (NRD). Kod uročnjaka je otkrivena interakcija kompleksa *BPM-CUL3 E3* s proteinom *DREB2A* u obliku negativne regulacije, gdje kompleks regulira aktivaciju proteina ciljajući deleciju regije NRD (Morimoto i sur., 2017). *DREB2A* također potiče ekspresiju *HSFA3*, dok pretjerana ekspresija *DREB2C*, homologa *DREB2A*, inducira gen *HSFA3* čak u uvjetima kada nije prisutan stres (Ohama i sur., 2017).

Fitohormoni imaju značajnu ulogu u odgovoru biljaka na stresne uvjete. U odgovoru na toplinski stres značajnu ulogu ima ABA, ali i brasinosteroidi (BR), citokinini (CK), salicilna kiselina (SA), JA i etilen (ET) (Devireddy i sur., 2021). Hormoni se međusobno razlikuju po lokalizaciji u biljnom organizmu te uloji u normalnim uvjetima rasta i razvoja te stresom potaknutim ulogama u biljci. Fitohormoni pokreću kompleksne kaskade prijenosa signala u koje je uključena i interakciju s ROS-ovima kao signalima. Različita istraživanja također govore o putevima odgovora na toplinski stres, koji mogu, ali i ne moraju, biti vezani uz hormone. Primjer je ABA, budući da postoje ABA-ovisni putevi prijenosa signala kao i putevi koji nisu ovisni o

ABA (Devireddy i sur., 2021). Mutanti rajčice i uročnjaka s nedostatkom biosinteze ABA pokazuju osjetljivost na toplinu koja uključuje i nižu fotosintetsku učinkovitost u odnosu na divlji tip (Devireddy i sur., 2021). Iste biljke tretirane egzogenom ABA pokazuju veću akumulaciju H_2O_2 i povećanu otpornost na toplinu (Devireddy i sur., 2021). Kao i u slučaju s ABA, mutanti sa smanjenom biosintezom JA pokazuju nižu toleranciju na toplinu od divljeg tipa, sugerirajući tako uključenost JA u bazalnu termotoleranciju (Devireddy i sur., 2021). SA je signalna molekula ključna u uvjetima povišenih temperatura, ali postoje podaci i o njezinim potencijalnim antifungalnim svojstvima (da Rocha Neto i sur., 2015). Razina SA povećava se kod biljaka u uvjetima toplinskog stresa, što rezultira poboljšanom fotosintetskom sposobnosti uvjetovanom zaštitom PSII od povećanih razina ROS-ova. Egzogeno primjena SA povećava aktivnost antioksidativnog sustava i enzima poput CAT, ublažava toplinom inducirano smanjenje oplodnje u cvjetova reguliranjem razine ROS-ova (Devireddy i sur., 2021), djeluje antifungalno i potiče zakorjenjivanje (da Rocha Neto i sur., 2015; Karimi i sur., 2012). ET je fitohormon u plinovitom stanju, uključen u odgovor biljaka na toplinski stres, rast i razvoj putem transkripcijskog faktora ERF74. Mutanti s inaktiviranim genom za ERF74 imaju niže razine ROS-ova i smanjenu termotoleranciju (Devireddy i sur., 2021). Dok CK u normalnim uvjetima sudjeluju u rastu i razvoju biljaka te aktivnosti meristema u izdancima i korijenu, njihova uloga u toplinskom stresu još nije u potpunosti razjašnjena. Ranija istraživanja pokazala su da se sadržaj CK-a općenito smanjuje pri visokim temperaturama, no novija istraživanja pokazuju brzi, ali privremeni porast aktivnih CK-a, nakon čega dolazi do smanjenja njihove količine, što sugerira da CK mogu imati potencijalnu ulogu pri prvom osjetu promjene temperature (Devireddy i sur., 2021). BR reguliraju termotoleranciju biljaka signalizacijskim putovima i međudjelovanjem s drugim hormonima. Kod uročnjaka, mutanti s gubitkom funkcije gena *BESI*, koji je osjetljiv na BR, pokazali su smanjenje učinkovitosti PSII, povećanje sadržaja lipidnih hidroperoksida, dok su u ječmu mutanti s nedostatkom u biosintezi BR-a pokazali smanjenje transkripata proteina toplinskog šoka (Devireddy i sur., 2021).

1.6 Značenje istraživanja toplinskog stresa i primjeri metoda istraživanja

Toplinski stres ima značajni utjecaj na proizvodnju hrane i drugih biljnih proizvoda. Predstavlja jedan od najčešćih abiotičkih faktora koji negativno utječu na poljoprivredne prinose i kvalitetu proizvedene hrane širom svijeta (Devireddy i sur., 2021). Rastuće emisije stakleničkih

plinova dovode do povećanja globalnih temperatura, što će prema predviđanjima promijeniti regije i sezone uzgoja pojedinih usjeva, predstavljajući ozbiljnu prijetnju globalnoj poljoprivredi (Hasanuzzaman i sur., 2013; Wahid i sur., 2007). Temperature više od fizioloških optimuma za biljke mogu uzrokovati smetnje koje dovode do smanjenog rasta, problema u oplodnji, smanjene proizvodnje sjemena, manjih uroda te niže nutritivne vrijednosti proizvoda (Devireddy i sur., 2021; Wahid i sur., 2007; Mishra i sur., 2023). U umjerenim područjima toplinski stres smatra se jednim od najčešćih uzroka niskih prinosa i slabije proizvodnje biljne mase u velikom broju ratarskih kultura poput kukuruza (*Zea mays*) (Giaveno i Ferrero, 2003; Wahid i sur., 2007). Na primjeru soje (*Glycine max*), zabilježen je pad ukupnog sadržaja klorofila i šećera pri izlaganju povišenim temperaturama od 38 °C (Mathur i sur., 2014).

Korištenjem većeg broja pokazatelja učinka stresnih uvjeta, poput promjene rasta, analize strukturnih promjena, analize biokemijskih i molekularnih markera stresa, možemo uspješno istraživati utjecaj nekog stresnog faktora na biljni organizam (Krasensky i Jonak, 2012). Utjecaj toplinskog stresa možemo istraživati na temelju nekoliko markera stresa poput indukcije ROS-ova, stupnja lipidne peroksidacije, prisutnosti proteina toplinskog šoka ili ekspresije pojedinih gena (Gill i Tuteja, 2010; Caverzan i sur., 2012; Krasensky i Jonak, 2012). Prisutnost ROS-ova možemo promatrati mjerenjem stabilnijih ROS-ova, poput H₂O₂, metodom FOX. Spomenuta metoda se temelji na oksidaciji dvovalentnih željezovih iona (Fe²⁺) u trovalentne ione (Fe³⁺), u prisutnosti H₂O₂, koji stvaraju kompleks s bojom ksilenol narančasto koja je sastavnica FOX reagensa. Nastali kompleks se može mjeriti spektrofotometrijski pri valnim duljinama u rasponu od 550 do 600 nm (Mátai i Hideg, 2017).

Određivanje stupnja lipidne peroksidacije temelji se na određivanju MDA koji je najčešći produkt lipidne peroksidacije, tj. razgradnje lipidnog radikala. Metoda se temelji na sličnom principu kao i mjerenje H₂O₂, tj. radi se o indirektnoj metodi određivanja količine MDA na temelju formiranja produkta koji se određuje spektrofotometrijski. MDA, ekstrahiran iz biljnog tkiva u trikloroetnoj kiselini (TCA), stvara kompleks s dodanom tiobarbiturnom kiselinom (TBA), koji se spektrofotometrijski mjeri na valnim duljinama od 440 nm, 532 nm i 600 nm (Hodges i sur., 1999).

Metoda mjerenja fluorescencije klorofila koristi se za određivanje učinkovitosti fotosinteze i detekciju promjena u stresnim uvjetima. Kada klorofil apsorbira fotone svjetlosti, molekule prelaze u pobuđeno stanje. Glavnina apsorbirane energije koristi se za fotokemijske reakcije

fotosinteze, dok se manji dio gubi u obliku toplina i svjetlosti (fluorescencija). Metoda JIP se temelji na analizi kinetike fluorescencije klorofila, koja odražava energetske procese u PSII tijekom svjetlosne faze fotosinteze. Metoda uključuje mjerenje fluorescencije, te bilježi parametre poput maksimalne kvantne efikasnosti PSII (F_v/F_m), apsorpcije po reakcijskom centru (ABS/RC), protoka uhvaćenih fotona po aktivnom reakcijskom centru (TR_0/RC), prijenosa elektrona po aktivnom reakcijskom centru (ET_0/RC), rasipanja energije u obliku topline po aktivnom reakcijskom centru (DI_0/RC) te indeks fotosintetske učinkovitosti (PI_{ABS}). Ovi parametri omogućuju procjenu stanja fotosintetskog aparata i uvid u moguće promjene izazvane stresnim čimbenicima (Strasser i sur., 2004).

Western blot analiza omogućuje detekciju ciljanih proteina, poput npr. HSP90 ili RuBisCO, što također doprinosi procjeni odgovora biljaka na stresne uvjete. Metoda uključuje postupke kvantifikacije ukupnog proteinskog sadržaja zbog određivanja točne koncentracije za daljnje analize, razdvajanje proteina natrijev dodecil sulfat-poliakrilamid gel elektroforezom (engl. *sodium dodecil sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis*, SDS-PAGE) u denaturirajućim uvjetima te imunodetekciju proteina specifičnim antitijelima obilježenim enzimima ili fluorescentnom bojom (Balen i sur., 2011).

Ekspresija gena koji pokazuju promijenjenu aktivnost u uvjetima toplinskog stresa analizira se upotrebom kvantitativne lančane reakcije polimeraze u stvarnom vremenu (engl. *quantitative polymerase chain reaction*, qPCR), koja omogućuje preciznu i osjetljivu kvantifikaciju razine ekspresije ciljanih gena. Metoda je iznimno osjetljiva i omogućuje točnu procjenu razine ekspresije gena povezanih s toplinskim stresom, što je ključno za razumijevanje molekularnih mehanizama prilagodbe biljaka. Uključuje izolaciju ukupne RNA, reverznu transkripciju u komplementarnu DNA (cDNA) te kvantifikaciju ekspresije gena od interesa na toj cDNA.

Istraživanja učinka toplinskog stresa na biljke kao i mehanizama odgovora biljaka na toplinski stres može doprinijeti razvoju novih sorti koje su otpornije na povišene temperature. To bi moglo biti ključno za sigurnu budućnost opskrbe hranom u uvjetima klimatskih promjena (Wahid i sur., 2007). Istraživanje odgovora modelnih biljaka na toplinski stres doprinosi boljem razumijevanju mehanizama tolerancije, poput aktivacije gena i sinteze proteina odgovornih za prilagodbu biljaka na toplinski stres. To može pomoći u identifikaciji ključnih gena i proteina koji

bi mogli postati ciljevi za genetičku modifikaciju ili selektivni uzgoj biljaka s poboljšanom tolerancijom toplinskog stresa.

1.7 Biljka *Arabidopsis thaliana* kao modelna biljka

Arabidopsis thaliana (L.) Heynh., poznata i kao Thalijev ili talijin uročnjak, mala je jednogodišnja dvosupnica iz porodice Brassicaceae. Zbog sekvenciranog genoma, kratkog životnog ciklusa i dostupnosti brojnih genetičkih linija, često se koristi u laboratorijskim istraživanjima (Yaschenko i sur., 2024). Istraživanja provedena na uročnjaku pomogla su u izgradnji temelja moderne biljne biologije (Woodward i Bartel, 2018). Pogodnost ove biljke kao modelnog organizma očituje se u nekoliko svojstava, kao što su razvoj odrasle biljke iz sjemena unutar samo šest tjedana, mogućnost uzgoja u laboratorijskim uvjetima, sitne sjemenke i mali klijanci pogodni za uzgoj u uvjetima *in vitro*, što je optimalno za rad s velikim brojem replika. Nadalje, biljka ima mali genom, samooplodna je i tolerira visoku razinu homozigotnosti (Woodward i Bartel, 2018). Istraživanja na modelnoj biljci uročnjaka omogućavaju razumijevanje fizioloških procesa i u drugih biljaka, zahvaljujući općoj sličnosti u strukturnim i biokemijskim svojstvima među biljkama, kao što su receptori, hormoni i signalni putevi (Woodward i Bartel, 2018). Nedostaci uročnjaka uglavnom se odnose na količinu biomase koju biljka može proizvesti, što može smanjiti količinu raspoloživih uzoraka potrebnih za pojedine analize (Woodward i Bartel, 2018).

2. Cilj istraživanja

Cilj ovog rada bio je istražiti fiziološki, biokemijski i molekularni odgovor divljeg tipa uročnjaka na kratkotrajni toplinski šok. Klijanci uzgojeni u uvjetima *in vitro* izloženi su kratkotrajnom tretmanu temperaturom od 45 °C, koja je subletalna za ovu biljnu vrstu. Specifični ciljevi bili su:

1. Odrediti učinkovitost fotosinteze u uvjetima toplinskog stresa,
2. Utvrditi razinu oštećenja staničnih membrana te razinu nakupljanja ROS-ova pod utjecajem toplinskog stresa,
3. Analizirati utjecaj toplinskog šoka na količinu ključnih proteina povezanih s fotosintezom i odgovorom na stres,
4. Kvantificirati ekspresiju odabranih gena uključenih u molekularne mehanizme odgovora na toplinski stres.

3. Materijal i metode

Popis kemikalija i materijala koje sam koristio prilikom izrade diplomskog rada nalazi se u Tablici 1, dok je popis opreme i uređaja prikazan u Tablici 2.

Tablica 1. Popis kemikalija i materijala korištenih u istraživanju te proizvođača.

Kemikalije i materijal	Proizvođač
Agaroz	Sigma-Aldrich, SAD
Akrilamid	Sigma-Aldrich, SAD
Albumin goveđeg seruma (BSA)	Sigma-Aldrich, SAD
Amonij persulfat (APS)	Sigma-Aldrich, SAD
Amonijev željezo (II) sulfat heksahidrat	Kemika, Hrvatska
Biljeg molekulskih masa za DNA (GeneRuler 1 kb DNA Ladder)	Thermo Fisher Scientific, SAD
Biljeg molekulskih masa za proteine (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 10 do 180 kDa)	Thermo Fisher Scientific, SAD
Bis-akrilamid	Sigma-Aldrich, SAD
Bromfenol modriilo	Sigma-Aldrich, SAD
Cistein-HCl	Sigma-Aldrich, SAD
Coomassie Brilliant Blue G 250	Sigma-Aldrich, SAD
Ditiotreitol (DTT)	Sigma-Aldrich, SAD
EmeraldAmp MAX PCR Master Mix	Takara Bio, Japan
Etanol	LabExpert, Slovenija
Etidij bromid	Sigma-Aldrich, SAD
Etilendiamintetraoctena kiselina (EDTA)	Kemika, Hrvatska
Fosforna kiselina	Carlo Erba Reagents, Italija
Glicerol	Kemika, Hrvatska

Glicin	Kemika, Hrvatska
2× GoTaq® qPCR MasterMix	Promega, SAD
Izosan® G	Pliva, Hrvatska
Kalijeve sol 2-(N-morfolino) etansulfonske kiseline	Sigma-Aldrich, SAD
Kemiluminiscentni supstrat Immobilon Forte Western HRP	Merck Millipore, Njemačka
Komercijalni paket za izolaciju RNA, MagMAX™	Thermo Fisher Scientific, SAD
Ksilenol narančasto	Sigma-Aldrich, SAD
Kunićji anti-HSP90 (AS08 346)	Agrisera, Švedska
Kunićji anti-rbcL (AS03 037)	Agrisera, Švedska
2-Merkaptoetanol	Merck Millipore, Njemačka
Metanol	J. T. Baker, SAD
Mješavina nukleotida dNTP	Sigma-Aldrich, SAD
Mlijeko u prahu	Dukat, Hrvatska
Mukazol	Sigma-Aldrich, SAD
Natrijev dodecil sulfat (SDS)	PlusOne, SAD
Natrijev klorid (NaCl)	Gram-mol, Hrvatska
Nitrocelulozna membrana Amersham™ Protran™ (0,45 µm)	Avantor, SAD
Octena kiselina	Gram-mol, Hrvatska
Početnice Oligo(dT)	Thermo Fisher Scientific, SAD
Polivinilpolipirrolidon (PVPP)	Sigma-Aldrich, SAD
Ponceau S	Sigma-Aldrich, SAD
5× Reaction Buffer	Thermo Fisher Scientific, SAD
RevertAid H Minus Reverse Transcriptase	Thermo Fisher Scientific, SAD
RiboLock RNase Inhibitor	Thermo Fisher Scientific, SAD
Saharoza	Lach-Ner, Češka

Sekundarno antitijelo obilježeno enzimom peroksidaza iz hrena	Merck Millipore, Njemačka
Sorbitol	Sigma-Aldrich, SAD
Staklene kuglice za homogenizaciju SiLibeads Type S	Sigmund Linder, Njemačka
Sumporna kiselina	Kemika, Hrvatska
Tetrametiletilendiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich, SAD
Tiobarbiturna kiselina (TBA)	Sigma-Aldrich, SAD
Trikloroetna kiselina (TCA)	Acros Organics, Belgija
Tris	Sigma-Aldrich, SAD
Tris-acetat	Sigma-Aldrich, SAD
Vodikov peroksid (H ₂ O ₂)	Lach-Ner, Češka

Tablica 2. Popis korištene opreme i uređaja te proizvođača.

Uređaji i oprema	Model	Proizvođač
Analitička vaga	Adventurer Pro	Ohaus, SAD
Autoklav	AMB240N	Astel Scientific, Velika Britanija
Kabinet s horizontalnim laminarnim strujanjem zraka	Heraeus	Heraguard-Thermo Fisher Scientific, SAD
Inkubator	Th 30	Edmund Bühler, Njemačka
Centrifuga	3-18 k	Sigma-Aldrich, SAD
Fluorimetar	FluorPen FP 100	Photon Systems Instruments, Češka
Homogenizator	GC Silvermix 90, 900548	BF Mulholland, Velika Britanija
Horizontalna gel-elektroforeza	RunOne™	Embi Tec, SAD
Magnetni stalak		Dynal Biotech ASA, Norveška
Magnetska miješalica	Rotamix	Tehtnica, Slovenija
Mikrovolumni spektrofotometar	NanoDrop™ 1000	Thermo Fisher Scientific, SAD
pH metar	Sevencompact duo	Mettler Toledo, Švicarska
Spektrofotometar	Specorder 40	Analytik Jena, Njemačka
Sustav za elektro-prijenos proteina	Mini Trans-Blot® Cell	Bio-Rad, SAD
Termoblok	Thermomixer 5436	Eppendorf, Njemačka
Uređaj za kemiluminiscenciju	C-DiGit Blot Scanner	LI-COR Biosciences – GmbH, SAD
Uređaj za provođenje reakcija PCR u stvarnom vremenu	Mic qPCR Analysis Software	Biomolecular Systems, Australija
Uređaj za reakcije PCR	GeneAmp® PCR System 2700	Thermo Fisher Scientific, SAD

Uređaj za snimanje gelova pod UV svjetlom	Kodak EDAS 290	Kodak, SAD
Vertikalna gel-elektroforeza	Mini-PROTEAN 3 Cell	Bio-Rad, SAD
Vibracijska miješalica	Vibromix	Tehtnica, Slovenija
Zibajuća miješalica	Rotoru Shake Genie	Scientific Industries, SAD

3.1 Biljni materijal, uzgoj i tretman klijanaca

Istraživanje sam proveo na modelnoj biljci uročnjak (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.), ekotip Columbia-0. Pri tome sam koristio klijance divljeg tipa (wt) uročnjaka. Klijance sam uzgojio u sterilnoj tekućoj hranjivoj podlozi u Petrijevim zdjelicama promjera 6 cm. Hranjiva podloga sadržavala je smjesu makro- i mikroelemenata definiranih prema radu Murashige i Skoog (1962), 2% (w/v) saharoze i 2,5 mM kalijeve soli 2-(N-morfolino) etansulfonske kiseline, a pH vrijednost iznosila je 5,7. Prije korištenja, hranjivu podlogu sam sterilizirao u autoklavu pri temperaturi od 121 °C i tlaku od 0,15 MPa tijekom 18 minuta.

Kako bih sterilizirao sjemenke, prvo sam u mikroepreveti od 2 mL izvagao otprilike 3,5 mg sjemenki. Jedna mikroepreveta predstavljala je jednu biološku repliku te sam s obzirom na dizajn pokusa ukupno pripremio 24 mikroeprevete sa sjemenkama koje sam zatim sterilizirao. Sterilizaciju sjemenki proveo sam u kabinetu s horizontalnim laminarnim strujanjem zraka. Postupak sterilizacije uključivao je ispiranje sjemenki u 1 mL 70%-tnog (v/v) etanola u trajanju od 1 minute, a zatim ispiranje u trajanju od 10 minuta u 1 mL unaprijed pripremljene otopine 0,1% mukazola u 1%-tnoj otopini Izosan[®] G. Nakon toga je uslijedila serija od četiri kratka ispiranja sterilnom vodom. Između svakog koraka pažljivo sam mikropipetom uklonio svaku otopinu pazeći da ne izgubim previše sjemenki. Nakon zadnjeg ispiranja vodom, u svaku mikroeprevetu dodao sam 1 mL tekuće hranjive podloge. Pomoću mikropipete, sjemenke sam zajedno s hranjivom podlogom prebacio u sterilne Petrijeve zdjelice. Kako bih ujednačio klijanje sjemenki, Petrijeve zdjelice sa sjemenkama stratificirao sam 3 dana na 4 °C. Nakon 3 dana, Petrijeve zdjelice sam premjestio u komoru za uzgoj. Uvjeti uzgoja u komori bili su uvjeti dugog dana (16 sati svjetlosti i 8 sati tame), temperatura od 24 ± 1 °C te intenzitet svjetlosti $120\text{--}130 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Klijanje sjemenki pratio sam tijekom idućih 12 dana te sam u tom periodu u Petrijeve zdjelice dodao dva puta po 1 mL tekuće hranjive podloge.

Kako bih proučio učinak kratkotrajnog toplinskog šoka na klijance uročnjaka, 12. dana uzgoja Petrijeve zdjelice s klijancima nasumično sam podijelio u dvije skupine – kontrolnu skupinu i skupinu za tretman toplinskim šokom (tretman-skupinu). Kontrolnu skupinu stavio sam u inkubator postavljen na temperaturu uzgoja (24 °C), dok sam tretman-skupinu stavio u inkubator prethodno zagrijan na 45 °C. Tretman je trajao 45 minuta, nakon čega sam obje skupine vratio u komoru za uzgoj. Unutar svake skupine ponovno sam nasumično podijelio Petrijeve zdjelice, odnosno biljni materijal. Prvu polovinu biljnog materijala sam odmah mjerio i uzorkovao (prva

vremenska točka, 1 VT), dok sam drugu polovinu ostavio u komori za uzgoj. Taj materijal mjerio sam i uzorkovao nakon oporavka u ukupnom trajanju 11 sati i 15 minuta (druga vremenska točka, 2 VT).

Prije uzorkovanja, isprao sam biljni materijal destiliranom vodom kako bih uklonio višak hranjive podloge. Odmah nakon ispiranja odvojio sam dio materijala za mjerenje fluorescencije klorofila *a*. Preostalo tkivo iskoristio sam za pripremu odvaga za analizu sadržaja H₂O₂, stupnja lipidne peroksidacije, ekspresije proteina HSP90 i RuBisCO te gena *BPM1-6*, *DREB2A* i *H5FA3*. Nakon što sam pripremio sve odvage, tkivo sam smrznuo u tekućem dušiku i pohranio u ledenicu na -80 °C do korištenja. Jedini izuzetak bilo je tkivo predviđeno za mjerenje sadržaja H₂O₂ koje sam odmah iskoristio za navedenu analizu. Isti postupak ponovio sam za obje vremenske točke – odmah nakon tretmana (1 VT) i nakon perioda oporavka (2 VT).

3.2 Mjerenje polifaznog rasta fluorescencije klorofila *a* JIP-testom

Kako bih odredio fotosintetsku učinkovitost klijanaca, izmjerio sam fluorescenciju klorofila *a* korištenjem JIP-testa. Ovaj test temelji se mjerenju fluorescencije u biljaka koje su prilagođene na uvjete tame (Strasser i sur., 2004). Zbog toga sam odmah nakon tretmana i perioda oporavka klijance premjestio na pladnjeve koji su sadržavali filter papir natopljen destiliranom vodom. Jedan pladanj predvidio sam za kontrolne klijance, a jedan za tretirane. Na filter papirima označio sam krugove koji su svojom veličinom odgovarali veličini sonde fluorimetra. Te krugove ispunio sam klijancima te sam zatim pladanj prekrrio tamnim poklopcem i odnio ga u tamnu sobu na temperaturu od 24 °C. Uzorci su bili u mraku 30 minuta kako bi se prilagodili uvjetima tame, odnosno kako bi sve molekule reakcijskih centara PSII bile u oksidiranom stanju. Nakon 30 minuta, koristeći fluorimetar, klijance sam osvijetlio pulsom plave svjetlosti koji ima gustoću toka fotona od 3000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ i maksimum emisijske svjetlosti pri valnoj duljini od 455 nm. Fluorimetar može bilježiti brze promjene fluorescencije, odnosno zabilježio je promjene nakon 50 mikrosekundi (F_0), 2 milisekunde (F_T) i 30 milisekundi (F_T) te nakon postizanja maksimalnog intenziteta fluorescencije (F_m). Pomoću računalnog programa FluorPen, koji je namijenjen obradi podataka dobivenih korištenjem fluorimetra, očitao sam i analizirao dodatne parametre koji opisuju ključna funkcionalna svojstva PSII (Tablica 3). Analiza dodatnih parametara omogućila mi je donošenje zaključaka o fotosintetskoj učinkovitosti klijanaca.

Tablica 3. Fotosintetski parametri dobiveni mjerenjem polifaznog porasta fluorescencije klorofila *a* (JIP-test), uključujući izmjerene i izračunate vrijednosti. Popis je preuzet i prilagođen prema Strasser i sur. (2000).

Parametar	Opis
F_0	intenzitet fluorescencije nakon 50 μ s
F_J	intenzitet fluorescencije nakon 2 ms
F_I	intenzitet fluorescencije nakon 30 ms
F_m	maksimalni intenzitet fluorescencije
F_v	maksimalna varijabilna fluorescencija
F_v/F_m	maksimalni kvantni prinos fotosustava II
$ABS/RC = M_0 \times (1/V_J) \times [1/(F_v/F_m)]$	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 Određivanje sadržaja vodikovog peroksida

Sadržaj H_2O_2 izmjerio sam koristeći reagens FOX prema metodi opisanoj u Máta i Hideg (2017). Metoda se temelji na oksidaciji dvovalentnih željezovih iona (Fe^{2+}) u trovalentne ione (Fe^{3+}) u prisutnosti H_2O_2 . Ioni Fe^{3+} stvaraju kompleks s bojom ksilenol narančasto, koji se može mjeriti spektrofotometrijski pri valnim duljinama u rasponu od 550 do 600 nm.

Prvo sam pripremio reagens FOX, koji je sadržavao boju ksilenol narančasto koncentracije 124 μ M, sorbitol koncentracije 99 mM i 0,248 mM amonijev željezo(II) sulfat heksahidrat otopljen u sumpornoj kiselinu koncentracije 2,5 M. Nakon izrade, reagens sam čuvao u tamnoj boci

na 4 °C. Zatim sam homogenizirao biljni materijal (oko 50 mg tkiva) u ohlađenom tarioniku s 500 µL ohlađenog 70%-tnog etanola. Dobiveni homogenat prebacio sam u mikroepruvetu od 1,5 mL, a sve mikroepruvete čuvao sam u ledu do kraja homogenizacije. Uzorke sam zatim centrifugirao 10 minuta na 4 °C pri 15000 g te sam nakon centrifugiranja supernatant prelio u čiste mikroepruvete koje sam također čuvao u ledu. Za mjerenje apsorbancije H₂O₂ pripremio sam novi set mikroepruveta od 1,5 mL. U svaku mikroepruvetu dodao sam 1000 µL reagensa FOX i 100 µL uzorka. Za mjerenje slijepe probe dodao sam 1000 µL reagensa FOX i 100 µL 70%-tnog etanola. Mikroepruvete sam kratko promiješao na vibracijskoj miješalici te inkubirao 15 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije, spektrofotometrijski sam izmjerio apsorbanciju H₂O₂ u plastičnoj kiveti pri valnoj duljini od 560 nm. Za određivanje i izračun koncentracije H₂O₂, spektrofotometrijski sam izmjerio seriju poznatih koncentracija H₂O₂. Za taj sam korak prvo pripremio otopine H₂O₂ u rasponu koncentracija od 1,82 do 72,8 µM u 70%-tnom etanolu. Zatim sam u zasebnim mikroepruvetama spojio 1000 µL reagensa FOX i 100 µL pojedine otopine H₂O₂. Dobivene otopine kratko sam promiješao, inkubirao te zatim spektrofotometrijski izmjerio apsorbanciju. Pomoću poznatih koncentracija i izmjerenih apsorbancija, u programu Excel nacrtao sam baždarnu krivulju i odredio jednadžbu pravca linearnog dijela krivulje. Koristeći jednadžbu pravca baždarnu krivulju, izračunao sam koncentraciju H₂O₂ u uzorcima. Rezultate sam izrazio kao srednje vrijednosti šest bioloških replika kontrolnih i tretiranih klijanaca, analiziranih odmah nakon tretmana (1 VT) i nakon perioda oporavka (2 VT). Vrijednosti sam izrazio u jedinicama nmol H₂O₂ po gramu svježe mase [nmol g⁻¹ svježe mase].

3.4 Određivanje stupnja lipidne peroksidacije

Stupanj lipidne peroksidacije, odnosno stupanj oštećenja membranskih lipida, odredio sam mjerenjem sadržaja MDA, koji nastaje oksidacijom nezasićenih masnih kiselina, prema metodi opisanoj u radu Hodges i sur. (1999).

Biljni materijal (oko 100 mg tkiva) homogenizirao sam u ohlađenom tarioniku koristeći 1 mL ohlađene 0,1% (w/v) TCA. Homogenat sam prebacio u mikroepruvete od 1,5 mL te centrifugirao 10 minuta pri 4 °C na 15000 g. Supernatant sam prelio u čiste mikroepruvete koje sam čuvao u ledu do trenutka mjerenja. Zatim sam pripremio dva seta mikroepruveta sa čepom na navoj. U prvi set dodao sam 250 µL supernatanta i 750 µL 0,5% (w/v) TBA otopljene u 20% (w/v) TCA. U drugi set dodao sam 250 µL supernatanta i 750 µL 20% (w/v) TCA. Otopine sam kratko

promiješao na vibracijskoj miješalici i inkubirao u termobloku na 100 °C tijekom 30 minuta. Nakon inkubacije, mikroeprevete sam stavio u led na 5 minuta, zatim ih centrifugirao 5 minuta pri 4 °C na 15000 g te dobiveni supernatant prelio u čiste mikroeprevete. Apsorbanciju uzoraka izmjerio sam spektrofotometrijski u plastičnim kivetama pri valnim duljinama od 440 nm, 532 nm i 600 nm. Za set uzoraka s TBA koristio sam slijepu probu koja je sadržavala 250 µL 0,1% TCA i 750 µL 0,5% TBA u 20% TCA, dok sam za set uzoraka s TCA koristio slijepu probu koja je sadržavala 250 µL 0,1% TCA i 750 µL 20% TCA. Stupanj lipidne peroksidacije izračunao sam koristeći formule opisane u radu Hodges i sur. (1999):

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

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

$$\text{Stupanj lipidne peroksidacije} = (A-B)/\varepsilon \times l \times V_{r.s.} \times V_{eks.} / V_{uz.} \times m \times 10^6$$

$A_{440 +TBA}, A_{532 +TBA},$ $A_{600 +TBA}$	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) koeficijenata saharoze (koncentracija 1-10 mol L ⁻¹) pri valnim duljinama od 532 i 440 nm
ε	molarni apsorpcijski koeficijent MDA (157000 mol L ⁻¹ cm ⁻¹)
l	duljina optičkog puta (1 cm)
$V_{r.s.}$	volumen reakcijske smjese (1000 µL)
$V_{eks.}$	volumen ekstrakcijskog pufera (1000 µL)
$V_{uz.}$	volumen uzorka (250 µL)
m	masa tkiva [g]

Rezultate analize stupnja lipidne peroksidacije izrazio sam kao srednje vrijednosti šest bioloških replika kontrolnih i tretiranih klijanaca, analiziranih odmah nakon tretmana (1 VT) i nakon perioda oporavka (2 VT). Vrijednosti sam izrazio u jedinicama nmol MDA po gramu svježe mase [nmol g⁻¹ svježe mase].

3.5 Imunodetekcija proteina HSP90 i RuBisCO

3.5.1 Ekstrakcija i mjerenje ukupnih topivih proteina

Za imunodetekciju proteina HSP90 i RuBisCO, prvo sam ekstrahirao ukupne topive proteine korištenjem pufera Tris-HCl pH vrijednosti 8,0 (Staples i Stahmann, 1964). Pufer je sadržavao Tris koncentracije 0,1 M, saharozu koncentracije 0,5M, ditionitrol (engl. *dithiothreitol* -DTT) koncentracije 6,5 mM i cistein-HCl koncentracije 8,25 mM. Biljni materijal (oko 50 mg tkiva) homogenizirao sam u hladnom tarioniku dodavanjem 500 μ L ekstrakcijskog pufera. Homogenat sam prelio u mikroeprovete od 1,5 mL te centrifugirao 30 minuta na 4 °C pri 20000 g. Dobiveni supernatant prelio sam u čiste mikroeprovete i čuvao u ledu do mjerenja koncentracije topivih proteina.

Za mjerenje koncentracije ukupnih topivih proteina ekstrahiranih u puferu Tris-HCl koristio sam metodu po Bradfordu (Bradford, 1976). Prvo sam napravio matičnu otopinu koja je sadržavala 350 mg boje Coomassie Brilliant Blue G-250 otopljene u 100 mL 96%-tnog etanola i 200 mL 88%-tne fosforne kiseline. Zatim sam uzeo 30 mL matične otopine za izradu radne otopine, u koju sam dodao i 30 mL 88%-tne fosforne kiseline, 15 mL 96%-tnog etanola i 425 mL destilirane vode. Kako bih odredio koncentraciju proteina, u mikroeprovete od 1,5 mL dodao sam 1000 μ L radne otopine boje Coomassie Brilliant Blue G 250 i 50 μ L pojedinog uzorka. Smjesu sam kratko promiješao na vibracijskoj miješalici i inkubirao 10 minuta na sobnoj temperaturi, nakon čega sam je prelio u plastičnu kivetu i spektrofotometrijski izmjerio apsorbanciju uzorka pri 595 nm. Slijepa proba sastojala se od 50 μ L ekstrakcijskog pufera i 1000 μ L radne otopine. Za određivanje koncentracije proteina, spektrofotometrijski sam izmjerio seriju poznatih koncentracija albumina goveđeg seruma (engl. *bovine serum albumin* -BSA). Za taj sam korak prvo pripremio otopine BSA u rasponu koncentracija od 0,1 do 0,8 mg mL⁻¹ u puferu Tris-HCl. Zatim sam u zasebnim mikroeprevetama spojio 1000 μ L radne otopine boje Coomassie Brilliant Blue G 250 i 50 μ L pojedine otopine BSA. Dobivene otopine kratko sam promiješao, inkubirao te zatim spektrofotometrijski izmjerio apsorbanciju. Pomoću poznatih koncentracija i izmjerenih apsorbancija, u programu Excel nacrtao sam baždarnu krivulju i odredio jednadžbu pravca linearnog dijela krivulje. Koncentraciju proteina izračunao sam koristeći jednadžbu pravca, a rezultate sam izrazio u miligramima proteina po mililitru ekstrakcijskog pufera [mg mL⁻¹].

3.5.2 Razdvajanje proteina poliakrilamid-gel elektroforezom u denaturirajućim uvjetima

Nakon što sam odredio koncentraciju ukupnih topivih proteina u uzorcima, proteine sam razdvojio korištenjem diskontinuirane elektroforeze SDS-PAGE.

U prvom koraku ujednačio sam koncentraciju topivih proteina u svim uzorcima tako što sam uzorke razrijedio ekstrakcijskim puferom na vrijednost najniže izmjerene koncentracije. Zatim sam u drugom koraku denaturirao proteine izolirane u puferu Tris-HCl korištenjem pufera LSB, koji se sastojao od otopine Tris-HCl koncentracije 87,5 mM i pH vrijednosti 6,8 te 45% glicerola, 12,5% 2-merkaptoetanol, 2% (w/v) SDS i 0,0125% (w/v) boje bromfenol modnilo. Kako bih denaturirao uzorke, u mikroeprovete od 1,5 mL dodao sam 20 μ L uzorka i 20 μ L pufera LSB. Smjesu sam kratko promiješao na vibracijskoj miješalici te inkubirao 5 minuta u prethodno zagrijanom termobloku na 95 °C, nakon čega sam mikroeprovete držao u ledu 5 minuta. Prije nanošenja na gel, uzorke sam ponovno kratko promiješao na vibracijskoj miješalici.

Kao što sam već spomenuo, za razdvajanje proteina koristio sam diskontinuiranu elektroforezu, koju čine dva gela – gel za sabijanje i gel za razdvajanje. Gelove sam pripremio u sustavu za vertikalnu gel-elektroforezu. Prvo sam pripremio smjesu za gel za razdvajanje (12%) miješanjem 3,35 mL destilirane vode, 2,50 mL otopine Tris-HCl koncentracije 1,5 M i pH vrijednosti 8,8 te 4,00 mL otopine akrilamid/bis-akrilamid (T = 30%, C = 2,66%), 100 μ L 10% (w/v) SDS, 100 μ L 10% (w/v) amonij persulfata (APS) i 10 μ L tetrametiletildiamina (TEMED). Tu smjesu ulio sam između dviju staklenih ploča pripremljenih za elektroforezu. Nakon što je smjesa polimerizirala, tj. formirala gel za razdvajanje, pripremio sam smjesu za gel za sabijanje (4%) miješanjem 3,05 mL destilirane vode, 1,25 mL otopine Tris-HCl koncentracije 0,5 M i vrijednosti pH 6,8 te 665 μ L otopine akrilamid/bis-akrilamid (T = 30%, C = 2,66%), 50 μ L 10% (w/v) SDS, 50 μ L 10% (w/v) APS i 10 μ L TEMED. Smjesu sam ulio na gel za razdvajanje te umetnuo „češalj“ za formiranje jažica. Nakon polimerizacije uklonio sam „češalj“ i u jažice nanio uzorke. U prvu jažicu nanio sam 5 μ L biljega molekulske masa za proteine s rasponom masa od 10 do 180 kDa, dok sam u preostale jažice nanio uzorke. S obzirom da sam prethodno ujednačio koncentraciju svih uzoraka, u svaku jažicu nanio sam 12 μ L uzorka, što je odgovaralo masi od 4 μ g proteina. Elektroforezu sam proveo na sobnoj temperaturi u elektrodnom puferu pH vrijednosti 8,3, koji je sadržavao otopinu Tris u koncentraciji 25 mM, glicin u koncentraciji 192 mM i 0,1% (w/v) SDS. Prvih 30 minuta elektroforezu sam provodio pri naponu od 100 V, sve dok uzorci nisu prošli gel za sabijanje. Zatim sam napon povišao na 200 V te je elektroforeza u tim uvjetima

trajala još 45 do 60 minuta. Proces sam zaustavio kad je boja bromfenol modriilo došla do donjeg ruba gela za razdvajanje.

3.5.3 Western blot analiza

Nakon provedene gel-elektroforeze u poliakrilamidnom gelu, proveo sam elektro-prijenos proteina na nitroceluloznu membranu (Western blot analiza) koristeći sustav za prijenos proteina. Pri tome sam veliku staklenu Petrijevu zdjelicu napunio puferom za prijenos (pH 8,3) koji je sadržavao otopinu Tris u koncentraciji 28 mM, glicin u koncentraciji 192 mM i 10% (v/v) metanola. U zdjelici s puferom sastavio sam kazetu za prijenos proteina koja je redom uključivala spužvicu, filter papir, gel s razdvojenim proteinima, nitroceluloznu membranu, filter papir i spužvicu. Prije zatvaranja kazete, nježno sam prešao po gornjoj spužvici staklenom epruветom kako bih istisnuo mjehuriće zraka i poboljšao priljublivanje membrane i gela. Zatim sam kazetu za prijenos umetnuo u sustav za elektro-prijenos, orijentirajući membranu prema pozitivnoj elektrodi. U sustav sam zatim dodao posudu s ledom, a kadnicu sam vrhom napunio ohlađenim puferom za prijenos. Prijenos je u takvim uvjetima trajao sat vremena pri 60 V.

Kako bih provjerio uspješnost prijenosa proteina s gela na membranu, membranu sam obojao bojom Ponceau S, a koju sam pripremio otapanjem 5 mg boje u 100 mL 5% (v/v) octene kiseline. Prema bilježu molekulskih masa otprilike sam odredio položaj proteina HSP90 i RuBisCO na membrani te sam membranu izrezao na dva dijela – jedan dio sadržavao je protein HSP90, a drugi protein RuBisCO. Obje membrane isprao sam u destiliranoj vodi kako bih uklonio suvišak boje Ponceau S. Zadnje ispiranje bilo je u puferu 1× TBS-T (engl. *Tris-buffered saline-Tween*) pH vrijednosti 7,5, a koji se sastojao od otopine Tris koncentracije 20 mM, natrijevog klorida koncentracije 150 mM i 1% (v/v) Tween 20.

Nakon što sam uklonio boju, membrane sam inkubirao u otopini za blokiranje koja se sastojala od 5% (w/v) mlijeka u prahu pripremljenog u puferu 1× TBS-T. Blokiranje je trajalo sat vremena na sobnoj temperaturi, uz kontinuirano zibanje na miješalici. Nakon blokiranja, membrane sam isprao dva puta po 5 minuta u puferu 1× TBS-T. Membrane sam zatim stavio u prethodno pripremljene otopine koje su sadržavale primarna protutijela. Membranu s proteinom HSP90 stavio sam u otopinu koja je sadržavala kunićji anti-HSP90 pripremljen u omjeru 1:3000 u otopini za blokiranje, dok sam membranu s proteinom RuBisCO stavio u otopinu koja je sadržavala kunićji anti-rbcL pripremljen u omjeru 1:4000 u otopini za blokiranje. Obje membrane

inkubirao sam preko noći na 4 °C. Nakon inkubacije, membrane sam ponovno isprao dva puta po 5 minuta u puferu 1× TBS-T. Potom sam membrane inkubirao sat vremena u otopini za blokiranje u koju sam dodao sekundarno antitijelo obilježeno enzimom peroksidaza iz hrena (engl. *horseradish peroxidase*, HRP). Sekundarno antitijelo pripremio sam u otopini za blokiranje u omjeru 1:10000. Nakon inkubacije sa sekundarnim antitijelom, membrane sam ponovno isprao dva puta po 5 minuta u puferu 1× TBS-T. Zatim sam proveo detekciju proteina upotrebom kemiluminiscentnog supstrata. Ovaj supstrat reagira s enzimom HRP pri čemu nastaje kemiluminiscentni signal koji sam očitao pomoću uređaja za kemiluminiscenciju. Dobivene slike analizirao sam u programu ImageJ (NIH Image).

Koristeći program ImageJ, izračunao sam postotak zasićenosti slike, odnosno membrana kako bih kvantificirao ekspresiju proteina HSP90 i RuBisCO te sam dobivene rezultate prikazao grafički.

3.6 Analiza ekspresije gena *BPM*, *DREB2A* i *HSFA3*

3.6.1 Izolacija ukupne RNA

Kako bih analizirao ekspresiju gena od interesa, prvo sam morao izolirati ukupnu RNA iz svojih uzoraka. Uzorke sam nakon uzorkovanja, zajedno sa staklenim kuglicama za homogenizaciju pohranio u mikroeprovete od 1,5 mL u ledenicu na -80 °C. Za izolaciju ukupne RNA, uzroke sa staklenim kuglicama sam izvadio iz ledenice te ih homogenizirao uz pomoć homogenizatora dva puta po 8 sekundi pri frekvenciji od 50 Hz. Da spriječim otapanje tkiva i degradaciju RNA, uzorke sam čitavo vrijeme te između dviju homogenizacija čuvao u tekućem dušiku.

Za izolaciju RNA koristio sam komercijalni paket za izolaciju RNA prema uputama proizvođača. Nakon homogenizacije tkiva, u mikroeprovete sam dodao 550 µL pufera za lizu stanica (Lysis Buffer, iz paketa) uz dodatak otopine DTT koncentracije 40 mM i 2% (w/v) polivinilpolipirrolidona (PVPP). Mikroeprovete sam zatim promiješao na vibracijskoj miješalici 20 sekundi, nakon čega sam ih kratko centrifugirao kako bih sakupio kapljice zaostale na čepu mikroeproveta. Uzorke sam potom inkubirao 5 minuta u prethodno zagrijanom termobloku na temperaturi od 56 °C. Nakon inkubacije, uzorke sam centrifugirao 10 minuta pri 16000 g na sobnoj temperaturi. Mikropipetom sam prenio 400 µL supernatanta, koji sadrži ukupnu RNA, u

mikroeprevetu od 1,5 mL te sam dodao 25 μ L magnetnih kuglica za vezanje RNA (iz paketa), koje sam prethodno promiješao na vibracijskoj miješalici. Otopini sam dodao 400 μ L 96% etanola, promiješao je na vibracijskoj miješalici i kratko centrifugirao. Mikroeprevete sam zatim stavio na magnetni stalak na 2 minute kako bi se magnetne kuglice s vezanom RNA priljubile uz rub mikroepreveta. Nakon 2 minute pažljivo sam uklonio supernatant mikropipetom, pazeći da ne povučem nakupinu kuglica. Maknuo sam mikroeprevete s magnetnog stalka te sam u svaku mikroeprevetu dodao 700 μ L otopine za ispiranje (*Wash Solution 1*, iz paketa). Mikroeprevete sam promiješao na vibracijskoj miješalici i kratko centrifugirao. Nakon centrifugiranja, vratio sam ih na magnetni stalak te nakon 2 minute uklonio supernatant mikropipetom. Mikroeprevete sam ostavio otvorene 5 minuta kako bi ispario etanol iz otopine za ispiranje. Tijekom tih 5 minuta pripremio za otopinu za uklanjanje zaostale genomske DNA iz uzoraka. Otopina je sadržavala kemikalije iz komercijalnog paketa – 100 μ L otopine $2\times$ *DNase I Buffer*, 4 μ L otopine *DNase I Solution*, 20 μ L otopine manganovog klorida i 76 μ L sterilne vode. Svakom uzorku dodao sam 200 μ L prethodno pripremljene otopine te sam uzorke inkubirao 15 minuta u termobloku zagrijanom i namještenom na 37 °C i 350 rpm. Nakon inkubacije, uzorke sam kratko centrifugirao te dodao 150 μ L otopine za vezanje RNA (*Rebinding Buffer*, iz paketa) i 400 μ L 96% etanola. Kratko sam ih promiješao, centrifugirao i ponovno stavio na magnetni stalak. Nakon 2 minute uklonio sam supernatant i dodao 700 μ L otopine za ispiranje (*Wash Solution 1*, iz paketa). Uzorke sam maknuo sa stalka, promiješao, centrifugirao te nakon nove 2 minute na magnetnom stalku uklonio supernatant. Ovaj postupak ponovio sam još dva puta, ali ovog puta koristeći 700 μ L druge otopine za ispiranje (*Wash Solution 2*, iz paketa). Zatim sam ostavio mikroeprevete otvorene 5 minuta kako bi etanol iz otopine za ispiranje ispario. Nakon 5 minuta, uzorke sam maknuo s magnetnog stalka i u svaki uzorak dodao 50 μ L sterilne vode bez nukleaza. Kratko sam ih promiješao i centrifugirao te vratio na magnetni stalak. Nakon 2 minute, prebacio sam supernatant u nove mikroeprevete. Kako bih izmjerio koncentraciju izolirane RNA i provjerio njenu čistoću koristio sam mikrovolumni spektrofotometar.

3.6.2 Reverzna transkripcija RNA

Kako bih prepisao izoliranu RNA u komplementarnu cDNA (cDNA) koristio sam metodu reverzne transkripcije. Za provedbu metode, u svaku mikroeprijetu od 1,5 mL dodao sam 1 µg ukupne RNA. Stoga sam prvo izračunao koliki volumen izolirane RNA moram dodati s obzirom na izmjerenu koncentraciju RNA u uzorcima. U svaku mikroeprijetu dodao sam, osim određenog volumena izolirane RNA, i sterilnu vodu. Pri tome sam pazio da ukupni volumen RNA i sterilne vode ne prijeđe 13 µL. Zatim sam svakom uzorku dodao 1,5 µL smjese koju sam pripremio miješanjem 0,5 µL početnica Oligo(dT) i 1 µL mješavine nukleotida dNTP koncentracije 10 mM. Uzorke sam promiješao, kratko centrifugirao te zatim inkubirao 5 minuta na 65 °C u uređaju za PCR. Nakon 5 minuta, uređaj je ohladio uzorke na 4 °C te sam svakom uzorku dodao novu smjesu. Ova smjesa sadržavala je 4 µL pufera 5× *Reaction Buffer*, 0,5 µL otopine *RiboLock RNase Inhibitor* i 1 µL enzima *RevertAid H Minus Reverse Transcriptase*. Uzorke sam ponovno promiješao, centrifugirao te vratio u uređaj na daljnju inkubaciju – 45 minuta na 42 °C te 15 minuta na 70 °C. Po završetku reverzne transkripcije, sve uzorke sam razrijedio u sterilnoj vodi. Pri tome sam u obzir uzeo masu korištene RNA (1 µg), ukupni volumen dobivene cDNA (20 µL) i željenu koncentraciju cDNA (10 ng µL⁻¹). Uzorke sam čitavo vrijeme čuvao na 4 °C.

3.6.3 Provjera čistoće dobivene cDNA

Provjeru čistoće dobivene cDNA i moguću kontaminaciju genomskom DNA proveo sam umnažanjem fragmenta gena *ACT3* (engl. *Actin 3*) lančanom reakcijom polimeraze (metoda PCR). U mikroeprijetu od 200 µL dodao sam 23 µL smjese za PCR koja je sadržavala 12,5 µL otopine 2× *EmeraldAmp MAX PCR Master Mix*, 9,5 µL sterilne vode, 0,5 µL nizvodne početnice (5'-CTGGCATCATACTTTCTACAATG-3') i 0,5 µL uzvodne početnice (5'-CACCCTGAGCACAATGTTAC-3'), obje koncentracije 10 µM. Smjesi sam dodao i 2 µL cDNA pojedinog uzorka. Pozitivna kontrola sadržavala je 23 µL smjese za PCR i 2 µL genomske DNA (ustupila dr. sc. Mirta Tokić, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu), dok je negativna kontrola sadržavala 23 µL smjese za PCR i 2 µL sterilne vode. Sve uzorke dobro sam promiješao, centrifugirao i stavio u uređaj za PCR na umnažanje. Cikluse sam namjestio kako slijedi – 1 ciklus od 3 minute na 98 °C, 35 ciklusa od 10 sekundi na 98 °C, 30 sekundi na 56 °C i 1 minutu na 72 °C, te naposljetku 1 ciklus od 7 minuta na 72 °C.

Umnožene fragmente provjerio sam agaroznom gel-elektroforezom. Napravio sam 2% (w/v) agarozni gel u puferu $1 \times$ TAE koji je sadržavao otopinu etilendiamintetraoctene kiseline (engl. *ethylenediaminetetraacetic acid*-EDTA) koncentracije 1 mM pripremljenu u otopini Tris-acetata koncentracije 40 mM i pH vrijednosti 8,0. U jažice gela nanio sam 3 μ L biljega molekulskih masa za DNA te po 5 μ L pojedinog uzorka, odnosno pozitivne i negativne kontrole. Elektroforezu sam proveo na 25 V tijekom prvih 5 minuta, nakon čega sam povećao napon na 100 V sljedećih pola sata. Elektroforezu sam zaustavio kad su uzorci stigli do dna gela. Kako bih vizualizirao fragmente, gel sam inkubirao 15 minuta u otopini etidij bromida koncentracije 10 ng L⁻¹ na 4 °C. Nakon 15 minuta, gel sam 2 sekunde izložio UV svjetlosti, a zatim ga fotografirao. Očekivana veličina fragmenata umnoženih genomskom DNA iznosila je 733 parova baza (bp), dok je veličina fragmenata umnoženih cDNA iznosila 650 bp.

3.6.4 Kvantifikacija ekspresije gena

Ekspresiju gena *BPM1-6*, *DREB2A* i *HSFA3* proveo sam koristeći kvantitativni PCR (qPCR) u uređaju za PCR u stvarnom vremenu. Kao endogene kontrole koristio sam dva gena – *OGIO* (engl. *2-oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase superfamily protein*) i *PUX7* (engl. *plant UBX domain-containing protein 7*). Škiljaica i sur. (2022) predložili su ove gene kao najbolje endogene kontrole za klijance uročnjaka u istraživanjima učinka toplinskog stresa.

U mikroepruvetama od 200 μ L pripremio sam reakcijsku smjesu za svaki gen, koja je sadržavala 0,3 μ L uzvodne i 0,3 μ L nizvodne početnice specifične za taj gen (Tablica 4), obje koncentracije 10 μ M, 4,9 μ L sterilne vode te 7,5 μ L otopine $2 \times$ GoTaq® qPCR MasterMix. U smjesu sam dodao 2 μ L cDNA i dobro promiješao. Svaki uzorak napravio sam u dvije tehničke replike. Negativna kontrola sadržavala je smjesu za qPCR i sterilnu vodu. Cikluse sam namjestio kako slijedi – 1 ciklus od 5 minuta na 95 °C te 40 ciklusa od 5 sekundi na 95 °C i 10 sekundi na 60 °C. Nakon završetka umnažanja, specifičnost dobivenih fragmenata provjerio sam analizom krivulja taljenja. Krivulje su generirane postupnim zagrijavanjem od 50 °C do 95 °C, pri brzini porasta temperature od 0,5 °C po sekundi.

Tablica 4. Početnice korištene za umnažanje gena od interesa kvantitativnim PCR-om u stvarnom vremenu. Efikasnost početnica izračunata je pomoću računalnog programa uređaja za PCR u stvarnom vremenu.

Naziv gena	Pristupni broj	Sekvenca 5' → 3'(nizvodno/uzvodno)	Efikasnost početnica	Literaturni navod
<i>BPM1</i>	At5g19000	CCCGGTTGCACTGAATGGGA / ACG ATTCATTGTACTTGCTAGATCCGATT	0,88	Škiljaica i sur. (2020)
<i>BPM2</i>	At3g06190	TCTATCCGGGTAATAAGATCGAAGA / CCTTGGAACCCTAATTGTGTC	0,72	Škiljaica i sur. (2020)
<i>BPM3</i>	At2g39760	AGTGATAGACGACATCGAACCT / CAAGGTCATAGAGGTCAGCA	0,84	Škiljaica i sur. (2020)
<i>BPM4</i>	At3g03740	GAAGTTACTGACATGGAGCCT / CACTGACTCGCACATTAGAC	0,71	Škiljaica i sur. (2020)
<i>BPM5</i>	At5g21010	CGTTTGCCTTAAGTTTACTGCC / ACTGTTACTACCTTCCTCGTG	0,87	Škiljaica i sur. (2020)
<i>BPM6</i>	At3g43700	AAGGGTCAGGCAGCGAACCA / CCGCTTCCCTTTCATTTCGGTACA	0,96	Lechner i sur. (2011)
<i>PUX7</i>	At1g14570	GTTTCTCAGACTATCAAAGCCA / ATCAATTACAAGCACCACGG	0,70	Škiljaica i sur. (2022)
<i>OGIO</i>	At5g51880	ATCCAAGAGCAGTTCAAGCAAG / GAGAGCCATACCTTCCACTG	0,91	Škiljaica i sur. (2022)
<i>DREB2A</i>	At5g05410	CAGTGTGCCAACGGTTCAT / AAACGGAGGTATTCCGTAGTTGAG	0,94	Škiljaica i sur. (2022)
<i>HSFA3</i>	At5g03720	AGTTTGCAGCAATCATACTTCCA / AGCAAGTTTGGTTGGATTGTGG	0,78	Škiljaica i sur. (2022)

3.6.5 Analiza ekspresije gena

Ekspresiju gena od interesa (ΔCt) izračunao sam pomoću sljedećih formula (Vandesompele i sur., 2002; Pfaffl, 2004):

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

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

$$C = (1 + \text{srednja vrijednost efikasnosti početnica za endogenu kontrolu 2})^{Ct \text{ endogene kontrole II}}$$

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

$$\Delta Ct = D/A$$

Kao endogene kontrole koristio sam gene *OGIO* i *PUX7*, a promjene u ekspresiji gena uslijed tretmana pratio sam u genima *DREB2A*, *HSFA3* i *BPM1-6*. Srednja vrijednost početnica za endogenu kontrolu ili gen od interesa izračunata je pomoću računalnog programa uređaja za PCR u stvarnom vremenu (Tablica 4).

Relativnu promjenu ekspresije odabranih gena ($\Delta\Delta Ct$) izračunao sam normalizacijom vrijednosti ΔCt u tretiranim klijancima u odnosu na vrijednosti u kontrolnim klijancima za svaki pojedini gen od interesa. S obzirom da sam u istraživanju za svaku biološku repliku koristio dvije tehničke replike, izračunao sam geometrijsku sredinu dviju tehničkih replika za svaku biološku repliku. Dobivene vrijednosti izrazio sam kao srednju vrijednost tri biološke replike, pri čemu je jedna biološka replika predstavljala otprilike 30 mg svježe mase klijanaca pojedine skupine.

3.7 Statistička obrada podataka

Za obradu podataka dobivenih u ovom istraživanju koristio sam računalni program Microsoft Excel 2016. Podatke sam prikazao kao srednje vrijednosti tri do šest bioloških replika, ovisno o korištenoj metodi. Odstupanja od srednje vrijednosti izrazio sam kao standardnu pogrešku. Statističku analizu podataka proveo sam korištenjem online alata *Statistics Kingdom* (<https://www.statskingdom.com/>). Kako bih odredio postoji li statistički značajna razlika između kontrolnih i tretiranih uzoraka na kratkotrajni temperaturni šok proveo sam Studentov *t*-test za nezavisne uzorke. Prije provođenja *t*-testa, testirao sam distribuciju i varijancu podataka korištenjem Shapiro-Wilkov *W* testa, odnosno Levenovog testa. Za *p* vrijednost veću od 0,05 ($p > 0,05$) smatrao sam da su podaci normalno distribuirani, varijanca jednaka te da ne postoji statistički značajna razlika između analiziranih grupa podataka.

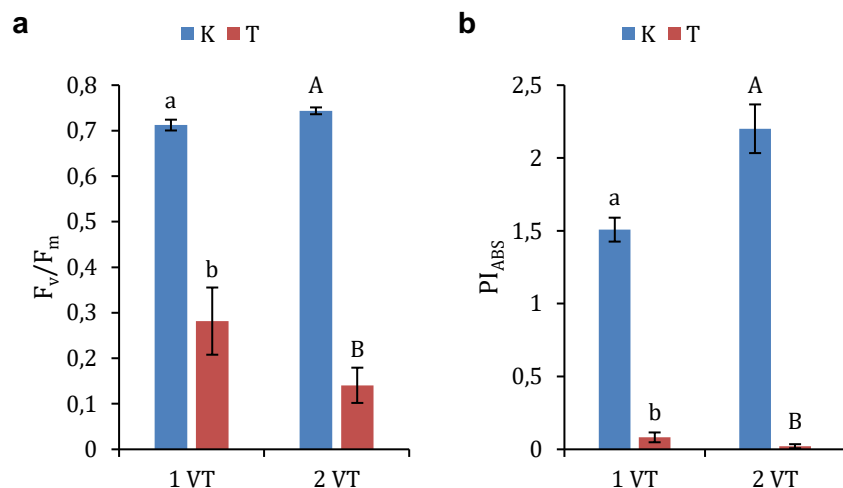
4. Rezultati

U okviru ovog istraživanja proučavao sam utjecaj kratkotrajnog toplinskog šoka na klijance divljeg tipa uročnjaka. Pri tome sam učinak toplinskog šoka istražio u dvije vremenske točke – odmah nakon tretmana (1 VT) i nakon oporavka na temperaturi uzgoja (2 VT). U svakoj vremenskoj točki analizirao sam učinkovitost fotosinteze mjerenjem polifaznog rasta fluorescencije klorofila *a*. Također, analizirao sam sadržaj H₂O₂ i stupanj lipidne peroksidacije mjerenjem sadržaja MDA. Naposljetku sam proveo detekciju proteina HSP90 i RuBisCO te odredio ekspresiju gena *BPM1-6*, *DREB2A* i *HSFA3*.

4.1 Fluorescencija klorofila *a*

Mjerenje polifaznog rasta fluorescencije klorofila *a* u biljaka izloženih kratkotrajnom toplinskom šoku proveo sam koristeći JIP-test. U ovom radu fokusirao sam se na najčešće korištene parametre dobivene JIP-testom: F_v/F_m , PI_{ABS} , ABS/RC , TR_0/RC , ET_0/RC i DI_0/RC .

Odmah nakon tretmana, ali i nakon oporavka na temperaturi uzgoja, tretirani klijanci pokazali su značajno smanjenje vrijednosti parametara F_v/F_m i PI_{ABS} u usporedbi s odgovarajućom kontrolom (Slika 1 a, b). Kod tretiranih klijanaca zabilježeno je značajno povećanje vrijednosti parametara ABS/RC i DI_0/RC u obje vremenske točke (Tablica 5). Naprotiv, značajno povećanje vrijednosti parametra TR_0/RC u tretiranim klijancima zabilježeno je samo u prvoj vremenskoj točki, dok je kod parametra ET_0/RC značajni pad vrijednosti zabilježen u drugoj vremenskoj točki.



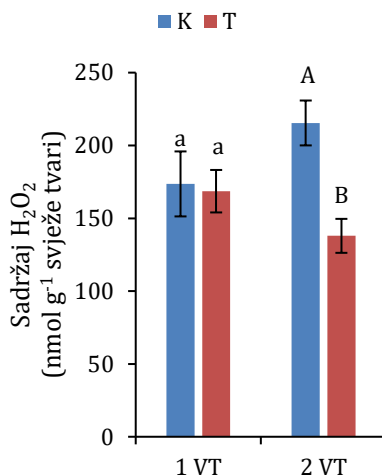
Slika 1. (a) Maksimalni kvantni prinos fotosustava II (F_v/F_m) i (b) indeks fotosintetske učinkovitosti (PI_{ABS}) u tretiranih (T) i kontrolnih (K) klijanaca divljeg tipa uročnjaka (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.). Klijaneci su analizirani odmah nakon izlaganja kratkotrajnom toplinskom šoku (1 VT) i nakon oporavka na temperaturi uzgoja (2 VT). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti četiri do šest bioloških replika \pm standardna pogreška. Različita slova iznad stupaca označavaju statistički značajnu razliku između skupina K i T (Studentov t -test, $p \leq 0,05$), pri čemu se mala slova odnose na 1 VT, a velika slova na 2 VT.

Tablica 5. Apsorpcija fotona po aktivnom reakcijskom centru (ABS/RC), protok uhvaćenih fotona po aktivnom reakcijskom centru (TR_0/RC), prijenos elektrona po aktivnom reakcijskom centru (ET_0/RC) i rasipanje energije po aktivnom reakcijskom centru (DI_0/RC) u tretiranih (T) i kontrolnih (K) klijanaca divljeg tipa uročnjaka (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.). Klijaneci su analizirani odmah nakon izlaganja kratkotrajnom toplinskom šoku (1 VT) i nakon oporavka na temperaturi uzgoja (2 VT). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti četiri do šest bioloških replika \pm standardna pogreška. Različita slova uz rezultate označavaju statistički značajnu razliku između skupina K i T (Studentov t -test, $p \leq 0,05$), pri čemu se mala slova odnose na 1 VT, a velika slova na 2 VT.

Vremenska točka	Skupina	ABS/RC	TR_0/RC	ET_0/RC	DI_0/RC
1 VT	K	3 ± 0.09 b	2 ± 0.07 b	1 ± 0.05 a	1 ± 0.04 b
	T	10 ± 2.69 a	3 ± 0.36 a	2 ± 3.21 a	7 ± 2.26 a
2 VT	K	3 ± 0.07 B	2 ± 0.06 A	1 ± 0.04 A	1 ± 0.03 B
	T	19 ± 5.57 A	2 ± 0.08 A	0.5 ± 0.24 B	17 ± 5.60 A

4.2 Sadržaj vodikovog peroksida

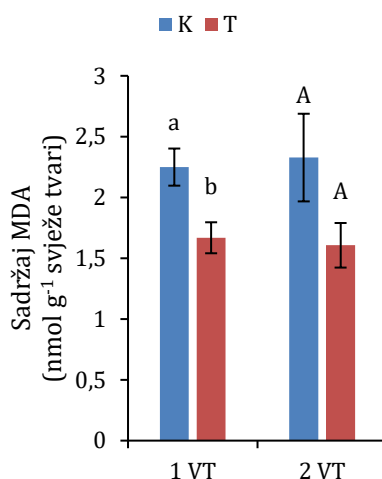
Analizom sadržaja H_2O_2 u klijancima divljeg tipa uročnjaka nisam uočio statistički značajnu razliku između tretiranih i kontrolnih klijanaca odmah nakon tretmana (Slika 2). Nasuprot tome, nakon perioda oporavka uočio sam značajno niži sadržaj H_2O_2 u tretiranim klijancima u usporedbi s kontrolom.



Slika 2. Sadržaj vodikovog peroksida (H_2O_2) u tretiranih (T) i kontrolnih (K) klijanaca divljeg tipa uročnjaka (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.). Klijanci su analizirani odmah nakon izlaganja kratkotrajnom toplinskom šoku (1 VT) i nakon oporavka na temperaturi uzgoja (2 VT). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti četiri do šest bioloških replika \pm standardna pogreška. Različita slova iznad stupaca označavaju statistički značajnu razliku između skupina K i T (Studentov t -test, $p \leq 0,05$), pri čemu se mala slova odnose na 1 VT, a velika slova na 2 VT.

4.3 Stupanj lipidne peroksidacije

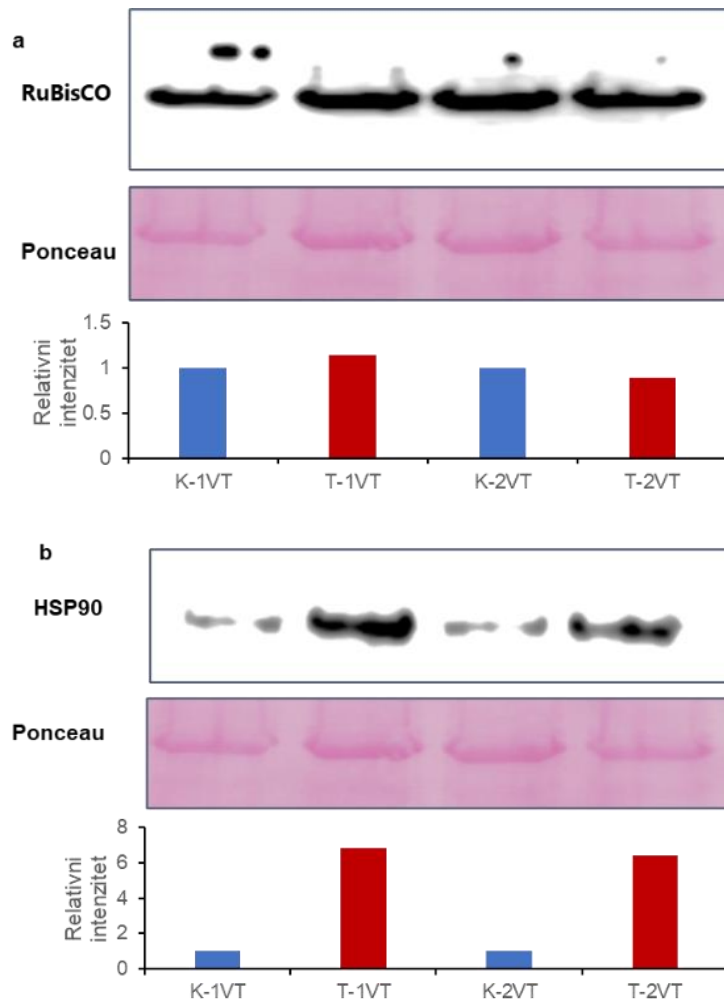
Stupanj lipidne peroksidacije odredio sam mjerenjem sadržaja malondialdehida (MDA). Analiza sadržaja MDA nakon izlaganja biljaka kratkotrajnom toplinskom šoku pokazala je značajno smanjenje sadržaja MDA u tretiranih klijanaca odmah nakon tretmana (Slika 3). Iako je isti trend bio vidljiv i nakon oporavka, nisam zabilježio statistički značajnu razliku u sadržaju MDA između tretiranih i kontrolnih klijanaca.



Slika 3. Stupanj lipidne peroksidacije izražen kao sadržaj malondialdehida (MDA) u tretiranih (T) i kontrolnih (K) klijanaca divljeg tipa uročnjaka (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.). Klijanci su analizirani odmah nakon izlaganja kratkotrajnom toplinskom šoku (1 VT) i nakon oporavka na temperaturi uzgoja (2 VT). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti četiri do šest bioloških replika \pm standardna pogreška. Različita slova iznad stupaca označavaju statistički značajnu razliku između skupina K i T (Studentov *t*-test, $p \leq 0,05$), pri čemu se mala slova odnose na 1 VT, a velika slova na 2 VT.

4.4 Imunodetekcija proteina HSP90 i RuBisCO

U okviru ovog rada proveo sam imunodetekciju dvaju proteina – HSP90 i RuBisCO. Analiza ekspresije proteina RuBisCO (Slika 4a) pokazala je da kratkotrajni toplinski šok nije značajno utjecao na ekspresiju ovog proteina, neovisno o vremenskoj točki analize (odmah nakon tretmana ili nakon oporavka). S druge strane, uočio sam značajno povećanje ekspresije proteina HSP90 u tretiranih klijanaca (Slika 4b). Povećanje je bilo vidljivo u obje vremenske točke – odmah nakon tretmana i nakon oporavka.



Slika 4. Ekspresija proteina **(a)** RuBisCO i **(b)** HSP90 u tretiranih (T) i kontrolnih (K) klijanaca divljeg tipa uročnjaka (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.). Klijanca su analizirani odmah nakon izlaganja kratkotrajnom toplinskom šoku (1 VT) i nakon oporavka na temperaturi uzgoja (2 VT). Ekspresija proteina izražena je kao relativna vrijednost (relativni intenzitet) u odnosu na K-1 VT, odnosno K-2 VT (=1). Za kontrolu nanošenja uzoraka membrane su obojane bojom Ponceau.

4.5 Uspješnost izolacije ukupne RNA i sinteze cDNA

4.5.1 Koncentracija i čistoća RNA nakon izolacije

Kako bih analizirao ekspresiju gena *DREB2A*, *BPM1-6*, i *HSFA3* izolirao sam ukupnu RNA iz tretiranih i kontrolnih klijanaca. Koncentracije izolirane RNA kretale su se u rasponu od 20,08 do 74,5 ng μL^{-1} (Tablica 6). Čistoća izolirane RNA izračunata je prema omjerima apsorbancije na 260 i 280 nm ($A_{260/280}$) te 260 i 230 nm ($A_{260/230}$). Vrijednosti omjera niže od 1,8-

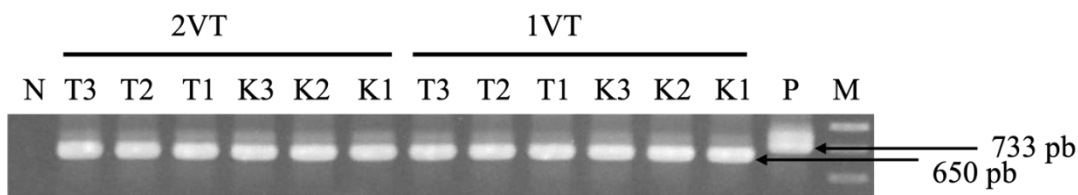
2,0 upućuju na prisutnost nečistoća u uzorku, a koje apsorbiraju svjetlost pri valnim duljinama od 280 i 230 nm. Takve nečistoće mogu potjecati od zaostalih kemikalija ili magnetnih kuglica korištenih tijekom procesa izolacije RNA.

Tablica 6. Koncentracija i čistoća izolirane ukupne RNA iz tretiranih (T1-3) i kontrolnih (K1-3) klijanaca divljeg tipa uročnjaka (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.). Klijanci su analizirani odmah nakon izlaganja kratkotrajnom toplinskom šoku (1 VT) i nakon oporavka na temperaturi uzgoja (2 VT).

Vremenska točka	Skupina	Koncentracija RNA (ng μL^{-1})	A _{260/280}	A _{260/230}
1 VT	K1	20,08	2,09	1,01
	K2	22,5	2,21	2,26
	K3	27,2	2,27	1,06
	T1	74,5	2,2	2,2
	T2	41,6	2,14	1,27
	T3	40,5	2,14	0,91
2 VT	K1	36,9	2,1	1,71
	K2	39,2	2,19	1,85
	K3	51,7	2,14	1,97
	T1	40,8	2,11	1,71
	T2	42,1	2,22	1,78
	T3	57,6	2,18	1,86

4.5.2 Kvaliteta cDNA sintetizirane reverznom transkripcijom

Izoliranu RNA preveo sam u cDNA reverznom transkripcijom. Uspješnost reverzne transkripcije, kao i eventualnu kontaminaciju genomskom DNA (gDNA), provjerio sam umnažanjem gena *ACT3* metodom PCR. Umnožene fragmente vizualizirao sam i analizirao agaroznom gel elektroforezom (Slika 5). Umnažanjem kalupa cDNA očekuje se produkt veličine 650 pb, dok se umnažanjem gDNA očekuje produkt veličine 733 pb. U svim uzorcima bile su vidljive samo vrpce veličine 650 pb, što je potvrdilo uspješnu konverziju RNA u cDNA. Vrpca veličine 733 pb bila je vidljiva samo u pozitivnoj kontroli, odnosno uzorku koji je sadržavao gDNA (Slika 5).



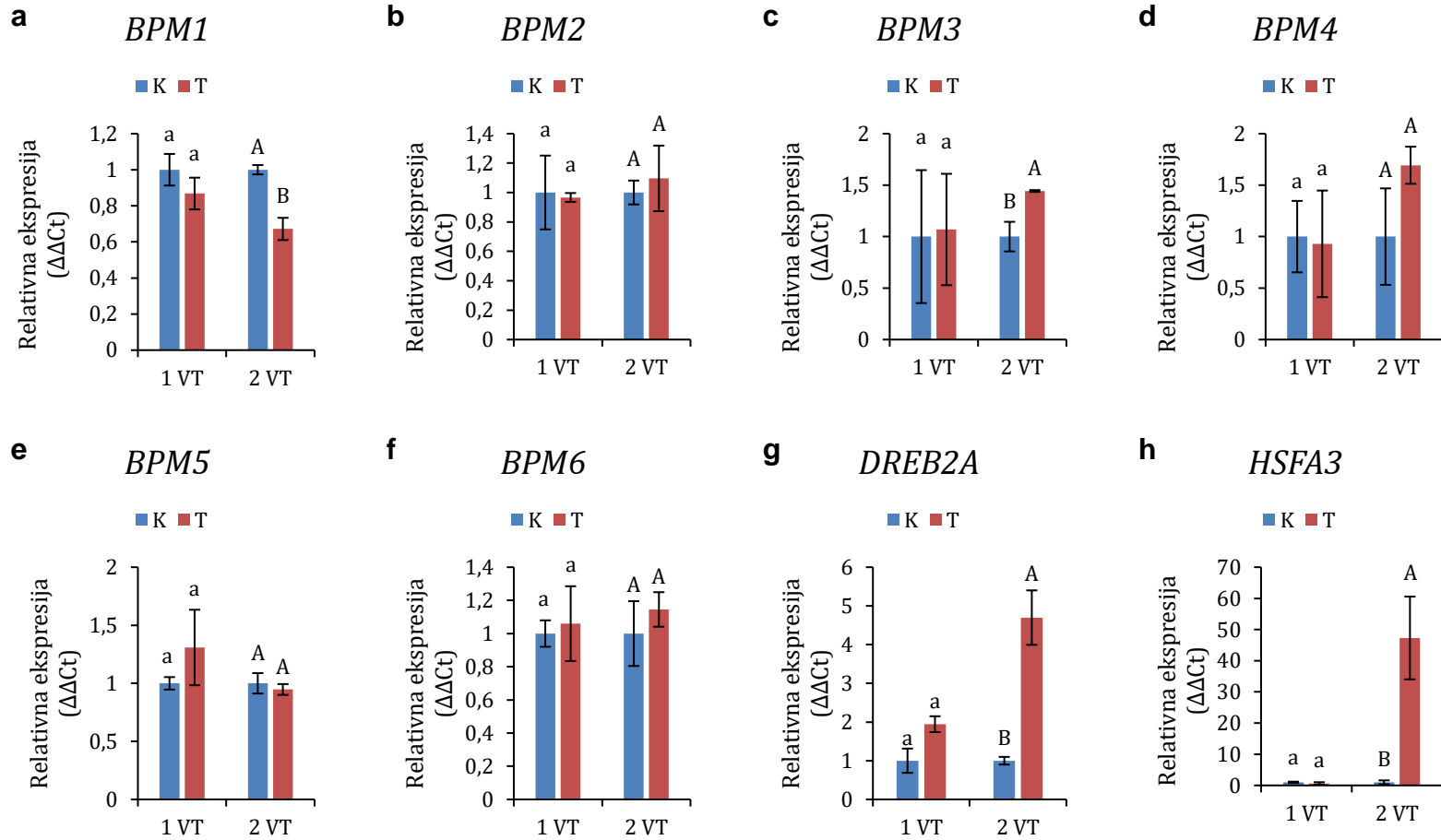
Slika 5. Provjera kvalitete reverzne transkripcije i čistoće sintetizirane cDNA iz tretiranih (T1-3) i kontrolnih (K1-3) klijanaca divljeg tipa uročnjaka (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.). Klijaneci su analizirani odmah nakon izlaganja kratkotrajnom toplinskom šoku (1 VT) i nakon oporavka na temperaturi uzgoja (2 VT). M – biljeg molekularne mase za DNA, P – pozitivna kontrola, odnosno uzorak koji sadrži genomsku DNA, N – negativna kontrola

4.6 Analiza ekspresije gena *BPM*, *DREB2A* i *HSFA3*

Analizom relativne ekspresije gena *BPM1-6* uočio sam statistički značajnu razliku u ekspresiji dvaju gena – *BPM1* i *BPM3* (Slika 6a-f). Pri tome su tretirani klijaneci imali smanjenu ekspresiju gena *BPM1* nakon oporavka u usporedbi s kontrolnim klijanecima (Slika 6a), dok sam kod gena *BPM3* uočio porast ekspresije u tretiranih klijanaca, također nakon oporavka (Slika 6c). Ekspresija gena *BPM2*, *BPM4*, *BPM5* i *BPM6* nije pokazala statistički značajne promjene između tretiranih i kontrolnih klijanaca, neovisno o vremenskoj točki analize.

Izlaganje klijanaca kratkotrajnom toplinskom šoku utjecalo je na ekspresiju gena *DREB2A* (Slika 6g). Iako sam odmah nakon tretmana uočio trend povećanja ekspresije gena *DREB2A*, statistički značajno povećanje uočio sam tek nakon oporavka.

Analiza ekspresije gena *HSFA3* nije pokazala značajne razlike u ekspresiji ovog gena između kontrolnih i tretiranih klijanaca u prvoj vremenskoj točki (Slika 6h). Međutim, nakon oporavka zabilježio sam statistički značajno povećanje ekspresije gena *HSFA3* u tretiranim klijanecima u usporedbi s kontrolom.



Slika 6. Relativna ekspresija ($\Delta\Delta Ct$) gena (a) *BPM1*, (b) *BPM2*, (c) *BPM3*, (d) *BPM4*, (e) *BPM5*, (f) *BPM6*, (g) *DREB2A* i (h) *HSFA3* u tretiranih (T) i kontrolnih (K) klijanaca divljeg tipa uročnjaka (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.). Klijanci su analizirani odmah nakon izlaganja kratkotrajnom toplinskom šoku (1 VT) i nakon oporavka na temperaturi uzgoja (2 VT). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti tri biološke replike \pm standardna pogreška. Različita slova iznad stupaca označavaju statistički značajnu razliku između skupina K i T (Studentov *t*-test, $p \leq 0,05$), pri čemu se mala slova odnose na 1 VT, a velika slova na 2 VT.

5. Rasprava

U okviru ovog rada istražio sam utjecaj kratkotrajnog toplinskog šoka na divlji tip uročnjaka analizirajući biokemijski i molekularni odgovor biljke. Iako je toplinski stres u biljaka opširno istražen, pregledom literature uvidio sam da su dosadašnja istraživanja uglavnom bila usmjerena na dugotrajni toplinski stres, dok su reakcije biljaka na kratkotrajni toplinski šok manje istražene. Naime, visoka, tj. subletalna temperatura i kratkotrajni tretman koji su primijenjeni u mom radu čine glavnu razliku u odnosu na većinu dosadašnjih istraživanja koja su bila fokusirana na dugotrajnije izlaganje toplinskom stresu manjeg intenziteta, tj. pri nižim temperaturama. Kao primjer takvih istraživanja mogu spomenuti tretman rododendrona temperaturom 38 °C tijekom dana i 30 °C tijekom noći u trajanju 6 dana (Shen i sur., 2017), izlaganje biljaka slanutka temperaturi od 32°C tijekom dana i 20°C tijekom noći u istraživanju Awasthi i sur. (2017) u trajanju 7 dana, te izlaganje biljaka uročnjaka 37 °C u trajanju 5 dana (Ono i sur., 2021).

U svom radu Zhao i sur. (2020) zaključili su da postoji razlika između kratkotrajnog toplinskog stresa koji se može inducirati u laboratorijskim uvjetima, te sporijeg okolišnog zagrijavanja. U istom radu autori predlažu usmjeravanje istraživanja na odgovor biljaka na dugotrajni toplinski stres, uključujući i višegeneracijski toplinski stres. Dobivena saznanja bi olakšala procjenu odgovora biljaka na klimatske uvjete i pridonijela uspješnosti u uzgoju biljaka u uvjetima toplije klime koja se očekuje u budućnosti. Uz navedeno značenje istraživanja dugotrajnog toplinskog stresa manjeg intenziteta, razumijevanje fiziološkog odgovora biljaka na kratkotrajni toplinski šok nudi dublji uvid u mehanizme prilagodbe biljaka na porast temperatura te omogućuje detaljniji pogled na moguće primjene tretmana toplinom za bolju prilagodbu biljaka što može rezultirati i ublažavanjem gubitaka prinosa pri proizvodnji hrane. Altschuler i Mascarenhas (1982) također tvrde kako je toplinski šok važna pojava i izvan laboratorijskih istraživanja te omogućuje prilagodbu biljaka na ekstremnije temperature. U ovom radu biljke sam podvrgnuo kratkotrajnom tretmanu temperaturom od 45 °C u kratkom vremenskom periodu, od samo 45 minuta. Ta je temperatura subletalna za biljke te bi dulji tretman uzrokovao smrt biljaka. Larkindale i sur. (2005) pokazali su da bez predtretmana klijanci uročnjaka mogu izdržati kratkotrajni tretman temperaturom do 45 °C. Klijanci izravno izloženi temperaturi 45 °C tijekom 60 minuta pokazali su stope preživljavanja od približno 40%-55% u usporedbi s kontrolnom grupom biljaka. Vuković i sur. (2024) ukazali su na venuće i smrt biljaka 5 do 7 dana nakon

tretmana temperaturom od 42 °C u trajanju 6 sati. U istom istraživanju potvrđeno da prethodno izlaganje biljaka temperaturi 37 °C u trajanju 6 sati i oporavak od 48 sati potiče mehanizme tolerancije koji omogućuju preživljavanje klijanaca nakon naknadnog tretmana temperaturom od 42 °C.

Iz dosadašnjih istraživanja poznato je da kratkotrajni toplinski šok može potaknuti drugačije odgovore biljnog organizma od reakcija na dugotrajni toplinski stres. U svom radu na stanicama duhana (*Nicotiana tabacum* - TBY-2) Sgobba i sur. (2015) pokazali su nagli porast aktivnosti antioksidacijskog sustava i sinteze proteina HSP nakon kratkotrajnog toplinskog šoka (35 °C u trajanju 6 h), čime se umanjuje oksidacijski stres i održava metabolička funkcija stanica. Isti autori su dokazali da dugotrajni toplinski stres na temperaturi od 35 °C u trajanju 7 dana, značajno smanjuje rast stanica i izaziva staničnu smrt. Bernacchi i sur. (2023) u svom pregledu istraživanja utjecaja kratkotrajnog toplinskog šoka u nasadima pšenice na otvorenom, potvrdili su kako trodnevni toplinski val, nastao povećanjem temperature na 38 °C značajno smanjuje fotosintezu, no biljke se potpuno oporave unutar 30 dana nakon završetka tretmana. Cocetta i sur. (2022) u svom su radu biljku uročnjaka izložili temperaturi od 37 ± 1 °C tijekom 4 sata, što je dulji vremenski period od tretmana primijenjenog u mom istraživanju, no temperatura je bila znatno niža. Cocetta i sur. (2022) utvrdili su značajne promjene u fotosintetskoj učinkovitosti, količini antocijana i ekspresiji proteina HSP s naglaskom na porodicu proteina HSP17. Isto tako, u radu Escandón i sur. (2017) na biljci *Pinus radiata*, nakon izlaganja kratkotrajnom toplinskom šoku došlo je do dramatične promjene u metabolizmu lipida, biosintezi flavonoida i terpenoida, kao i promjene u oksidativnom putu pentoza fosfata te metabolizmu hormona.

Kratkotrajni toplinski šok može različito utjecati na pojedine biljne vrste. Izlaganje tretmanu od 40 °C tijekom 4 sata potaknulo je ekspresiju proteina HSP, višu stopu fotosinteze i transpiracije, aktivnost antioksidacijskog sustava te smanjenje lipidne peroksidacije i ROS-ova u rajčici i time poboljšalo termotoleranciju (Yang i sur., 2019). Osim povećane tolerancije topline, kratkotrajni toplinski šok može također doprinijeti toleranciji na biotičke stresne čimbenike poput biljnih patogena. Kompleksna fiziološka prilagodba krastavca na kratkotrajni toplinski šok, povećanjem aktivnosti antioksidativnog sustava, akumulacijom šećera i topivih proteina, rezultirala je suzbijanjem širenja gljivičnog patogena (Ding i sur., 2016). Suprotno tome, Künstler i sur. (2023) na primjeru ječma tretiranog temperaturom 49 °C tijekom 20 sekundi, pokazali su kako kratkotrajni toplinski šok umanjuje otpornost biljke na napade patogena, budući da su

tretirane biljke imale više nekrotičnog tkiva i patogenih gljivica, uz značajno povećanje nastanka ROS-ova.

Usporedbom rezultata dobivenih na kontrolnoj i tretiranoj skupini biljaka odmah nakon tretmana, tj. izlaganja kratkotrajnom toplinskom šoku (1 VT) i poslije perioda oporavka na temperaturi uzgoja (2 VT), dobio sam uvid u odgovor biljaka na tretman kratkotrajnim toplinskim šokom pri 45 °C u trajanju 45 minuta. Kako bih detaljnije diskutirao reakciju biljke na tretman, komentirat ću svaki parametar istraživanja zasebno.

Kod promatranja rezultata mjerenja H₂O₂, nije postojala razlika u sadržaju odmah nakon tretmana (u vremenskoj točki 1 VT) u usporedbi s kontrolnim skupinama, dok mogu primijetiti statistički značajno niži sadržaj kod tretiranih biljaka nakon perioda oporavka (u vremenskoj točki 2 VT). Vidljiva, no ne i značajna razlika u sadržaju H₂O₂ između kontrolnih biljaka uzorkovanih u prvoj i drugoj vremenskoj točki, može biti posljedica intenzivnog rasta klijanaca. Naime, za istraživanje sam koristio klijance stare 12 dana koji su u procesu rasta i razvoja koji uključuju i procese prijenosa signala u kojima sudjeluje H₂O₂ (Petrov and Van Breusegem, 2012). Naime, pored aktivnosti i povećanja količine pri izlaganju okolišnom stresu, poznata je i uključenost molekule H₂O₂ u veliki broj signalnih puteva u biljnom organizmu (Demidchik, 2015). Štoviše, privremeni porast razine H₂O₂ dokazan je kao signal za pokretanje odgovora na stres (Kerchev i sur., 2020). Izostanak povećanja količine H₂O₂ odmah nakon tretmana nije neuobičajen zbog kratkoće tretmana, ali sadržaj H₂O₂ je i nakon perioda oporavka bio značajno niži u tretiranim klijancima u usporedbi s kontrolnom skupinom. Očekivao sam da će po isteku vremena oporavka sadržaj ove signalne molekule biti povišen kod tretirane skupine, ali postoji nekoliko mogućih razloga zašto je taj učinak izostao. Ukupni vremenski period između tretmana i uzorkovanja klijanaca nakon oporavka bio je 11 sati i 15 minuta. U tom periodu, bilo je dovoljno vremena za karakteristično povećanje količine H₂O₂ pod utjecajem toplinskog stresa, a zatim smanjenje djelovanjem antioksidacijskog sustava. Sadržaj H₂O₂ koji sam izmjerio u drugoj vremenskoj točki vjerojatno je rezultat aktivnosti antioksidacijskog sustava koji se aktivirao nakon povećanja ROS-ova, uključujući i H₂O₂. Većina istraživanja ukazuje na to da toplinski stres dovodi do povećane proizvodnje ROS-ova, što potom aktivira antioksidacijski sustav biljaka (Ohama i sur., 2017). Stoga možemo pretpostaviti da je povećanje H₂O₂ potaknulo aktivnost antioksidacijskog sustava. Detaljniji uvid u dinamiku količine H₂O₂ tijekom oporavka imali bismo u slučaju češćeg uzorkovanja pa bi prema tome u nekim od budućih istraživanja trebalo uvesti dodatne vremenske

točke uzorkovanja, kako bismo mjerenjima „uhvatili“ povećanje količine H_2O_2 . Rezultati istraživanja Ellouzi i sur. (2011) na uročnjaku dokazali su prisutnost maksimalnog sadržaja H_2O_2 4 sata nakon tretmana biljke visokim koncentracijama soli, nakon čega je sadržaj opadao. Istraživanja na uročnjaku pokazala su povećanje proizvodnje ROS-ova u dvije faze, pri čemu se primarna faza javlja unutar nekoliko minuta nakon izlaganja stresu, dok se sekundarna faza javlja unutar nekoliko sati ili dana (Baxter i sur., 2014). Ova dvofazna proizvodnja ROS-ova prati različite signalne procese u mnogim biološkim sustavima, gdje na primjer, mehanička ozljeda izaziva početni porast količine $\text{O}_2^{\cdot-}$ unutar 3 minute, nakon čega slijedi kasnija proizvodnja $\text{O}_2^{\cdot-}$ i H_2O_2 nakon 6 sati (Soares i sur., 2009).

Nastanak i akumulacija ROS-ova neodvojivo je povezana s razinom lipidne peroksidacije i porastom količine MDA. Sekundarni učinak ROS-ova je poticanje lančane reakcije lipidne peroksidacije, u kojoj početnim uklanjanjem vodikova atoma iz masne kiseline u membrani nastaju lipidni radikali koji mogu nastaviti proces oksidacije lipida (Noctor i sur., 2015; Blokhina i sur., 2003; Catalá, 2006). Promatrajući rezultate određivanja sadržaja MDA, uočio sam odstupanje od očekivanog porasta ovog produkta lipidne peroksidacije u biljaka izloženih toplinskom stresu. Statistički značajno smanjenje količine MDA bilo je prisutno u tretiranoj skupini odmah nakon primjene toplinskog stresa, dok se nakon oporavka sadržaj MDA u tretiranoj skupini nije značajno razlikovao od kontrole. MDA je pokazatelj stupnja lipidne peroksidacije, koja se zasigurno događa pod utjecajem toplinskog stresa i ROS-ova koji nastaju u takvim stresnim uvjetima. Stoga bismo mogli očekivati drukčiji rezultat, tj. porast količine MDA nakon toplinskog stresa. Moguće objašnjenje dobivenog rezultata je nagla aktivacija antioksidacijskog sustava koji je spriječio nastanak i nakupljanje veće količine ROS-ova i time umanjio proces lipidne peroksidacije te ograničio nastanak MDA. Yang i sur. (2019) su potvrdili da je kratkotrajni toplinski šok pri $40\text{ }^\circ\text{C}$ u trajanju 4 sata malo povišio sadržaj MDA te da je došlo do aktivacije antioksidacijskog sustava. U radu Sgobba i sur. (2015) sadržaj MDA se povećao odmah nakon tretmana temperaturom $37\text{ }^\circ\text{C}$ u trajanju od 6 sati te se nakon perioda oporavka smanjio na razinu kontrole. U istom istraživanju na stanicama izloženim dugotrajnom toplinskom stresu pri istoj temperaturi i trajanju od 7 dana, sadržaj MDA je porastao također nakon 6 sati tretmana te se sporije i postupno smanjivao tijekom trajanja tretmana.

Rezultati određivanja H_2O_2 i stupnja lipidne peroksidacije ukazuju da bi u nastavku istraživanja bilo korisno pratiti aktivnost antioksidacijskih enzima i količinu neenzimskih

antioksidansa koji mogu umanjiti negativni učinak ROS-ova a time i nastanak MDA. Vuković i sur. (2024) u svojem istraživanju na mutanti uročnjaka s pojačanom ekspresijom gena *BPM*, pratili su aktivnost četiri antioksidacijska enzima – SOD, CAT, APX i gvajakol peroksidaza (engl. *guaiacol peroxidase*, G-POD). Istraživanje je pokazalo da nakon izlaganja biljaka toplinskom stresu pri 37 °C u trajanju od 6 sati, ne dolazi do značajnog porasta aktivnosti antioksidacijskih enzima SOD i CAT, no pritom dolazi do značajnog porasta aktivnosti antioksidacijskih enzima APX i G-POD. Razlika u aktivnosti istraživanih enzima ukazuje da su imali različit doprinos neutralizaciji ROS-ova prilikom toplinskog stresa. Stoga bi bilo zanimljivo istražiti aktivnost antioksidacijskog sustava u biljkama izloženim kratkotrajnom toplinskom šoku.

Iako porast količine H₂O₂ i produkata lipidne peroksidacije nisu dokazani neposredno nakon izlaganja biljaka toplinskom šoku, rezultati mjerenja fluorescencije klorofila ukazuju na mogući učinak tretmana na tilakoidne membrane. Budući da je poznat učinak povišene temperature na fluidnost membrana, te da se važan dio procesa fotosinteze odvija na tilakoidnim membranama kloroplasta, djelovanje toplinskog šoka na fotosintezu putem utjecaja na stabilnost membrana nije iznenađujuće (Hu i sur., 2020). Parametri koji ukazuju na stanje fotosintetskog aparata nakon izlaganja stresnim uvjetima, poput F_v/F_m i PI_{ABS} , pokazali su značajnu promjenu kod tretirane skupine u obje vremenske točke. F_v/F_m , koji pokazuje koliko učinkovito biljka koristi apsorbiranu svjetlosnu energiju u fotosintezi, bio je značajno snižen u tretiranoj skupini u obje vremenske točke – neposredno nakon tretmana i nakon oporavka. Isto tako, PI_{ABS} je pokazao značajan pad kod tretirane skupine u obje vremenske točke. Gledajući ostale parametre dobivene JIP testom, poput ABS/RC , TR_0/RC , ET_0/RC i DI_0/RC , važno ih je uzeti u obzir i tumačiti kao cjeloviti proces unutar PSII. U obje vremenske točke došlo je do značajnog porasta apsorpcije fotona po aktivnom reakcijskom centru, ali to je popraćeno i značajnim povećanjem rasipanja energije u obliku topline. Značajni porast ABS/RC u tretiranoj skupini u obje vremenske točke na prvi pogled daje dojam pozitivnog učinka, no on nije popraćen značajnim povećanjem prijenosa elektrona (ET_0/RC) što znači da uhvaćeni fotoni (TR_0/RC), nisu doprinijeli prijenosu elektrona. Naime TR_0/RC se značajno povećao samo odmah nakon tretmana, tj. u prvoj vremenskoj točki, ali nakon oporavka može se primijetiti smanjenje. Izrazito povećanje rasipanja energije u obliku topline (DI_0/RC) u obje vremenske točke ukazuje da je nakon toplinskog tretmana veći udio energije izgubljen, a ne iskorišten za proces fotosinteze. Takav rezultat nam ukazuje da je došlo do negativnog učinka na antene i reakcijsko središte na PSII.

Imunodetekcijom proteina RuBisCO želio sam dobiti još jedan podatak o mogućem učinku kratkotrajnog toplinskog šoka na fotosintezu. Rezultati su pokazali da tretman nije značajno utjecao na količinu ovog proteina, neovisno o vremenskoj točki analize. Međutim, nepromijenjen sadržaj proteina ne znači nužno da toplinski šok ne utječe na enzim RuBisCO. Ovim istraživanjem nemamo uvid u aktivnost enzima, za koju znamo da je u stresnim uvjetima podložna promjenama (Mathur i sur., 2014). Neka istraživanja pokazuju da toplinski stres utječe na RuBisCO aktivazu, enzim nužan za aktivaciju enzima RuBisCO. Salvucci i sur. (2001) su objavili da toplinski stres inhibira fotosintezu smanjenjem aktivacije RuBisCO-a zbog toplinske denaturacije RuBisCO aktivaze. Reaktivacija enzima RuBisCO nakon izlaganja nekom stresu može varirati ovisno o vrsti stresa, njegovom intenzitetu i trajanju, kao i o biljnoj vrsti. To je istaknuto u radu Salvucci i Crafts-Brandner (2004), u kojem je navedeno da umjereni toplinski stres (30-42 °C) može dovesti do smanjenja aktivacije enzima RuBisCO, što ograničava fotosintezu. Do toga dolazi zbog brže deaktivacije RuBisCO-a i sporije reaktivacije aktivazom pri porastu temperature. Ovaj podatak sugerira da je reaktivacija RuBisCO-a pod toplinskim stresom promjenjiva i ovisi o intenzitetu i trajanju stresa. Budući da je u mojem istraživanju količina enzima RuBisCO ostala stabilna i nije bila pod utjecajem toplinskog stresa, RuBisCO bi mogao biti kontrolni protein, tj. referentni pokazatelj u postupcima imunodetekcije u istraživanjima u kojima se primjenjuje toplinski šok slične jačine i trajanja.

Za razliku od učinka na enzim RuBisCO, uočio sam značajno povećanje ekspresije proteina HSP90 u tretiranim klijancima u obje vremenske točke. Povećanje HSP90 kod tretirane skupine bilo je očekivano, budući da je to protein sa širokim spektrom aktivnosti koji utječe na prevladavanje toplinskog stresa, ali i drugih stresnih uvjeta (Zhang i sur., 1997). U radu Vitko (2024) provedena je imunodetekcija HSP90 i HSP70 u nekoliko linija uročnjaka s promijenjenom ekspresijom gena *BPM*. Biljke su bile tretirane temperaturom 37 °C u trajanju 6 sati. Sve linije su akumulirale HSP90, dok je indukcija HSP70 ovisila o genskoj pozadini biljaka. U mojim rezultatima sadržaj proteina HSP90 ostao je povišen i nakon perioda oporavka, što je jednako rezultatima dobivenim i istraživanju Charng i sur. (2006), koji su pokazali da razina proteina HSP90 doseže svoj maksimum otprilike 3 sata nakon izlaganja klijanaca uročnjaka temperaturi od 37 °C, a potom se postupno smanjuje na razine zabilježene u kontrolnim biljkama tijekom oporavka. U svom radu Altschuler i Mascarenhas (1982) tvrde da kratkotrajni toplinski šok pri temperaturi od 40 °C potiče maksimalnu sintezu proteina toplinskog šoka (HSP). Takav stupanj

sinteze održava se samo ograničeno vrijeme te se već nakon 2,5 sata na 40 °C sinteza proteina HSP smanjuje i nakon 6 sati vraća na kontrolne razine. Moguće obrazloženje povišenog sadržaja proteina HSP90 i nakon vremena oporavka u mojem istraživanju učinka toplinskog šoka, može biti sama uloga proteina koja uključuje sudjelovanje u procesu oporavka, stabilizacije i ponovnog smatanja denaturiranih proteina koji su oštećeni tijekom toplinskog tretmana (Hasanuzzaman i sur., 2013). Osim uloge u stabilizaciji i popravku, proteini HSP90 imaju i druge uloge poput održavanja fizioloških funkcija biljke za vrijeme stresa. Tako su Wang i sur. (2016) u svom radu otkrili da blagi porast temperature (s 22 na 29 °C), stimulira rast uročnjaka gdje zabilježen porast količine proteina HSP90 potiče biosintezu biljnog hormona auksina što uzrokuje rast biljke za vrijeme toplinskog tretmana.

U svom radu analizirao sam ekspresije gena *BPM*, *HSFA3* i *DREB2A*, odabranih zbog njihove poznate uloge u odgovoru biljaka na toplinski stres. Od analize ukupno osam gena, uspoređujući kontrolne i tretirane biljke, možemo uočiti statistički značajnu razliku u ekspresiji *DREB2A* i *HSFA3* te *BPM1* i *BPM3* iz porodice gena *BPM*. Ekspresija gena vidljiva je nakon vremena oporavka, što je očekivano jer je potrebno vrijeme za aktivaciju gena nakon izlaganja stresu (Liu i sur., 2015). Uočen je značajni rast ekspresije *DREB2A* u tretiranim biljkama nakon vremena oporavka. Poznat signalizacijski put za vrijeme toplinskog stresa, opisan u radu Ohama i sur. (2017), prikazuje ulogu *DREB2A* koji nizvodno aktivira ekspresiju *HSFA3*. Ovo je potvrđeno mojim rezultatima, gdje je uistinu došlo do značajnog porasta ekspresije i *DREB2A* i *HSFA3* u tretiranim biljkama nakon vremena oporavka. Geni *HSFA3* i *DREB2A* imaju ulogu u regulaciji ekspresije HSP, koji je prema dobivenim rezultatima također povišen. Kod obitelji gena *BPM* došlo je do značajne razlike u ekspresiji samo gena *BPM1* i *BPM3*. Nakon oporavka biljaka izloženih kratkotrajnom toplinskom šoku možemo uočiti značajan pad ekspresije *BPM1*, što je suprotno rezultatima objavljenim u radu Škiljaica i sur. (2020) koji navode porast ekspresije ovog gena pri toplinskom stresu. Tu razliku u dobivenim rezultatima moguće je objasniti trajanjem i jačinom tretmana koji je u njihovom radu bio 6 sati pri 37 °C, što su drugačiji uvjeti od onih u mom istraživanju. Gen *BPM3* pokazuje značajan porast ekspresije nakon tretmana toplinom, što bih objasnio mogućom kompenzacijom zbog pada ekspresije gena *BPM1*. Kompenzaciju potvrđuju Weber i Hellmann (2009), kao i Chen i sur. (2013), argumentirajući kako izostanak narušavanja razvojnih procesa kod mutacija pojedinačnih gena *BPM* sugerira da proteini BPM

mogu imati funkcije koje se preklapaju te pri smanjenju ekspresije pojedinih gena može doći do međusobne kompenzacije uloga proteina.

6. Zaključak

Provedeno istraživanje doprinos je dosadašnjim saznanjima o učinku kratkotrajnog toplinskog šoka na klijance uročnjaka. Primjenom tretmana od 45 °C u trajanju od 45 minuta te usporedbom rezultata dobivenih na kontrolnim i tretiranim biljkama odmah nakon tretmana te nakon oporavka u ukupnom trajanju 11 sati i 15 minuta, mogu izvesti sljedeće zaključke:

1. Toplinski šok djelovao je na klijance uročnjaka i uzrokovao fiziološke, biokemijske i molekularne promjene.
2. Na temelju praćenja promjene sadržaja H₂O₂ i stupnja lipidne peroksidacije nije dokazano povećanje oksidacijskog stresa odmah nakon tretmana niti nakon oporavka.
3. Parametri fluorescencije klorofila (JIP-test) jasno ukazuju na nepovoljan učinak toplinskog stresa na fotosintezu. Izrazito smanjenje F_v/F_m i PI_{ABS} te rasipanje energije u obliku topline u tretiranim biljkama nije se ublažilo niti nakon perioda oporavka. Količina enzima RuBisCO ostala je nepromijenjena nakon tretmana i oporavka, ali istraživanja nisu obuhvatila procjenu njegove aktivnosti.
4. Toplinski šok uzrokovao je indukciju proteina HSP90, koja je bila povećana i neposredno nakon tretmana i po isteku vremena oporavka.
5. Analiza ekspresije odabranih gena ključnih u odgovoru na toplinski stres pokazala je pad ekspresije gena *BPM1* nakon oporavka, dok je u istoj vremenskoj točki ekspresija gena *BPM3* značajno porasla. Ekspresija gena *DREB2A* kao i *HSFA3* značajno je porasla nakon vremena oporavka, ukazujući na aktivaciju mehanizama prilagodbe na toplinski šok.

7. Literatura

- Altschuler, M., Mascarenhas, J. P. (1982). Heat shock proteins and effects of heat shock in plants. *Plant Molecular Biology*, 1, 103-115.
- Apel, K., Hirt, H. (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology*, 55(1), 373-399.
- Arora, A., Sairam, R. K., Srivastava, G. C. (2002). Oxidative stress and antioxidative system in plants. *Current Science*, 25, 1227-1238.
- Awasthi, R., Gaur, P., Turner, N. C., Vadez, V., Siddique, K. H., Nayyar, H. (2017). Effects of individual and combined heat and drought stress during seed filling on the oxidative metabolism and yield of chickpea (*Cicer arietinum*) genotypes differing in heat and drought tolerance. *Crop and Pasture Science*, 68(9), 823-841.
- Balen, B., Pavoković, D., Peharec Štefanić, P., Krsnik-Rasol, M. (2011). Elektroforetske tehnike istraživanja proteina. Hrvatska sveučilišna naklada, Zagreb.
- Baxter, A., Mittler, R., Suzuki, N. (2014). ROS as key players in plant stress signalling. *Journal of Experimental Botany*, 65(5), 1229-1240.
- Bernacchi, C. J., Ruiz-Vera, U. M., Siebers, M. H., DeLucia, N. J., Ort, D. R. (2023). Short-and long-term warming events on photosynthetic physiology, growth, and yields of field grown crops. *Biochemical Journal*, 480(13), 999-1014.
- Blokhina, O., Virolainen, E., Fagerstedt, K. V. (2003). Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Annals of Botany*, 91(2), 179-194.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
- Buchanan, B. B., Gruissem, W., Jones, R. L. (2015). *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK.

- Catalá, A. (2006). An overview of lipid peroxidation with emphasis in outer segments of photoreceptors and the chemiluminescence assay. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 38(9), 1482-1495.
- Caverzan, A., Passaia, G., Rosa, S. B., Ribeiro, C. W., Lazzarotto, F., Margis-Pinheiro, M. (2012). Plant responses to stresses: role of ascorbate peroxidase in the antioxidant protection. *Genetics and Molecular Biology*, 35, 1011-1019.
- Chang, Y. Y., Liu, H. C., Liu, N. Y., Hsu, F. C., Ko, S. S. (2006). Arabidopsis Hsa32, a novel heat shock protein, is essential for acquired thermotolerance during long recovery after acclimation. *Plant Physiology*, 140(4), 1297-1305.
- Chauhan, H., Khurana, N., Nijhavan, A., Khurana, J. P., Khurana, P. (2012). The wheat chloroplastic small heat shock protein (sHSP26) is involved in seed maturation and germination and imparts tolerance to heat stress. *Plant, Cell & Environment*, 35(11), 1912-1931.
- Chen, L., Lee, J. H., Weber, H., Tohge, T., Witt, S., Roje, S., Fernie, A. R. 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.
- Cheng, S., Yang, Z., Wang, M., Song, J., Sui, N. i Fan, H. (2014). Salinity improves chilling resistance in *Suaeda salsa*. *Acta Physiologiae Plantarum*, 36, 1823-1830.
- Choudhury, F. K., Rivero, R. M., Blumwald, E., Mittler, R. (2017). Reactive oxygen species, abiotic stress and stress combination. *The Plant Journal*, 90(5), 856-867.
- Cocetta, G., Landoni, M., Pilu, R., Repiso, C., Nolasco, J., Alajarin, M., Ugena, L., Levy, C. C., Scatolino, G., Villa, D., Ferrante, A. (2022). Priming treatments with biostimulants to cope the short-term heat stress response: A transcriptomic profile evaluation. *Plants*, 11(9), 1130.
- da Rocha Neto, A. C., Maraschin, M., Di Piero, R. M. (2015). Antifungal activity of salicylic acid against *Penicillium expansum* and its possible mechanisms of action. *International Journal of Food Microbiology*, 215, 64-70.
- Davies, K. J. A. (2000). Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems. *IUBMB Life*, 50(4-5), 279-289.

- Demidchik, V. (2015). Mechanisms of oxidative stress in plants: from classical chemistry to cell biology. *Environmental and Experimental Botany*, 109, 212-228.
- Devireddy, A. R., Tschaplinski, T. J., Tuskan, G. A., Muchero, W., Chen, J. G. (2021). Role of reactive oxygen species and hormones in plant responses to temperature changes. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(16), 843.
- Ding, X., Jiang, Y., Hao, T., Jin, H., Zhang, H., He, L., Zhou, Q., Huang, D., Hui, D., Yu, J. (2016). Effects of heat shock on photosynthetic properties, antioxidant enzyme activity, and downy mildew of cucumber (*Cucumis sativus* L.). *PLoS One*, 11(4), e0152429.
- Ellouzi, H., Ben Hamed, K., Cela, J., Munné-Bosch, S., Abdelly, C. (2011). Early effects of salt stress on the physiological and oxidative status of *Cakile maritima* (halophyte) and *Arabidopsis thaliana* (glycophyte). *Physiologia Plantarum*, 142(2), 128-143.
- Escandón, M., Valledor, L., Pascual, J., Pinto, G., Cañal, M. J. Meijón, M. (2017). System-wide analysis of short-term response to high temperature in *Pinus radiata*. *Journal of Experimental Botany*, 68(13), 3629-3641.
- Ferris, R., Ellis, R. H., Wheeler, T. R., Hadley, P. (1998). Effect of high temperature stress at anthesis on grain yield and biomass of field-grown crops of wheat. *Annals of Botany*, 82(5), 631-639.
- Freeman, B. C., Beattie, G. A. (2008). An overview of plant defenses against pathogens and herbivores. *The Plant Health Instructor*, 94.
- Giaveno, C., Ferrero, J. (2003). Introduction of tropical maize genotypes to increase silage production in the central area of Santa Fe, Argentina. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 3(2), 89-94.
- Gill, S. S., Tuteja, N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48(12), 909-930.
- Guo, M., Liu, J-H. Ma, X., Luo, D-X., Gong, Z-H., Lu, M-H. (2016). The plant heat stress transcription factors (HSFs): structure, regulation, and function in response to abiotic stresses. *Frontiers in Plant Science*, 7, 114.

- Hasanuzzaman, M., Bhuyan, M. B., Zulfiqar, F., Raza, A., Mohsin, S. M., Mahmud, J. A., Borhannuddin Bhuyan M. H. M., Mohammad Mohsin S., Mahmud A J., Fujita M., Fotopoulos, V. (2020). Reactive oxygen species and antioxidant defense in plants under abiotic stress: Revisiting the crucial role of a universal defense regulator. *Antioxidants*, 9(8), 681.
- Hasanuzzaman, M., Nahar, K., Alam, M. M., 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.,
- Hodges, D. M., DeLong, J. M., Forney, C. F., Prange, R. K. (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.
- Hu, S., Ding, Y., Zhu, C. (2020). Sensitivity and responses of chloroplasts to heat stress in plants. *Frontiers in Plant Science*, 11, 375.
- Kapoor, D., Singh, S., Kumar, V., Romero, R., Prasad, R., Singh, J. (2019). Antioxidant enzymes regulation in plants in reference to reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS). *Plant Gene*, 19, 100182.
- Karimi, H. R., Afzalifar, M., Mansouri, M. Z. (2012). The effect of IBA and salicylic acid on rooting and vegetative parameters of pomegranate cuttings. *International Journal of Agriculture: Research and Review*, 2, 1085-1019.
- Kerchev, P., van der Meer, T., Sujeeth, N., Verlee, A., Stevens, C.V., Van Breusegem, F., Gechev, T. (2020). Molecular priming as an approach to induce tolerance against abiotic and oxidative stresses in crop plants. *Biotechnology Advances*, 40, 107503.
- 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.
- Krasensky, J., Jonak, C. (2012). Drought, salt, and temperature stress-induced metabolic rearrangements and regulatory networks. *Journal of Experimental Botany*, 63(4), 1593-1608.

- Kumar, V., Sharma, A., Soni, J. K., Pawar, N. (2017). Physiological response of C3, C4 and CAM plants in changeable climate. *The Pharma Innovation*, 6(9), 70.
- Künstler, A., Füzék, K., Schwarczinger, I., Nagy, J. K., Bakonyi, J., Fodor, J., Hafez, Y. M., Király, L. (2023). Heat shock-induced enhanced susceptibility of barley to *Bipolaris sorokiniana* is associated with elevated ROS production and plant defence-related gene expression. *Plant Biology*, 25(5), 803-812.
- Küpper, H., Benedikty, Z., Morina, F., Andresen, E., Mishra, A., Trtílek, M. (2019). Analysis of OJIP chlorophyll fluorescence kinetics and Q_A reoxidation kinetics by direct fast imaging. *Plant Physiology*, 179(2), 369-381.
- Larkindale, J., Hall, J. D., Knight, M. R. and Vierling, E. (2005). Heat stress phenotypes of Arabidopsis mutants implicate multiple signaling pathways in the acquisition of thermotolerance. *Plant Physiology*, 138(2), 882-897.
- Li, H., Li, H., Lv, Y., Wang, Y., Wang, Z., Xin, C., Li, X. (2019). Salt priming protects photosynthetic electron transport against low-temperature-induced damage in wheat. *Sensors*, 20(1), 62.
- Liu, J., Feng, L., Li, J., He, Z. (2015). Genetic and epigenetic control of plant heat responses. *Frontiers in Plant Science*, 6, 267.
- Mátai, A., Hideg, É. (2017). A comparison of colorimetric assays detecting hydrogen peroxide in leaf extracts. *Analytical Methods*, 9(15), 2357-2360.
- Mathur, S., Agrawal, D., Jajoo, A. (2014). Photosynthesis: response to high temperature stress. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 137, 116-126.
- Mattioli, R., Costantino, P., Trovato, M. (2009). Proline accumulation in plants: not only stress. *Plant Signaling & Behavior*, 4(11), 1016-1018.
- Maxwell, K., Johnson, G. N. (2000). Chlorophyll fluorescence – a practical guide. *Journal of Experimental Botany*, 51(345), 659-668.
- Mishra, S., Spaccarotella, K., Gido, J., Samanta, I., Chowdhary, G. (2023). Effects of heat stress on plant-nutrient relations: An update on nutrient uptake, transport, and assimilation. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(21), 15670.

- Morimoto, K., Ohama, N., Kidokoro, S., Mizoi, J., Takahashi, F., Todaka, D., 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.
- Noctor, G., Lelarge-Trouverie, C., Mhamdi, A. (2015). The metabolomics of oxidative stress. *Phytochemistry*, 112, 33-53.
- 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.
- Ono, M., Isono, K., Sakata, Y., Taji, T. (2021). CATALASE2 plays a crucial role in long-term heat tolerance of *Arabidopsis thaliana*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 534, 747-751.
- Peet, M. M., Sato, S., Gardner, R. G. (1998). Comparing heat stress effects on male-fertile and male-sterile tomatoes. *Plant, Cell & Environment*, 21(2), 225-231.
- Peterhansel, C., Horst, I., Niessen, M., Blume, C., Kebeish, R., Kürkcüoglu, S., Kreuzaler, F. (2010). Photorespiration. *The Arabidopsis Book/American Society of Plant Biologists*, 8.
- Petrov V. D, Van Breusegem F. (2012). Hydrogen peroxide - a central hub for information flow in plant cells. *AoB PLANTS* 2012: pls014.
- Pfaffl M. W. (2004). Quantification strategies in real-time PCR. *AZ of Quantitative PCR*, 1, 89-113.
- Qiu, N. i Lu, C. (2003). Enhanced tolerance of photosynthesis against high temperature damage in salt-adapted halophyte *Atriplex centralasiatica* plants. *Plant, Cell & Environment*, 26(7), 1137-1145.
- Quan, L. J., Zhang, B., Shi, W. W., Li, H. Y. (2008). Hydrogen peroxide in plants: a versatile molecule of the reactive oxygen species network. *Journal of Integrative Plant Biology*, 50(1), 2-18.
- Salvucci, M. E., Crafts-Brandner, S. J. (2004). Inhibition of photosynthesis by heat stress: the activation state of Rubisco as a limiting factor in photosynthesis. *Physiologia Plantarum*, 120(2), 179-186.

- Salvucci, M. E., Osteryoung, K. W., Crafts-Brandner, S. J., Vierling, E. (2001). Exceptional sensitivity of Rubisco activase to thermal denaturation in vitro and in vivo. *Plant Physiology*, 127(3), 1053-1064.
- Sgobba, A., Paradiso, A., Dipierro, S., De Gara, L., de Pinto, M. C. (2015). Changes in antioxidants are critical in determining cell responses to short-and long-term heat stress. *Physiologia Plantarum*, 153(1), 68-78.
- Shen, H. F., Zhao, B., Xu, J. J., Liang, W., Huang, W. M., Li, H. H. (2017). Effects of heat stress on changes in physiology and anatomy in two cultivars of *Rhododendron*. *South African Journal of Botany*, 112, 338-345.
- Smirnoff, N., Arnaud, D. (2019). Hydrogen peroxide metabolism and functions in plants. *New Phytologist*, 221(3), 1197-1214.
- Soares, N. C., Francisco, R., Vielba, J.M., Ricardo, C. P. and Jackson, P. A. (2009). Associating wound-related changes in the apoplast proteome of *Medicago* with early steps in the ROS signal-transduction pathway. *Journal of Proteome Research*, 8(5), 2298-2309.
- Staples R. C, Stahmann M. A. (1964). Changes in proteins and several enzymes in susceptible bean leaves after infection by the bean rust fungus. *Phytopathology* 54(7), 760-764.
- 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.
- Strand, D. D., Livingston, A. K., Satoh-Cruz, M., Froehlich, J. E., Maurino, V. G., Kramer, D. M. (2015). Activation of cyclic electron flow by hydrogen peroxide in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(17), 5539-5544.
- Strasser R. J, Tsimilli-Michael M., Srivastava A. (2004). Analysis of the chlorophyll *a* fluorescence transient. U: Papageorgiou G. C, Govindjee (ur.) Chlorophyll *a* fluorescence: a signature of photosynthesis. Springer Dordrecht, 321-362.
- Suorsa, M. (2015). Cyclic electron flow provides acclimatory plasticity for the photosynthetic machinery under various environmental conditions and developmental stages. *Frontiers in Plant Science*, 6, 800.

- Suzuki, N., Rivero, R. M., Shulaev, V., Blumwald, E., Mittler, R. (2014). Abiotic and biotic stress combinations. *New Phytologist*, 203(1), 32-43.
- Škiljaica, A., Jagić, M., Vuk, T., Leljak 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.
- 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.
- Taiz, L. i Zeiger, E. (2010). *Plant Physiology*, 5th Edition. Sinauer Associates Inc. Publishers, Massachusetts.
- 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.
- Vitko, S. (2024). Odgovor uročnjaka (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.) s promijenjenom ekspresijom gena *BPM* i *DMS3* na toplinski stres. Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb.
- Vuković, M., Kutnjak, M., Vitko, S., Tkalec, M., Vidaković-Cifrek, Ž. (2024). Heat priming modifies heat stress response in BPM1-overexpressing *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Journal of Plant Growth Regulation*, doi: 10.1007/s00344-024-11337-4.
- Wahid, A., Gelani, S., Ashraf, M., Foolad, M. R. (2007). Heat tolerance in plants: an overview. *Environmental and Experimental Botany*, 61(3), 199-223.
- Wang, R., Zhang, Y., Kieffer, M., Yu, H., Kepinski, S., Estelle, M. (2016). HSP90 regulates temperature-dependent seedling growth in Arabidopsis by stabilizing the auxin co-receptor F-box protein TIR1. *Nature Communications*, 7(1), 10269.
- Wani, S. H., Kumar, V. (2020). Heat stress tolerance in plants: physiological, molecular and genetic perspectives. 1st ed. John Wiley & Sons Ltd, Chichester, UK.

- Weber, H., Hellmann, H. (2009). *Arabidopsis thaliana* BTB/POZ-MATH proteins interact with members of the ERF/AP2 transcription factor family. *The FEBS Journal*, 276(22), 6624-6635.
- Woodward, A. W., Bartel, B. (2018). Biology in bloom: a primer on the *Arabidopsis thaliana* model system. *Genetics*, 208(4), 1337-1349.
- 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.
- Yang, Z. Q., Xu, C., Wang, M. T., Zhao, H. L., Zheng, Y. J., Huang, H. J., Vuguziga, F., Umutoni, M. A. (2019). Enhancing the thermotolerance of tomato seedlings by heat shock treatment. *Photosynthetica*, 57(4), 1184-1192.
- Yaschenko, A. E., Alonso, J. M., Stepanova, A. N. (2024). Arabidopsis as a model for translational research. *The Plant Cell*, koae065.
- Zhang, H., Wang, J., Nickel, U., Allen, R. D., Goodman, H. M. (1997). Cloning and expression of an Arabidopsis gene encoding a putative peroxisomal ascorbate peroxidase. *Plant Molecular Biology*, 34, 967-971
- Zhao, J., Lu, Z., Wang, L., Jin, B. (2020). Plant responses to heat stress: physiology, transcription, noncoding RNAs, and epigenetics. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(1), 117.
- Zhu, J. K. (2016). Abiotic stress signaling and responses in plants. *Cell*, 167(2), 313-324.

Životopis

Rođen sam u Zagrebu, gdje sam završio Osnovnu školu Savski Gaj te srednjoškolsko obrazovanje u Agrotehničkoj školi Zagreb, smjer Agrotehničar – eksperimentalni program. Tijekom školovanja sudjelovao sam u Erasmus mobilnosti u Padovi, Italija, u sklopu projekta AGRILOI2, gdje sam stekao vrijedna znanja o primjeni agrotehničkih mjera u uzgoju hrane.

Godine 2019. upisao sam Preddiplomski sveučilišni studij Biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Studij sam uspješno završio 2022. godine, nakon čega sam upisao Diplomski sveučilišni studij Eksperimentalne biologije na istom fakultetu, modul Fiziologija i imunobiologija, koji trenutno pohađam.

Tijekom studija bio sam iznimno aktivan član Udruge studenata biologije – BIUS, u kojoj sam obnašao niz odgovornih funkcija. Od 2023. obnašao sam dužnost predsjednika Udruge, dok sam prethodno bio član Upravnog odbora zadužen za održavanje web-stranice Udruge, koordinator studentskog časopisa *In Vivo*, te voditelj sekcije za Hymenoptere. U sklopu aktivnosti sekcije izradio sam nekoliko terenskih izvješća vezanih uz proučavanje pčela te proveo niz studentskih istraživačkih projekata slične tematike. Također, bio sam organizator Dana karijera u Biologiji „*Meet the Biologists*“ 2024. godine.

Na međunarodnoj razini sudjelovao sam u raznim inicijativama, uključujući osnivanje BioBalkan Collaba inicijative, prve službene suradnje studenata biologije s područja Balkana. Od 2021. do 2023. godine bio sam hrvatski ambasador mreže Young European Biologist (YEB), u kojoj od 2024. godine obnašam dužnost predsjednika.

Godine 2022. stekao sam profesionalno iskustvo kroz stručnu praksu u Ministarstvu gospodarstva i održivog razvoja, u Zavodu za zaštitu prirode i okoliša, pod mentorstvom dr. sc. Ane Ješovnik. Osim znanstvenih i akademskih aktivnosti, posvećen sam edukaciji i volontiranju u Društvu za izvanokvirnu edukaciju (*Out-of-Frame Education*) gdje sam 2023. bio i voditelj radionice *Biology Crash Course – All of Biology in 10 Days*.