

Utjecaj nanočestica i iona srebra na nakupljanje i transport auksina u korijenu uročnjaka *Arabidopsis thaliana*

Komazec, Bruno

Master's thesis / Diplomski rad

2020

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:217:336077>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-27**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Bruno Komazec

UTJECAJ NANOČESTICA I IONA SREBRA NA NAKUPLJANJE I TRANSPORT
AUKSINA U KORIJENU UROČNJAKA *Arabidopsis thaliana*

Diplomski rad

Zagreb, 2020.

Ovaj rad je izrađen u Laboratoriju za biljnu proteomiku na Zavodu za molekularnu biologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod vodstvom doc. dr. sc. Petre Peharec Štefanić. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra molekularne biologije.

Zahvaljujem se svojoj mentorici, doc. dr. sc. Petri Peharec Štefanić na neizmjernej pomoći, ukazanom strpljenju i danim savjetima tijekom stručne prakse, a potom izrade i pisanja završnog i diplomskog rada.

Zahvaljujem se i Mgr. Davidu Vondrašku s Instituta za Fiziologiju Češke akademije znanosti laboratorija za biomatematiku u Pragu na nesebičnom prijenosu znanja te pomoći oko korištenja multifotonskog konfokalnog mikroskopa. Nadalje, zahvalio bi se i Češkom i Europskom-bioimaging konzorciju koji su mi kroz svoje projekte (Czech-BioImaging large RI project (LM2015062 funded by MEYS CR) i European Regional Development Fund-Project "National infrastructure for biological and medical imaging" (No. CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_013/0001775)) omogućili korištenje ovog mikroskopa.

Zahvaljujem se i Dr. Ilse Letofsky-Papst s Instituta za elektronsku mikroskopiju i nanoanalizu TU Graz (FELMI) i Centra za elektronsku mikroskopiju, Graz (ZFE Graz) na nesebičnom prijenosu znanja te pomoći oko korištenja transmisijskog elektronskog mikroskopa. Također, zahvalio bi EU Horizon 2020 i inovativnom programu "Enabling Science and Technology through European Electron Microscopy" No823717- ESTEEM3 koji financira projekt „Impact of silver nanoparticles on model plants- Focus on AgNP localization and ultrastructural changes of cells and organelles” AgNANO-LUCCO u kojem sam sudjelovao, a koji je omogućio korištenje ovog mikroskopa.

Zahvaljujem se svemu osoblju Laboratorija za biljnu proteomiku zbog poticanja dobre radne atmosfere, ali i na svoj pruženoj pomoći.

Zahvaljujem se i svemu osoblju Laboratorija za kulturu biljnog tkiva koji su na razne načine uvijek bili spremni pomoći.

Zahvaljujem se svim prijateljima i prijateljicama koji su mi davali neizmjernu podršku tokom moga studija.

Posebno se zahvaljujem svojoj obitelji koja me uvijek podržavala i bez koje sve što sam dosad postigao ne bi bilo moguće.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Diplomski rad

UTJECAJ NANOČESTICA I IONA SREBRA NA NAKUPLJANJE I TRANSPORT AUKSINA U KORIJENU UROČNJAKA *Arabidopsis thaliana*

Bruno Komazec

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Nanočestice srebra (AgNP) se koriste zbog protubakterijskog djelovanja u mnogim komercijalno dostupnim proizvodima, uključujući pesticide, ali predstavljaju potencijalnu opasnost za okoliš zbog svoje toksičnosti, reaktivnosti i akumuliranja u biljkama. Zbog svoje velike površine u odnosu na volumen, AgNP su vrlo reaktivne i podložne otpuštanju iona srebra što potencijalno povećava njihovu toksičnost. Biljni hormoni su uvelike zaslužni za normalan rast biljaka, a auksin je jedan od važnijih fitohormona koji ima ulogu u brojnim, metabolički važnim biljnim procesima. Uročnjak (*Arabidopsis thaliana*) je uvriježen modelni organizam u molekularnoj i staničnoj biologiji. U ovome diplomskom radu istražio sam utjecaj PVP-AgNP i ionskog srebra (AgNO₃) na klijance uročnjaka nakon prvog, trećeg, petog, sedmog, devetog i jedanaestog dana tretmana. Sjemenke sam isključivao četiri dana na krutoj MS hranjivoj podlozi, a potom sam klijance prebacio na modificiranu krutu ½ MS hranjivu podlogu s dodatkom PVP-AgNP ili ionskog srebra konačnih koncentracija 25, 50 i 100 µM te kontrolne klijance na krutu podlogu bez dodataka srebra. U krutoj podlozi s dodatkom AgNO₃ primijetio sam stvaranje AgNP koje su se stabilizirale već trećeg dana tretmana. Od trećeg dana pa do jedanaestog dana apsorbancija novonastalih AgNP u podlozi polako je opadala. Nasuprot tome, PVP-AgNP su se u krutoj podlozi u potpunosti stabilizirale tek oko osmog dana. PVP-AgNP i novonastale AgNP utjecale su na duljinu korijena, a lokalizirane su u korijenovoj kapi te međustaničnom prostoru i staničnoj stijenci vrška korijena. Značajne promjene u strukturi korijena i kotiledona nisu zamijećene, no promjene u ultrastrukturi kloroplasta primijećene su na tretmanu sa 100 µM AgNO₃ nakon jedanaestog dana. Kod svih tretmana uočena je promjena akumulacije i transporta auksina koja je ovisila o koncentraciji i trajanju tretmana što pokazuje da se biljka prilagođavala na stres AgNP.

(89 stranica, 46 slika, 3 tablice, 77 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.

Ključne riječi: nanočestice srebra, *Arabidopsis thaliana*, duljina korijena, auksin, lokalizacija, ultrastruktura, stabilnost

Voditelj: Dr. sc. Petra Peharec Štefanić, doc.

Ocjenitelji: Dr. sc. Petra Peharec Štefanić, doc.

Dr. sc. Željka Vidaković-Cifrek, izv. prof.

Dr. sc. Andreja Brigić, doc.

Rad prihvaćen: 19.02.2020.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb

Faculty of Science

Department of Biology

Graduation Thesis

THE EFFECT OF SILVER NANOPARTICLES AND IONS ON THE AUXIN ACCUMULATION AND TRANSPORT IN *Arabidopsis thaliana* ROOT

Bruno Komazec

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Silver nanoparticles (AgNPs) are used for their antimicrobial properties in many commercially available products, including pesticides, but they can pose a risk to the environment due to their toxicity, reactivity and accumulation in plants. Due to their large surface area to volume ratio, AgNPs are highly reactive and susceptible to the release of silver ions, which potentially increases their toxicity. Plant hormones are largely responsible for the normal growth of plants, and auxin is one of the most important phytohormones that play a role in many metabolically important plant processes. The *Arabidopsis thaliana* is an established model organism in molecular and cellular biology. In this thesis, the effects of PVP-AgNPs and silver ions (AgNO_3) on *Arabidopsis* seedlings after one, three, five, seven, nine, and eleven days of treatment were investigated. The seeds were germinated for four days on a solid MS medium and afterwards on a modified solid $\frac{1}{2}$ MS medium supplemented with PVP-AgNPs or silver ions at final concentrations of 25, 50 and 100 μM . Control seedlings were transferred to silver-free solid medium. In AgNO_3 -supplemented solid medium, the formation of AgNPs was noticed which were stabilized on the third day. After the third day and until the eleventh day, the absorbance of the newly formed AgNPs in medium slowly decreased. In contrast, PVP-AgNPs were stabilized in the solid medium around the eighth day. PVP-AgNPs and newly formed AgNPs affected the root length and were localized in the root cap and in the intercellular space and cell wall of the root tip. No significant changes in root and cotyledon structures were observed, but changes in chloroplast ultrastructure were observed on treatment with 100 μM AgNO_3 after the eleventh day. A change in the accumulation and transport of auxin was observed in all treatments, which depended on the concentration and length of treatment, indicating that the plant adjusted to the AgNPs stress.

(89 pages, 46 figures, 3 tables, 77 references, original in: Croatian language)

Thesis deposited in the Central Biological Library.

Key words: silver nanoparticles, *Arabidopsis thaliana*, root length, auxin, localization, ultrastructure, stability

Supervisor: Dr. Petra Peharec Štefanić, Asst. Prof.

Reviewers: Dr. Petra Peharec Štefanić, Asst. Prof.

Dr. Željka Vidaković-Cifrek, Assoc. Prof

Dr. Andreja Brigić, Asst. Prof.

Thesis accepted: 19.02.2020.

Sadržaj

1. UVOD	1
1.1. Nanotehnologija	2
1.1.1. Nanočestice srebra.....	3
1.2. Auksin	3
1.2.1. Vizualizacija auksina.....	4
1.3. Uročnjak (<i>Arabidopsis thaliana</i>).....	5
1.4. Svjetlosna i elektronska mikroskopija.....	6
1.5. Spektrofotometrijsko određivanje stabilnosti nanočestica srebra	9
2. CILJ ISTRAŽIVANJA	10
3. MATERIJALI I METODE	12
3.1. Materijal	13
3.1.1. Nanočestice srebra.....	13
3.1.2. Biljni materijal.....	13
3.2. Metode.....	16
3.2.1. Analiza stabilnosti PVP-AgNP i AgNO ₃ u hranjivoj podlozi.....	16
3.2.2. Morfometrija	16
3.2.3. Transmisijaska elektronska mikroskopija	16
3.2.3.1. Vizualizacija PVP-AgNP u matičnoj otopini.....	16
3.2.3.2. Analiza promjene ultrastrukture stanica i organela kotiledona i vrška korijena	16
3.2.4. Multifotonska konfokalna mikroskopija	18
3.2.4.1. Vizualizacija PVP-AgNP i novonastalih nanočestica srebra iz ionskog srebra (AgNO ₃) u ½ MS hranjivoj podlozi te matičnoj otopini.....	18
3.2.4.2. Praćenje dinamike ulaska i lokalizacije PVP-AgNP i novonastalih nanočestica srebra iz ionskog srebra (AgNO ₃) u korijenu uročnjaka	19
3.2.5. Svjetlosna mikroskopija-svijetlo vidno polje	19
3.2.5.1. Analiza promjene strukture stanica kotiledona i vrška korijena	19
3.2.5.2. Analiza utjecaja PVP-AgNP i ionskog srebra (AgNO ₃) na nakupljanje i transport auksina praćenjem promjene u ekspresiji reporter gena <i>DR5::GUS</i> , <i>PIN1::GUS</i> , <i>PIN7::GUS</i> u korijenu uročnjaka	19
3.2.6. Analiza utjecaja PVP-AgNP i ionskog srebra (AgNO ₃) na nakupljanje i transport auksina praćenjem promjene u ekspresiji reporter gena <i>DR5::GFP</i> , <i>PIN1::GFP</i> , <i>PIN7::GFP</i> u korijenu uročnjaka fluorescencijskom mikroskopijom	21
4. REZULTATI	22
4.1. Vizualizacija PVP-AgNP u matičnoj otopini	23

4.2. Vizualizacija PVP-AgNP i novonastalih nanočestica srebra iz ionskog srebra (AgNO ₃) u ½ MS hranjivoj podlozi.....	24
4.3. Analiza stabilnosti PVP-AgNP i ionskog srebra (AgNO ₃) u ½ MS hranjivoj podlozi.	27
4.4. Analiza duljine korijena klijanaca uročnjaka	31
4.5. Vizualizacija i lokalizacija PVP-AgNP i novonastalih nanočestica srebra iz ionskog srebra (AgNO ₃) u vršku korijena uročnjaka.....	33
4.6. Analiza promjena strukture stanica i ultrastrukture organela kotiledona i vrška korijena.....	46
4.7. Analiza utjecaja PVP-AgNP i ionskog srebra (AgNO ₃) na nakupljanje i transport auksina.....	54
4.7.1. Praćenje promjene u ekspresiji reporter gena <i>DR5::GUS</i> , <i>PIN1::GUS</i> , <i>PIN7::GUS</i> u korijenu uročnjaka.....	54
4.7.2. Praćenje promjene u ekspresiji reporter gena <i>DR5::GFP</i> , <i>PIN1::GFP</i> , <i>PIN7::GFP</i> u korijenu uročnjaka fluorescencijskom mikroskopijom.....	60
5. RASPRAVA.....	70
5.1. Stabilnost PVP-AgNP i ionskog srebra (AgNO ₃).....	71
5.2. Utjecaj PVP-AgNP i ionskog srebra (AgNO ₃) na morfologiju.....	72
5.3. Analiza transporta i nakupljanja auksina nakon tretmana s PVP-AgNP te ionskim srebrom (AgNO ₃).....	76
6. ZAKLJUČAK.....	79
7. LITERATURA	81
Životopis.....	I

Popis kratica i oznaka

½ MS	Hranjiva podloga Murashige-Skoog s polovičnom koncentracijom makroelemenata
AgNP	Nanočestice srebra
deH ₂ O	Destilirana voda
DR5	<i>Direct repeat 5</i>
EDX	Analiza spektra energijski razlučujuće rendgenske spektroskopije
EFTEM	Energijski filtrirana transmisijska elektronska mikroskopija
FLIM	Vrijeme života fluorescencije čestice
GFP	Zeleni fluorescentni protein
GUS	β-glukuronidaza
IAA	Indol-3-octena kiselina
Proteini PIN	Proteini <i>PIN formed</i>
PVP	Polivinilpirolidon
reH ₂ O	Redestilirana voda (miliQ voda)
TEM	Transmisijska elektronska mikroskopija
UV/VIS	Ultraljubičasto zračenje/vidljiva svjetlost

1. UVOD

1.1. Nanotehnologija

Nanotehnologija se bavi proizvodnjom i manipuliranjem čestica na „nano“ razini. Prefiks „nano“ odnosi se na veličinu dimenzija između 0,2 – 100 nm. Naime, pri toj veličini, fizička, kemijska i biološka svojstva materijala se bitno mijenjaju u odnosu na svojstva materijala većih dimenzija. Nanomaterijali se mogu podijeliti u 3 veće skupine. Materijali s jednom dimenzijom u „nano“ veličini nazivaju se slojevi poput grafena. U materijale s dvije dimenzije u „nano“ veličini ubrajaju se nanocjevčice i nanožice. Ukoliko materijali imaju sve tri dimenzije u nanoveličini nazivaju se nanočestice.

Zbog svoje veličine, nanočestice imaju veliki omjer površine i volumena što ih čini dosta reaktivnim materijalima. Radi toga sadrže drugačija svojstva od materijala na makro veličini te su jako korisni kao katalizatori. Nanotehnologija je započela svoje korištenje ponajviše u farmakologiji i medicini kao sustav za transport lijekova. Mnoštvo lijekova je odobreno za korištenje te je mnogo lijekova u kliničkim ispitivanjima (Yu i sur., 2016). U novije vrijeme, nanomaterijali i nanočestice se sve više koriste u raznim granama industrije. U tekstilnoj industriji, nanočestice se koriste u procesu bojanja tekstila dok se u automobilskoj industriji koriste u proizvodnji baterija i čipova. Zbog poboljšanih svojstava poput boje i topivosti, nanomaterijali se uvelike koriste i u kozmetičkoj industriji, ali i u agronomiji. Naime, nanočestice srebra se mogu nalaziti u gnojivima i pesticidima jer je srebro prihvaćen agrokemijski proizvod za uklanjanje neželjenih mikroorganizama u tlu i hidroponskim sustavima (Sharon i sur., 2010). Također se koriste u svrhu transporta pesticida i herbicida, kao stimulatori rasta, ali i u poboljšanju sazrijevanja voća (Yan i Chen, 2019).

Kako je vidljivo da nanomaterijali, a posebice nanočestice, imaju veliki tržišni potencijal potrebno je analizirati i utvrditi možebitne rizike koje dovode sa sobom. Zbog velike upotrebe, nanočestice se nehotice ispuštaju u okoliš. Mnogo istraživanja je pokazalo da nanočestice ulaze u tkiva biljaka čime se podignula sumnja o njihovoj štetnosti. Stampoulis i sur. (2009.) su pokazali da izlaganje biljke tikvice (*Cucurbita pepo*) nanočesticama srebra dovodi do smanjenja biomase u odnosu na kontrolne biljke. Nadalje, pokazano je da nanočestice srebra značajno smanjuju biomasu i inhibiraju rast korijena barske leće *Spirodela polyrrhiza* (Yiang i sur., 2012) dok su Cvjetko i sur. (2016) pokazali da nanočestice srebra induciraju oksidativni stres i djeluju fitotoksično samo u većim koncentracijama u korijenu luka (*Allium cepa*). S druge strane, tretiranje biljke špinata (*Spinacia oleracea*) nanočesticama titanijeva dioksida dovodi do poboljšane fotosinteze i metabolizma dušika čime se ujedno i povećava rast biljke (Zheng i sur., 2005).

1.1.1. Nanočestice srebra

Nanočestice srebra (AgNP) su jedne od češće korištenih nanomaterijala u velikom spektru industrija. Nalaze se u brojnim proizvodima široke potrošnje poput paketa hrane, osobnoj kozmetici, ali se koriste i u raznim medicinskim preparatima (Saqib i Rahim, 2015). Naime, istraživanja su pokazala da se reaktivni kisikovi spojevi (ROS) formiraju na površini nanočestica te da se pri određenim uvjetima otpuštaju ioni srebra koji mogu dovesti do stanične smrti eukariotskih ili prokariotskih stanica zbog čega se koriste kao antimikrobni i antiviralni agensi (Kim i sur., 2007; Levard i sur., 2012). Sam mehanizam antimikrobnog učinka temelji se na vezanju iona srebra (Ag^+) i AgNP na proteine koji sadrže sumpor na bakterijskoj membrani čime dolazi do promjene propusnosti membrana i u konačnici do stanične smrti (Ravishankar i Jamuna, 2011). Zbog navedenih svojstva AgNP imaju veliki potencijal u sprječavanju upalnih procesa rana te samim time poboljšanju oporavka rana (Wang i sur., 2016). Zbog navedenog, smatra se da je potrošnja AgNP na godišnjoj razini oko 300 do 400 tona (Zhang i sur., 2016).

Nanočestice srebra same po sebi nisu stabilne. Naime, u sustavu *in vivo* smatra se da prisustvo raznih oksidirajućih spojeva, ponajviše vodikovog peroksida (H_2O_2), dovodi do disocijacije AgNP na Ag^+ ione (Wei i sur., 2015). Također, AgNP u vodenoj otopini, poput međustanične tekućine, teži ka aglomeraciji u veće nakupine čime se bitno mijenjaju svojstva samih nanočestica imajući u vidu da većina njihovih poželjnih svojstava dolazi upravo iz velikog omjera površine i volumena (Valenti i Giacomelli, 2017). Upravo radi toga, nanočestice srebra u raznim istraživanjima, ali i u industrijskim primjenama su presvučene raznim stabilizirajućim agensima ponajviše polivinilpirolidonom (PVP), citratom, cetiltrimetilamonijevim bromidom (CTAB) te razgranatim polietileniminom (bPEI). Omotači mijenjaju naboj samih nanočestica, ali i utječu na njihovo raspršenje pa i samim time utječu i na toksičnost nanočestica (Tejamaya i sur., 2012). Polivinilpirolidon stabilizira nanočestice te čini ukupni naboj nanočestice blago negativnim, citratni omotač čini ukupni naboj negativnim dok CTAB i bPEI daju nanočesticama ukupni pozitivni naboj (Ahlberg i sur., 2014).

1.2. Auksin

Auksin je jedan od najrasprostranjenijih biljnih hormona te ima ulogu u gotovo svim procesima biljnog rasta i razvoja od inhibicije rasta primarnog korijena te stimulacije rasta bočnog korijenja (Leyser, 2018; Liscum i Reed, 2002). Njegov prirodan oblik u biljkama jest indol-3-octena kiselina (IAA) sintetiziran u biljkama iz triptofana. Kako su prevelike koncentracije auksina iznimno toksične za biljke, sama sinteza auksina u biljkama je strogo

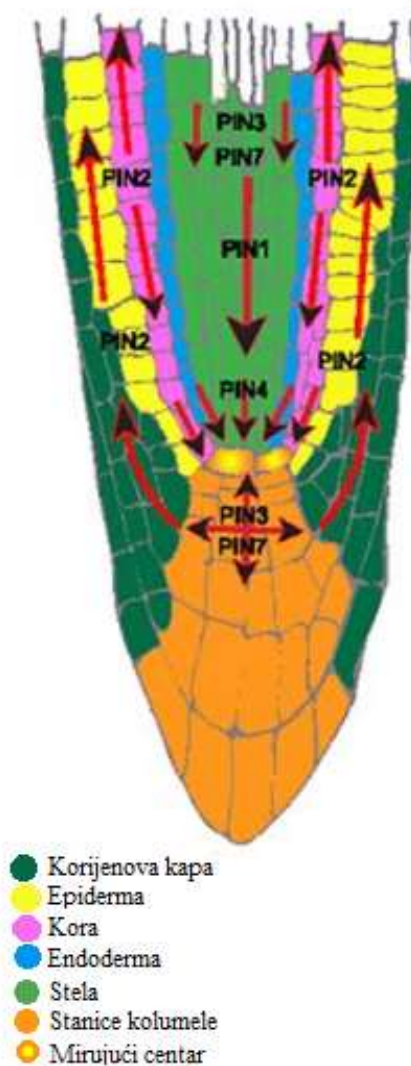
regulirana kako vremenski tako i prostorno. Sinteza je epigenetski regulirana, a odvija se na lokalnoj razini gdje je auksin uključen u regulaciju ekspresije gena čime indirektno utječe i regulira razvoj biljke (Zhao, 2010). S druge strane, biljke posjeduju sustav polarnog transporta auksina koji se ostvaruje pomoću „*PIN-formed*“ (PIN) proteina. Reguliranjem ekspresije potrebnih gena, auksin regulira i ekspresiju PIN proteina te je samim time uključen i u regulaciju vlastite distribucije u raznim biljnim dijelovima.

1.2.1. Vizualizacija auksina

Zbog velike zastupljenosti auksina u biljkama, auksin se koristi kao indikator promjene biljnog razvoja i rasta. Vizualizacija, odnosno mjerenje koncentracije auksina u biljkama pod raznim utjecajima moguća je pomoću raznih reporterskih sustava. Za indirektnu detekciju razine auksina može se koristiti promotor DR5. Naime, istraživanja su pokazala da geni ovisni o auksinu sadrže u svojim promotorima specifičnu sekvencu: TGTCTC. Genetičkim inženjerstvom sintetiziran je promotor DR5 ovisan o auksinu koji sadrži minimalni promotor spojen sa sedam ponavljanja specifične sekvence za auksin (TGTCTC) (Ulmasov i sur., 1997). Stavljanjem raznih reporter gena poput zelenog fluorescentnog proteina (GFP) ili β -glukuronidaze (GUS) pod aktivnost promotora DR5 moguće je indirektno pratiti sintezu auksina (Chen i sur., 2013). Kao što je već navedeno, PIN proteini su zaslužni za polarni transport auksina u biljci, no njihova sinteza je i ovisna o auksinu. Stoga fuzijom gena za PIN proteine s određenim reporter genima poput GFP ili GUS moguće je direktno pratiti promjenu sinteze i relokalizacije auksina unutar biljke.

Rastući korijen biljke može se podijeliti u tri zone: zonu diferencijacije, zonu elongacije te meristemsku zonu. Čestim diobama stanica u meristemske zone, dolazi do stvaranja korijenove kape. Korijenova kapa služi za zaštitu meristemskih stanica od mehaničkog oštećenja. Unutar meristema se najčešće nalazi i mirujuć centar u kojemu se nalaze stanice koje su većinom u G1 fazi staničnog ciklusa te se dijele ukoliko dođe do oštećenja stanica meristema te korijenove kape. U zoni produženog rasta stanice se više dijele u odnosu na meristemsku zonu, dok su u zoni diferencijacije vidljive sve vrste stanica potrebne za normalno funkcioniranje korijena. Nakon korijenove kape na vrhu korijena, nalaze se epiderma, kora, endoderma te u konačnici stela, odnosno provodno tkivo (Enstone i sur., 2003). PIN proteini su lokalizirani na različitim mjestima: PIN1/2/3/4/7 su lokalizirani na plazma membrani, PIN5/8 su lokalizirani na membrani endoplazmatskog retikuluma (ER) dok PIN6 ima dvostruku lokalizaciju i na plazma i na ER membrani. PIN1/2/3/4/7 proteini su također unutar korijenovog vrška lokalizirani na različitim mjestima čime imaju različite

funkcije (slika 1). PIN1 je lokaliziran na bazalnoj strani vaskularnog sustava korijena, PIN2 se nalazi na bazalnoj strani kortikalnih stanica i na bazalnoj strani epidermalnih i stanica korijenove kape. PIN3 je lokaliziran stanicama kolumele korijena, PIN 4 na bazalnoj strani stanica središnjeg meristema korijena te PIN7 na bazalnoj strani stanica stele i apolarno u stanicama kolumele (Feraru i Friml, 2008).



Slika 1. Polarna lokalizacija PIN proteina u vrhu korijena uročnjaka. Strelicama je prikazan smjer transporta auksina. Preuzeto i prilagođeno prema Feraru i Friml, 2008.

1.3. Uročnjak (*Arabidopsis thaliana*)

Ovo istraživanje provedeno je na modelnom organizmu *Arabidopsis thaliana*, biljci poznatijoj pod imenom uročnjak. Otkrio ju je Johannes Thal na planini Harz u središnjoj Njemačkoj u 16. stoljeću. Uročnjak je jednogodišnja biljka koja pripada porodici

Brassicaceae. Raste do 25 cm u visinu te listovi formiraju strukturu rozete pri bazi biljke s nekolicinom listova na biljnoj stabljici. Sami listovi su prekriveni malim, jednostaničnim slojem biljnih dlačica, trihomima. Struktura cvijeta je tipična za porodicu *Brassicaceae*, s cvjetovima od 3 mm u promjeru raspoređenih u cvatove. Plod biljke je komuška duga od 5 do 20 mm koja sadrži od 20 do 30 sjemenki (Krämer, 2015). Uročnjak sadrži jednostavan korijenski sustav koji se sastoji od jednog primarnog korijena koji raste vertikalno u zemlju koji kasnije stvara lateralno bočno korijenje. Uročnjak može završiti svoj cijeli životni ciklus unutar šest tjedana (Wixon, 2001).

Uročnjak se zbog svojih svojstava, poput lakoće kultiviranja, kratkog životnog ciklusa te visokog prinosa sjemenki svrstao u jedne od najčešće korištenih biljnih modelnih organizama u staničnoj i molekularnoj biologiji. Nadalje, prvi biljni potpuno sekvencirani, relativno mali genom od 125 Mb te pet kromosoma čini ga idealnim kandidatom za razna genetička ispitivanja. Sam genom se sastoji od 27416 gena koji kodiraju za 39361 protein (www.arabidopsis.org pristupljeno 12.01.2020.; www.uniprot.org pristupljeno 12.01.2020.). Zbog svega navedenog, uročnjak se do sada koristio u brojnim istraživanjima, od utjecaja raznih spojeva poput bisfenola A na rast, sastav pigmenata i aktivnost fotosistema II (Rapala i sur., 2017), aktivnosti raznih enzima (Ding i sur., 2019) i slično.

1.4. Svjetlosna i elektronska mikroskopija

Proučavanje utjecaja raznih tvari na ultrastrukturne promjene u biljnim stanicama nije moguće golim okom zbog njihove male veličine. Kako bi se mogle pratiti možebitne morfološke promjene stanica potrebno je korištenje mikroskopa.

Mikroskop je instrument pomoću kojega je moguće razlučiti male detalje u malim objektima poput biljnih stanica. Naime, princip rada se svodi na fokusiranje svjetlosne zrake pomoću sustava leća na promatrani uzorak. Svjetlost, prolaskom kroz uzorak, stvara sliku koja se potom povećava putem sustava konveksnih leća objektiva. Većina mikroskopa koristi okulare za vizualizaciju slike koji sadrže dodatne leće za povećanje slika, stoga se konačno povećanje uzorka dobiva množenjem uvećanja objektiva te okulara. Raspon povećanja se proteže od 10 do 1000 puta sa snagom razlučivanja od 0,2 μm , što uvelike ovisi o tipu i numeričkoj aparaturi sustava leća objektiva (Holgate i Webb, 2003).

Svjetlosna mikroskopija također nudi mogućnost praćenja lokalizacije i/ili povećane ekspresije određenih proteina unutar stanica pomoću fluorescencije određenih materijala.

Fluorescencijska mikroskopija je jedna od češće korištenih metoda u staničnoj i molekularnoj biologiji zbog veće snage razlučivosti od konvencionalne svjetlosne mikroskopije. Princip rada se svodi na korištenju fluorescentnih boja (fluorofora) koje apsorbiraju svjetlost određene valne duljine te emitiraju svjetlost druge, dulje valne duljine (Rost, 1999). Detektor zatim prikuplja emitiranu svjetlost koja se potom pretvara u sliku. Kako većina molekula u stanici ne fluoresciraju, moguće je obilježavanje proteina od interesa s određenim fluoroforom čime je moguće indirektno vizualizirati obilježene proteine unutar samih stanica. Obilježavanje uzoraka je moguće na dva načina: 1) imunofluorescencijom, gdje se uvode fluoroforom obilježena antitijela koja se vežu na određene proteine od interesa te 2) genetičkim putem, gdje se gen za fluorescentni protein (poput GFP-a) spaja s genom za protein od interesa te se uvodi u genom stanica pomoću plazmida (Thorn, 2015). Genetičkim putem moguća je vizualizacija promjena ekspresije i/ili lokalizacije proteina od interesa u živim stanicama pod utjecajima određenih tvari.

Do limita fluorescencijske mikroskopije dolazimo kada želimo sagledati i analizirati 3D raspodjelu fluorescirajućih molekula unutar određene strukture. Naime, fluorescirajuća svjetlost dolazi od molekula koje se nalaze u raznim ravninama uzoraka te je fluorescencijskom mikroskopijom moguće vizualizirati jedino superpoziciju fluorescentnih slika s mnogo ravnina promatrane strukture. Rješavanje navedenog problema moguće je korištenjem konfokalne mikroskopije. Navedeni mikroskop omogućava vizualizaciju fluorescentnih molekula na određenoj, fokusiranoj razini uzorka. Brzim prolaskom kroz više razina uzorka te spremanjem svih promatranih razina moguće je, u konačnici, konstruirati 3D sliku fluorescencije promatranog uzorka (Fredrich, 1999). No tradicionalna konfokalna mikroskopija ima određene granice debljine uzorka do kojih svjetlost lasera može penetrirati. Multifotonska konfokalna mikroskopija omogućuje vizualizaciju reflektirajućih i/ili luminiscirajućih molekula na određenoj, dubljoj razini uzorka simultanim infracrvenim pobuđivanjem pomoću dva elektrona. Zbog korištenja sustava dva elektrona u području valne duljine blizu infracrvene svjetlosti eliminirana je pozadinska autofluorescencija te je fototoksičnost svedena na minimum. Time se postiže mogućnost vizualizacije puno debljeg prereza (do 100 mikrona) te samim time konstrukcije informativnije 3D slike (Chen i sur., 2018). Dodatna mogućnost konfokalne mikroskopske je određivanje vremena života fluorescencije čestica (*Fluorescence Lifetime Imaging*, FLIM). Vrijeme života fluorescencije čestice definirano je kao vrijeme u kojemu fluorofor ostaje u pobuđenom stanju, odnosno vrijeme od pobuđivanja fluorofora do vraćanja u osnovno, nepobuđeno stanje (Keogh, 2007).

Promatranje lokalizacije čestica na „nano“ razini, poput nanočestica srebra, unutar biljne stanice nije moguće svjetlosnom mikroskopijom zbog nedovoljne snage razlučivosti. Za vizualizaciju čestica takvih veličina potrebna je transmisijska elektronska mikroskopija (TEM). TEM funkcionira na principu emitiranja velike količine elektrona (npr. zagrijavanjem volframove niti) te njihovim fokusiranjem pomoću elektromagnetskih leća na uzorak. Snop elektrona zatim prolazi kroz uzorak te se, ovisno o gustoći djela uzorka kroz koji su prošli, ili rasprše ili prođu do fluorescentnog zaslona na dnu mikroskopa. Dolaskom do fluorescentnog zaslona, stvara se slika uzorka ovisna o gustoći atoma elemenata, odnosno o količini elektrona koji su prošli kroz uzorak. Zbog korištenja elektrona koji imaju značajno manju valnu duljinu u odnosu na valnu duljinu vidljive svjetlosti, pomoću TEM-a moguće je postići snagu razlučivosti i do 0,10 nm (Molecular Cell Biology, 2000).

Klasičnim TEMom moguće je vizualizirati razne organele, ali i čestice u međustaničnim i unutarstaničnim prostorima, no nije moguće odrediti elementalnu strukturu navedenih čestica, pa samim time ni razlučiti između staničnih artefakata i promatranih struktura. No prolaskom kroz uzorak, elektroni reagiraju s atomskim jezgrama uzorka te dolazi do elastičnog i neelastičnog raspršenja. Pri neelastičnom raspršenju, dolazi do gubitka energije i promjene smjera kretanja elektrona. Navedeni gubitak energije se može kvantificirati, a pošto je količina izgubljene energije karakteristična za svaki element, moguće je odrediti elementarnu mapu. Na navedenom principu radi energijski filtrirana transmisijska elektronska mikroskopija (eng. *Energy-filtered transmission electron microscopy*, EFTEM) kojom je moguće razlikovati razne vizualizirane čestice po njihovom elementarnom sastavu (<https://eels.info/about/techniques/eftem> pristupljeno 12.01.2020.).

Dodatnu provjeru elementarnog sastava određenih vizualiziranih čestica nudi analiza spektra energijski razlučujuće, odnosno disperzivne rendgenske spektroskopije (eng. *Energy Dispersive X-Ray Analysis*, EDX). TEM-EDX radi na principu fokusiranja snopa elektrona na mali promatrani dio uzorka. Elektroni dolaze u interakciju s elektronima u unutarnjim elektronskim ljuskama atoma uzorka te izbacuju elektron iz ljuske. Potom elektron iz više ljuske prelazi na upražnjeno mjesto te se otpušta energija u obliku X-zraka. Otpuštena energija se detektira, a kako svaki element ima karakterističnu vrijednost otpuštene energije, pomoću EDX detektora se može odrediti elementarni sastav promatranog djela uzorka u obliku emisijskog spektra (Scimeca i sur., 2018). EDX je korisna metoda u području dostave lijekova u stanice poput kemoterapeutika gdje se koristi za detekciju nanočestica. Također, koristi ga se i u otkrivanju zagađenja s teškim metalima, ali i utjecaju nakupljanja teških

metala u kostima na promijenjeni metabolizam kosti i strukturu stanica kod osoba oboljelih od osteoporoze (Scimeca i sur., 2014; Scimeca i sur., 2017; Scimeca i sur., 2018)

1.5. Spektrofotometrijsko određivanje stabilnosti nanočestica srebra

Nanočestice srebra su dosta nestabilne. U različitim okruženjima, poput citosola, mogu težiti ili ka aglomeraciji ili ka disocijaciji na Ag^+ ione (Wei i sur., 2015). Kako bi se utvrdio utjecaj nanočestica srebra na biljku potrebno je prvo odrediti stabilnost samih nanočestica u krutim ili tekućim hranjivim podlogama za izlaganje biljaka nekom tretmanu.

Jedna od brzih i jednostavnih metoda za određivanje količine čestica u određenoj otopini ili krutini jest UV-VIS spektrofotometrija. Ova metoda radi na principu mjerenja apsorbiranog intenziteta svjetla. Detektirani intenzitet svjetlosti se pretvara u signal te se u konačnici dobiva spektar. Poznavajući na kojoj valnoj duljini čestica od interesa apsorbira svjetlo moguće je kvantificirati količinu čestica od interesa u promatranim otopinama ili krutinama (Nilapwar i sur., 2011). Također, poznavanjem odnosa veličine nanočestica s valnom duljinom na kojoj čestice određene veličine apsorbiraju, moguće je vrlo lako približno odrediti veličinu analiziranih nanočestica (Fleger i Rosenbluh, 2009).

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Povećano korištenje nanočestica srebra u raznim industrijama povlači za sobom i pitanje njihove sigurnosti za okoliš, a samim time i za biljne i životinjske organizme. U zadnjih nekoliko godina mnogo radova se bavi tematikom utjecaja nanočestica srebra na animalne stanice, no manji je broj onih koji se bavi utjecajima istih na biljne stanice. Radi toga, ovo istraživanje je usmjereno ka otkriću novih spoznaja o utjecaju nanočestica i iona srebra na morfologiju biljke te na nakupljanje i transport jednog od najzastupljenijih biljnih hormona, auksina. Stoga, ciljevi ovog diplomskog rada su:

- Istražiti utjecaj PVP-AgNP i ionskog srebra (AgNO_3) različitih koncentracija na nakupljanje auksina praćenjem promjena u ekspresiji reporter gena *DR5::GFP* i *DR5::GUS*
- Istražiti utjecaj PVP-AgNP i AgNO_3 različitih koncentracija na transport auksina praćenjem promjene u ekspresiji reporter gena *PIN1::GFP* i *PIN7::GFP* te *PIN1::GUS* i *PIN7::GUS*
- Analizirati promjene strukture i ultrastrukture stanica i organela listića i vrška korijena pod utjecajem PVP-AgNP i AgNO_3
- Istražiti dinamiku unosa i lokalizaciju PVP-AgNP u korijenovom vršku
- Analizirati stabilnost PVP-AgNP i AgNO_3 u krutoj $\frac{1}{2}$ MS podlozi

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijal

3.1.1. Nanočestice srebra

Nanočestice srebra dobivene su redukcijom srebrova nitrata (AgNO_3) te potonjom stabilizacijom pomoću polivinilpirolidona (PVP). PVP-om stabilizirane nanočestice srebra postaju slabo negativno nabijene. Laboratorijski sintetizirane nanočestice, veličine 50 nm, pripremio je Prof. D. Mark Lyons iz centra za istraživanje mora, Institut Ruđer Bošković.

3.1.2. Biljni materijal

Za potrebe ovog rada koristio sam biljku uročnjak divljeg tipa, ekotip Columbia (Col-0) i šest transgeničnih reporter linija: a) transkripcijske reporter linije s GFP ili GUS biljgom za indirektnu detekciju razine auksina ($DR5::GFP$, $DR5::GUS$) u kojima je ispred kodirajuće regije za GFP ili GUS smješten sintetski auksinski biosenzor $DR5$. Nadalje, koristio sam i jednu transkripcijsku reporter liniju PIN transportera auksina ($PIN1p::GUS$) i tri translacijske reporter linije PIN transportera auksina ($PIN1::GFP$ te $PIN7::GFP$ i $PIN7::GUS$) obilježenih s GFP ili GUS biljgom. Sve četiri linije imaju kodirajuću sekvencu PIN1 ili PIN7 proteina u istom okviru čitanja s C-terminalno dodanim GFP ili GUS reporter genom pod kontrolom pripadajućeg PIN promotora. Sjemenke su dobivene ljubaznošću dr. sc. Nenada Malenice, doc.

Sjemenke uročnjaka divljeg tipa i 6 transgeničnih biljaka sterilizirao sam inkubacijom od 1 minute u 70%-tnom (v/v) etanolu, potom inkubacijom od 10 minuta u otopini za sterilizaciju (1% Izosan G i 0,1% mukazol otopljeni u destiliranoj vodi) na miješalici. Sjemenke sam zatim isprao pet puta s autoklaviranom destiliranom vodom u sterilnom okruženju unutar laminarnog kabineta s horizontalnim strujanjem zraka. Potom sam sjemenke stavio na temperaturu od $+4\text{ }^\circ\text{C}$ na stratifikaciju u trajanju od dva dana. Sjemenke sam u konačnici nasadio na sterilne krute hranjive MS podloge (Murashige i Skoog, 1962) (tablica 1). Sjemenke su iskljavale i rasle četiri dana u uvjetima dugog dana (16 sati svjetlo, 8 sati mrak) pri temperaturi od $24\text{ }^\circ\text{C}$ i intenzitetu svjetla od $75\text{ }\mu\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$. Klijance uročnjaka stare četiri dana sam u sterilnim uvjetima prebacio na modificiranu, krutu hranjivu $\frac{1}{2}$ MS podlogu (tablica 1), s dodatkom matične otopine PVP-AgNP (molarna koncentracije od $973\text{ }\mu\text{M}$) ili AgNO_3 (molarna koncentracija od 100 mM) konačnih koncentracija od 25, 50 ili $100\text{ }\mu\text{M}$ (tablica 2). Kontrolne klijance stare četiri dana sam prebacio na modificiranu $\frac{1}{2}$ MS hranjivu podlogu bez dodataka PVP-AgNP ili AgNO_3 . Matičnu otopinu AgNO_3 molarne koncentracije od 100 mM pripremio sam u miliQ vodi te profiltrirao pomoću $0,45\text{ }\mu\text{m}$ filtra

prije korištenja u svrhu uklanjanja mogućih bakterijskih kontaminacija u otopini. Biljke su rasle na tretmanima u ranije opisanim kontroliranim uvjetima do trenutka uzorkovanja.

Tablica 1. Sastav modificirane hranjive MS podloge s punom i polovičnom ($\frac{1}{2}$ MS) koncentracijom makroelemenata.

Sastojci	Matična otopina	MS	$\frac{1}{2}$ MS
KNO₃ deH₂O	95 g do 500 mL	10 mL	5 mL
NH₄NO₃ deH₂O	82,2 g do 500 mL	10 mL	5 mL
MgSO₄ × 7 H₂O deH₂O	18,5 g do 500 mL	10 mL	5 mL
CaCl₂ × 7 H₂O deH₂O	37,78 g do 500 mL	10 mL	5 mL
KH₂PO₄ deH₂O	8,5 g do 500 mL	10 mL	5 mL
NaEDTA FeDO₄ deH₂O	3,77 g 2,78 g do 500 mL	5 mL	2,5 mL
H₃BO₄ MnSO₄ × H₂O ZnSO₄ × 7 H₂O KI NaMoO₄ × 2 H₂O CuSO₄ × 5 H₂O CoCl₂ × 6 H₂O deH₂O	3,1 g 8,45 g 4,3 g 415 mg 125 mg 12,5 mg 12,5 mg do 500 mL	1 mL	1 mL
B1	0,331 μM	100 μL	100 μL
B6	2,431 μM	500 μL	500 μL
Nikotinska kiselina	4,0614 μM	500 μL	500 μL
Glicin	26.6418 μM	2 mL	2 mL
Myo-inozitol		0,10 g	0,10 g
Saharoza		20 g	20 g
Agar		8,4 g	8,4 g
pH		5,8	5,8
deH₂O		Do 1 L	Do 1 L

Tablica 2. Sastav otopina za tretman četiri dana starih klijanaca uročnjaka.

	$\frac{1}{2}$ MS hranjiva podloga / mL	973 μ M matična otopina PVP- AgNP / mL	100 mM matična otopina AgNO ₃ / mL	Ukupni volumen / mL
Kontrola	70	0	0	0,70
Tretman s 25 μM PVP-AgNP	58,46	1,54	-	0,60
Tretman s 50 μM PVP-AgNP	56,90	3,10	-	0,60
Tretman sa 100 μM PVP-AgNP	53,80	6,20	-	0,60
Tretman s 25 μM AgNO₃	69,83	-	0,17	0,70
Tretman s 50 μM AgNO₃	69,65	-	0,35	0,70
Tretman sa 100 μM AgNO₃	69,30	-	0,70	0,70

3.2. Metode

3.2.1. Analiza stabilnosti PVP-AgNP i AgNO₃ u hranjivoj podlozi

Pripremljenu i steriliziranu ½ MS hranjivu podlogu s dodatkom matične otopine PVP-AgNP i matične otopine AgNO₃, kako bi dobio konačne koncentracije od 25, 50 i 100 µM, sam izlio u sterilne plastične uvete u sterilnim uvjetima. Kao kontrolu sam koristio ½ MS hranjivu podlogu bez dodatka PVP-AgNP ili AgNO₃. Na otvor plastičnih uveta sam stavio parafilm kako se hranjiva podloga unutar njih ne bi kontaminirala bakterijama. Apsorbanciju nanočestica srebra sam mjerio UV-VIS spektrofotometrom. Apsorbanciju AgNP sam mjerio neposredno nakon miješanja ½ MS hranjive podloge sa matičnim otopinama PVP-AgNP i AgNO₃ te svaki dan u periodu od prvog do jedanaestog dana. Spektar sam mjerio u rasponu od 300 do 800 nm pomoću uređaja Specord 50 plus, Analytik Jena, Njemačka. Dobivene podatke obradio sam u programu Excel.

3.2.2. Morfometrija

Klijance uročnjaka divljeg tipa stare četiri dana stavio sam na ½ MS hranjivu podlogu bez i s dodatkom PVP-AgNP i AgNO₃ konačnih koncentracija od 25, 50 i 100 µM. Tri do pet klijanca uročnjaka sam postavio na staklenu ploču te skenirao pomoću uređaja za skeniranje (Epson perfection V700 photo) nakon prvog, trećeg, petog, sedmog, devetog i jedanaestog dana tretmana. Pomoću programa Image J, Fiji (Schindelin i sur., 2012) izmjerio sam duljinu korijena klijanaca nakon gore navedenih dana tretmana. Dobivene podatke statistički sam obradio u programu za statistiku (Statistica 13, TIBCO Software Inc.).

3.2.3. Transmisijska elektronska mikroskopija

3.2.3.1. Vizualizacija PVP-AgNP u matičnoj otopini

Dva mikrolitra matične otopine PVP-AgNP sam nakapao na bakrenu mrežicu presvučenu folijom Formvar te naparenu ugljikom. Nakon što se uzorak osušio analizirao sam ga monokromatskim transmisijskim elektronskim mikroskopom TF20, (model Tecnai G2, FEI, Nizozemska) pri 200 kV.

3.2.3.2. Analiza promjene ultrastrukture stanica i organela kotiledona i vrška korijena

Analiza morfologije provedena je na vršku korijena i kotiledonima uročnjaka. Uzorci su pripremljeni prema modificiranom protokolu opisanom u Peharec Štefanić i sur., 2013.

Nakon prvog i jedanaestog dana tretmana odrezao sam vršne dijelove korijena uročnjaka divljeg tipa u duljini od 5 mm te dijelove kotiledona. Odrezane vršne dijelove

korijena i dijelove kotiledona fiksirao sam u 2%-tnom glutaraldehydu u 0,5 M kakodilatnom puferu (pH = 7,2) u trajanju od 60 minuta na ledu (+4 °C). Radnu otopinu kakodilatnog pufera pripremio sam prvo otapanjem 4,28 g natrijevog kakodilatata ($C_2H_6AsNaO_2$) u 100 mL deH₂O čime sam pripremio 2 M matičnu otopinu. Zatim sam razrjeđivanjem dobivene matične otopine na 0,5 M pomoću deH₂O dobio radnu otopinu kakodilatnog pufera. Nakon fiksacije u glutaraldehydu i kakodilatnom puferu, uzorke sam isprao dva puta sa po 1 mL kakodilatnog pufera u trajanju od 10 minuta. Nakon ispiranja, uzorke sam postfiksirao uranjanjem u 1%-tnu otopinu osmijeva tetroksida u 0,5 M kakodilatnom puferu (pH=7,2) u trajanju od 60 minuta na temperaturi od +4 °C. Uzorke sam potom ponovno isprao s deH₂O u trajanju od 10 min pri +4 °C.

Nakon postfiksacije u osmijevom tetroksidu, uzorke sam dehidrirao pomoću serije rastuće koncentracije etanola pri sobnoj temperaturi. Uzorke sam uronio u otopinu etanola te inkubirao u trajanju od 10 minuta nakon kojih sam otopinu zamijenio s etanolom veće koncentracije. Uzorke sam inkubirao redom u 50%, 60%, 70%, 80% i 96% etanolu te sam ih u konačnici prebacio u 100% etanol na prekonoćnu inkubaciju. Nakon dehidracije u seriji etanola uzorke sam stavio u smjesu 100% etanola i acetona (1:1) te inkubirao 30 minuta pri sobnoj temperaturi. Potom sam uzorke inkubirao 30 minuta u čistom acetonu.

Nakon završenog postupka dehidracije uzorke sam uklopio u epoksidnu smolu, odnosno Spurrovo sredstvo na način da sam ih uronio u smjesu acetona i Spurrovog sredstva prvo u omjeru 3:1 u trajanju od 30 min, zatim 1:1 u trajanju od 30 min te konačno u 100%-tnom Spurrovo sredstvo u trajanju od 3h pri 40 °C. Uz identifikacijske oznake, u kalupe za uklapanje sam uz gornji rub postavio komadiće tkiva kako bi mogao dobiti uzdužne prereze korijena i poprečne prereze kotiledona. Uzorke i identifikacijske oznake sam zatim prekrpio sa Spurrovim sredstvom koji se potom polimerizirao na temperaturi od 65 °C u trajanju od 48 sati.

Nakon što se Spurrovo sredstvo polimeriziralo, pripremio sam ultratanke prereze debljine 70 nm pomoću ultramikrotoma (model Ultracut R, Leica, Njemačka). Tako dobiveni ultratanki prerezi plivali su na površini vode u bazenčiću staklenog noža ultramikrotoma te sam ih dotaknuo bakrenom mrežicom presvučenom Formvarom te naparenu ugljikom kako bi se prerezi prenijeli na mrežicu. U konačnici, uzorke sam dodatno kontrastirao 4%-tnom vodenom otopinom uranil acetata u trajanju od 10 minuta te potom olovnim citratom (pH=12) u trajanju od 10 minuta (Reynolds, 1963). Promjene ultrastrukture organela vrška korijena i

kotiledona analizirao sam transmisijskim elektronskim mikroskopom (model Morgagni 268D, FEI, Nizozemska) pri 70 kV.

Nadalje, PVP-AgNP kao i novonastale nanočestice srebra dobivene u interakciji krute $\frac{1}{2}$ MS hranjive podloge i AgNO_3 , lokalizirao sam u vršku korijena uročnjaka pomoću monokromatskog transmisijskog elektronskog mikroskopa TF20, (model Tecnai G2, FEI, Nizozemska) pri 200 kV opremljenog s detektorom za energijski razlučujuću/disperzivnu rendgensku spektroskopiju (EDX) kojim sam detektirao te nedvojbeno potvrdio srebro u vršku korijena u nanočestičnom obliku.

3.2.4. Multifotonska konfokalna mikroskopija

3.2.4.1. Vizualizacija PVP-AgNP i novonastalih nanočestica srebra iz ionskog srebra (AgNO_3) u $\frac{1}{2}$ MS hranjivoj podlozi te matičnoj otopini

Matičnu otopinu PVP-AgNP i matičnu otopinu AgNO_3 sam nakapao na zasebna predmetna stakalca, prekrivši pokrovnicom te analizirao na laserskom multifotonskom skenirajućem konfokalnom mikroskopu (Leica TCS SP8 X) s multi-imerzijskim 20x objektivom (HC PL APO CS2 20x/0,75 IMM). Prvo sam napravio lambda sken kako bih odredio pravilnu pobuđujuću valnu duljinu i spektar u kojemu se detektiraju nanočestice srebra, a ujedno pri kojoj se minimalizira autofluorescencijski signal. Refleksijske i transmisijske slike su prikupljene s pobuđujućom valnom duljinom od 476 nm korištenjem argonskog lasera. Emisijski signal je potom filtriran koristeći sustav akustično-optičkog razdvajanja snopa svjetla, disperzije temeljene na prizmi te sustava zrcala. U konačnici je željena emisija detektirana na unutarnjim HyD detektorima (Leica TCS SP8 X *scan-head*). Multifotonske slike, odnosno slike luminiscencije te slike mjerenja vremena života fluorescencije FLIM-a su dobivene pomoću izvora pobuđujuće svjetlosti valne duljine od 740 nm iz multifotonskog pulsirajućeg lasera (Chameleon Discovery TPC, 80 Mhz, 140 ± 10 fs). Emisijski signal je filtriran pomoću SP680 dikroidnog zrcala 560 te pomoću filtera propuštanja 525/50 i 610/70. Za detekciju luminiscentnog signala i FLIM koristio sam HyD detektore (Leica). Za mjerenje vremena života fluorescencije (FLIM) koristio sam Becker i Hickl SPC-150 modul koristeći pritom vremenski korelirano brojanje pojedinačnih fotona u vremenu od 300 sekundi (*Time-correlated single photon counting*, TCSPC).

3.2.4.2. Praćenje dinamike ulaska i lokalizacije PVP-AgNP i novonastalih nanočestica srebra iz ionskog srebra (AgNO_3) u korijenu uročnjaka

Četiri dana stare klijance uročnjaka divljeg tipa, tretirane jedan, tri, pet, sedam, devet i jedanaest dana na $\frac{1}{2}$ MS hranjivoj podlozi s dodatkom PVP-AgNP ili AgNO_3 konačne koncentracije 100 μM postavio sam na predmetno stakalce te prekrrio pokrovnicom. Nanočestice srebra u vršku korijena sam vizualizirao multifotonskim konfokalnim mikroskopom (Leica TCS SP8 X) s multi-imerzijskim 20x objektivom (HC PL APO CS2 20x/0,75 IMM) te ih snimio pri reflektirajućim, transmisijskim i multifotonskim postavkama mikroskopa te sam i mjerio vrijeme života fluorescencije čestica (FLIM).

3.2.5. Svjetlosna mikroskopija-svijetlo vidno polje

3.2.5.1. Analiza promjene strukture stanica kotiledona i vrška korijena

Nakon prvog i jedanaestog dana tretmana klijanci uročnjaka divljeg tipa su pripremljeni na način opisan u poglavlju 3.2.3.2. Za potrebe svjetlosne mikroskopije napravio sam poludebele prereze debljine 1 μm pomoću ultramikrotoma (model Sorvall RMC, Mt6000-XL ultramikrotom, Njemačka). Dobivene prereze prenio sam na predmetno stakalce u kap 10%-tnog acetona te zagrijao predmetnicu pomoću plinskog plamenika kako bi aceton brzo ispario, a prerez uzorka se zalijepio na predmetno stakalce. Prerez sam potom obojao smjesom 2%-tnog toluidinskog modrila i 2%-tnog boraksa (1:1). Predmetno stakalce s uzorkom sam zagrijavao provlačeći ga kroz plamen plinskog plamenika u trajanju od 10 sekundi. Višak boje sam isprao pod tekućom vodom te sam pokrio prerez pokrovnicom. Tako dobivene uzorke sam u konačnici promatrao svjetlosnim mikroskopom (Olympus BX51) te ih snimio digitalnom kamerom (Olympus DP70).

3.2.5.2. Analiza utjecaja PVP-AgNP i ionskog srebra (AgNO_3) na nakupljanje i transport auksina praćenjem promjene u ekspresiji reporter gena *DR5::GUS*, *PIN1::GUS*, *PIN7::GUS* u korijenu uročnjaka

Za potrebe analize utjecaja PVP-AgNP i ionskog srebra (AgNO_3) na nakupljanje i transport auksina praćenjem promjene u ekspresiji GUS reporter gena pripremio sam GUS pufer (tablica 3) i 10 mL 20 mM X-Gluc matične otopine. Za pripremu GUS pufera prvo sam pripremio 2 M otopinu natrijevog fosfatnog pufera otapanjem 27,6 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ u 100 mL de H_2O čime sam dobio 2 M otopinu natrijevog hidrogen fosfata. Potom sam otopio 35,6 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ u 100 mL de H_2O čime sam pripremio 2 M otopinu natrijevog dihidrogen fosfata. Miješanjem 39 mL 2 M natrijevog hidrogen fosfata i 61 mL natrijevog dihidrogen fosfata pripremio sam 2 M natrij fosfatni pufer te namjestio pH na 7,0 pomoću pH metra

(Sartorius, Njemačka). U pripremi radne otopine GUS pufera za bojanje koristio sam i 50 mM otopine kalijevog heksacijanoferata (III) ($K_3[Fe(CN)_6]$) i kalijevog heksacijanoferata (II) ($K_4[Fe(CN)_6]$) koje su ranije pripremljene te autoklavirane pazeći pritom da ne prenesem nastali crveni talog. 10%-tni Triton X-100 (v/v) pripremio sam miješanjem 1 mL 100%-tnog Triton X-100 i 9 mL deH₂O. 0,5 M otopinu EDTA pripremio sam otapanjem 18,612 g Na₂EDTA × 2H₂O u 90 mL deH₂O. Potom sam namjestio pH otopine na 8,0 pomoću pH metra (Sartorius, Njemačka) i 10M NaOH. Nakon namještanja pH, nadopunio sam otopinu s deH₂O do 100 mL.

Radnu otopinu GUS pufera za bojanje uzoraka pripremio sam na način da sam pomiješao 19 mL GUS pufera s 1 mL 20 mM matične otopine X-Gluc-a konačne koncentracije 1 mM. Radnu otopinu GUS pufera za bojanje sam čuvao na +4 °C.

Tablica 3. Sastav GUS pufera

Sastojci	Dodani volumen	Konačna koncentracija
2 M Natrij fosfatni pufer (pH 7,0)	25 mL	100 mM
0,5 M EDTA (pH 8,0)	10 mL	10 mM
50 mM K₃[Fe(CN)₆]	5 mL	0,5 mM
50 mM K₄[Fe(CN)₆]	5 mL	0,5 mM
10% (v/v) Triton X-100	5 mL	0,1% (v/v)
deH₂O	do 500 mL	

Transgenične reporter transkripcijske (*DR5::GUS* i *PIN1::GUS*) i translacijske (*PIN7::GUS*) linije uročnjaka s GUS biljgom sam nakon isključivanja na MS hranjivoj podlozi u trajanju od četiri dana stavio na tretman (½ MS hranjiva podloga s dodatkom PVP-AgNP ili AgNO₃ konačne koncentracije 25, 50 i 100 μM). Ključance sam nakon jedan, tri, pet, sedam, devet i jedanaest dana inkubirao u 1 mL GUS pufera za bojanje u trajanju od 30 minuta za *PIN1::GUS* transkripcijsku liniju i *PIN7::GUS* translacijsku liniju, odnosno 24 sata za *DR5::GUS* transkripcijsku liniju pri 37 °C. Prije stavljanja na inkubaciju na 37 °C, uzorke sam stavio u vakuum koji pomaže ulasku pufera u tkivo. Nakon inkubacije, uzorke sam kratko isprao u deH₂O te 10 minuta u 96%-tnom etanolu. U konačnici, uzorke sam stavio u kap vode na predmetno stakalce, pokrio pokrovnicom te analizirao svjetlosnim mikroskopom (Olympus BX51) i snimio digitalnom kamerom (Olympus DP70). Intenzitet fluorescencije sam analizirao pomoću programa Lucida 6.0 (Wirral, UK). Rezultate intenziteta sam u

konačnici izrazio kao postotak intenziteta fluorescencije u odnosu na srednju vrijednost kontrolnog uzorka.

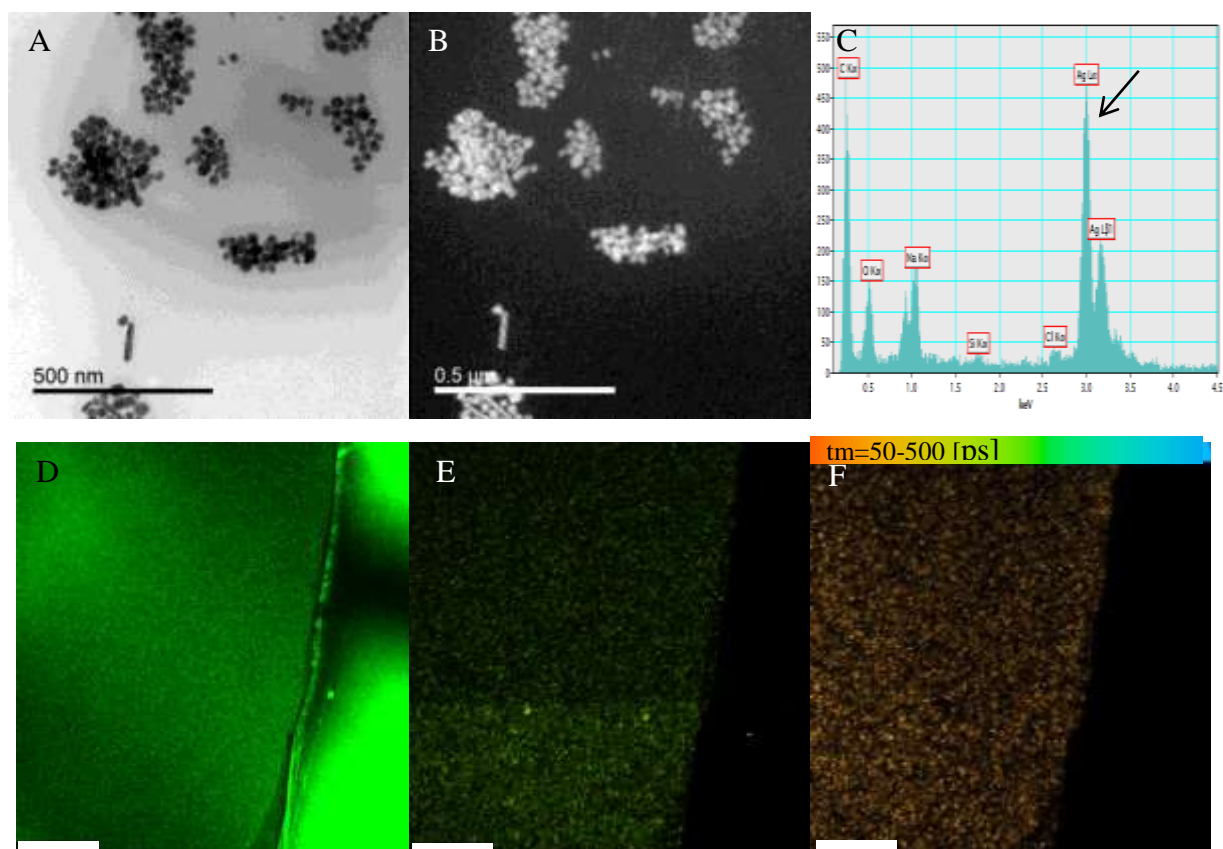
3.2.6. Analiza utjecaja PVP-AgNP i ionskog srebra (AgNO_3) na nakupljanje i transport auksina praćenjem promjene u ekspresiji reporter gena *DR5::GFP*, *PIN1::GFP*, *PIN7::GFP* u korijenu uročnjaka fluorescencijskom mikroskopijom

Transgenične reporter transkripcijske (*DR5::GFP*) i translacijske (*PIN1::GFP* i *PIN7::GFP*) linije uročnjaka s GFP biljegom sam nakon isključivanja na MS hranjivoj podlozi u trajanju od četiri dana stavio na tretman ($\frac{1}{2}$ MS hranjiva podloga s dodatkom PVP-AgNP ili AgNO_3 konačne koncentracije 25, 50 i 100 μM). Klijance sam potom stavio na predmetno staklo u kap vode te pokrio pokrovnicom. Uzorke sam analizirao na fluorescencijskom mikroskopu (Olympus BX51) koristeći UV lampu (Olympus U-RFL-T) te snimio digitalnom kamerom (Olympus DP70). Intenzitete fluorescencije sam analizirao programom Lucida 6.0 (Wirral, UK) te sam rezultate intenziteta u konačnici izrazio kao postotak intenziteta fluorescencije u odnosu na srednju vrijednost kontrolnog uzorka.

4. REZULTATI

4.1. Vizualizacija PVP-AgNP u matičnoj otopini

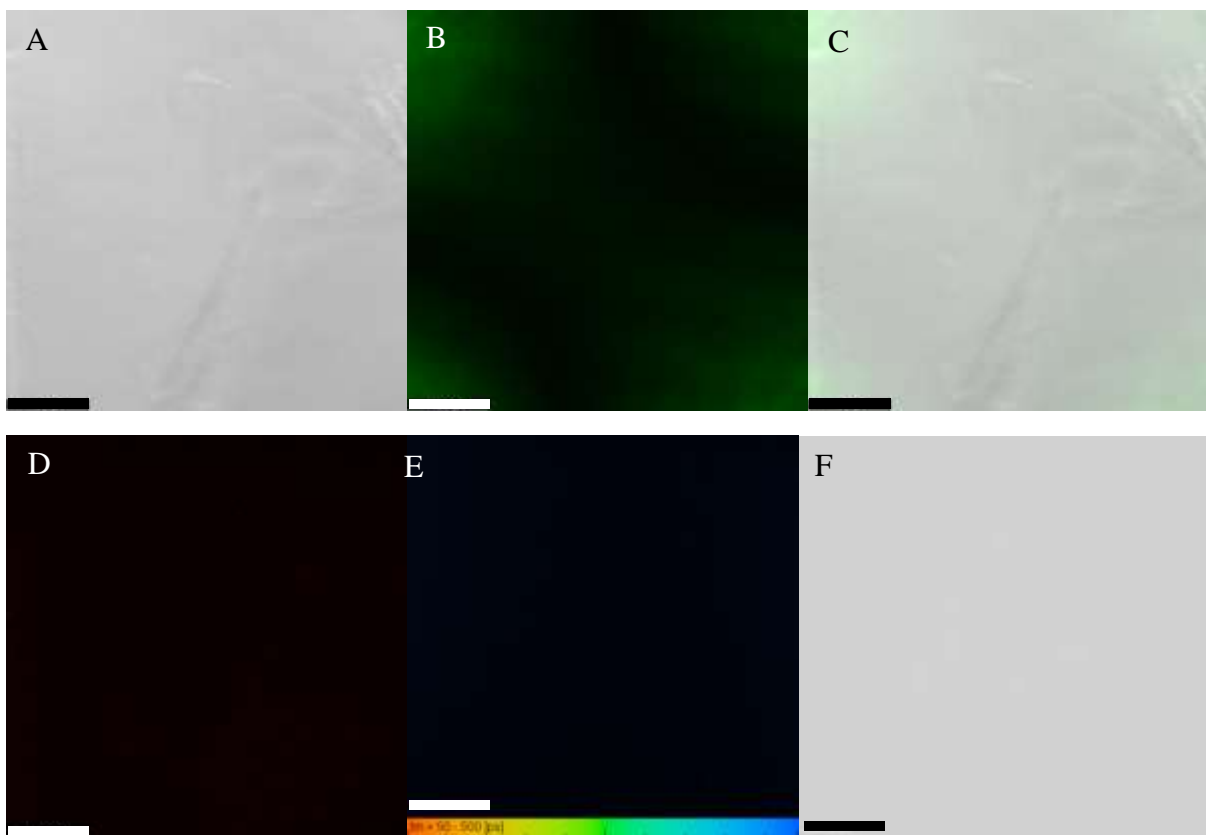
Na slici 2 prikazane su nanočestice srebra stabilizirane omotačem od polivinilpirolidona u matičnoj otopini. Na slikama je vidljivo kako promjer PVP-AgNP varira od 30 do 50 nm. Također je pomoću elementarne mape srebra pokazano da su vizualizirane upravo nanočestice srebra (slika 2B) što je dodatno potvrđeno spektrom energijski razlučujuće rendgenske spektroskopije gdje se može vidjeti „peak“ pri 3.0 keV koji je karakterističan za srebro (slika 2C). Multifotonskim skenirajućim konfokalnim mikroskopom prikazana je refleksija (slika 2D) i luminiscenca (slika 2E) PVP-AgNP te je prikazom vremena života fluorescencije PVP-AgNP primjenom fluorescentne slikovne mikroskopije (FLIM) pokazano da čestice imaju poluživot oko 50 ps (slika 2F).



Slika 2. Nanočestice srebra (PVP-AgNP) u miliQ vodi. Matična otopina PVP-AgNP vizualizirana pod transmisijskim elektronskim mikroskopom (A-C) te pod multifotonskim pretražnim konfokalnim mikroskopom (D-F). A) svijetlo vidno polje, B) mapa elementa srebra C) spektar energijski razlučujuće/disperzivne rendgenske spektroskopije (EDX). Strelica prikazuje “peak” karakterističan za srebro na 3 keV. Mjerilo prikazuje 0,5 μm . D) refleksija PVP-AgNP, E) luminiscenca PVP-AgNP, F) prikaz vremena života fluorescencije PVP-AgNP primjenom fluorescentne slikovne mikroskopije (FLIM). Mjerilo prikazuje 154,4 μm .

4.2. Vizualizacija PVP-AgNP i novonastalih nanočestica srebra iz ionskog srebra (AgNO_3) u $\frac{1}{2}$ MS hranjivoj podlozi

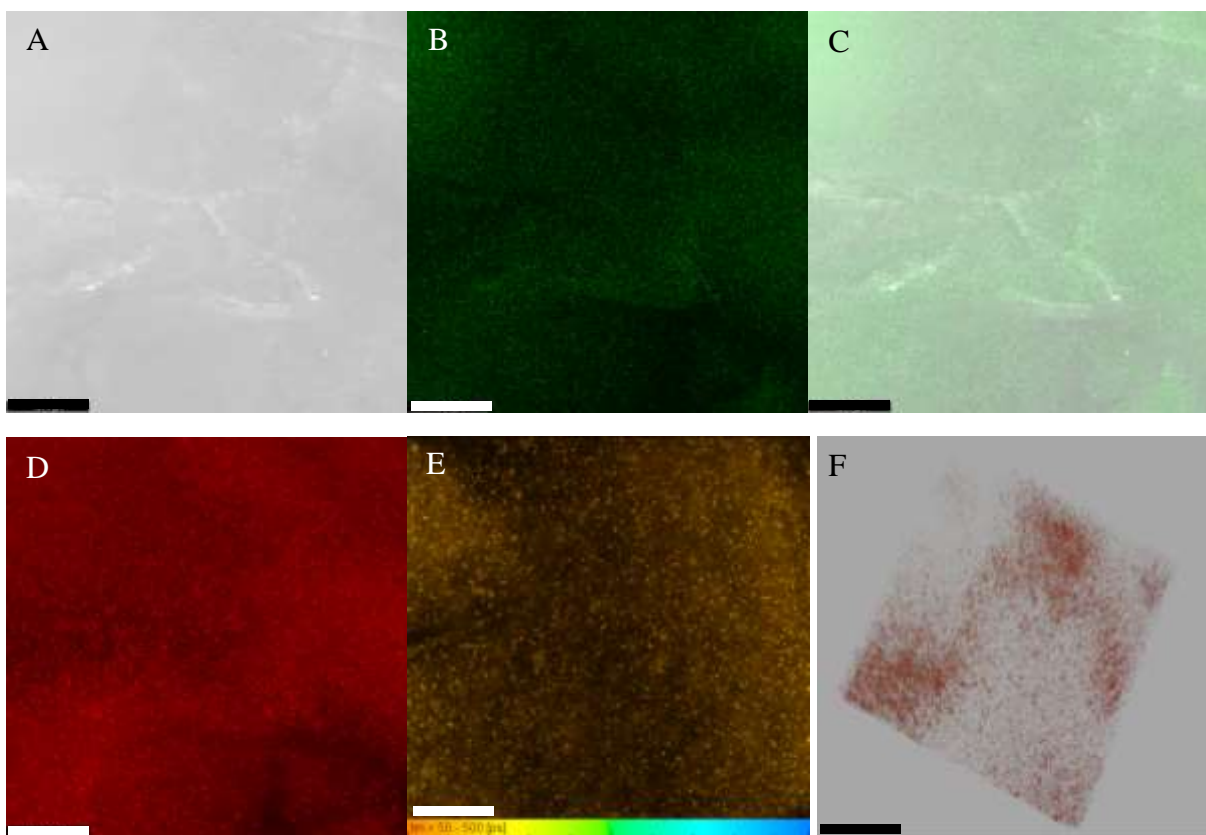
Na slici 3 prikazan je dio krute hranjive $\frac{1}{2}$ MS podloge bez dodatka PVP-AgNP i ionskog srebra (AgNO_3). Vizualiziran je pod svjetlim vidnim poljem (slika 3A). Također dio podloge je snimljen i pri reflektirajućim (slika 3B), multifotonskim (slika 3D) te FLIM (slika 3E) postavkama mikroskopa. Navedeni rezultati pokazuju da hranjiva kruta podloga ne reflektira (slika 3B i 3C) niti luminiscira svjetlost (slika 3D i 3E). Slika 3F prikazuje 3D prikaz promatranog dijela hranjive $\frac{1}{2}$ MS podloge te se ponovo može vidjeti kako promatrani dio kontrolne podloge ne sadrži luminiscirajuće čestice.



Slika 3. Prikaz dijela krute hranjive $\frac{1}{2}$ MS podloge bez dodanog PVP-AgNP i AgNO_3 vizualizirane pod multifotonskim pretražnim konfokalnim mikroskopom. A) svjetlo vidno polje krute hranjive $\frac{1}{2}$ MS podloge, B) refleksija C) prikaz preklapljenih slika A) i B), D) luminiscenca, E) prikaz vremena života fluorescencije primjenom fluorescentne slikovne mikroskopije (FLIM) F) 3D prikaz krute hranjive $\frac{1}{2}$ MS podloge. Mjerilo prikazuje 154,4 μm .

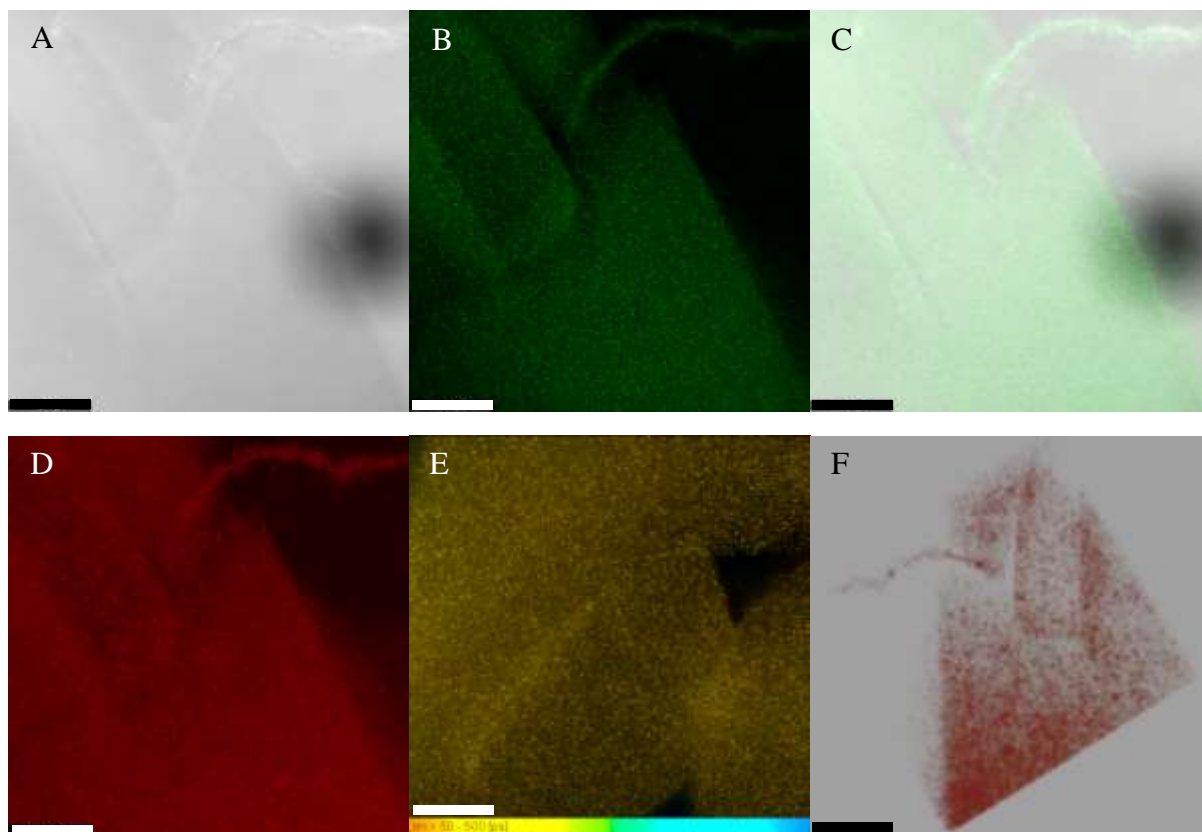
Na slici 4 prikazan je dio hranjive $\frac{1}{2}$ MS podloge s dodatkom PVP-AgNP konačne koncentracije $100 \mu\text{M}$. Promatrani dio vizualiziran je pod svjetlim vidnim poljem (slika 4A) te je analizirana njegova refleksija (slika 4B) i luminiscenca (slika 4D). Time se može vidjeti kako tako pripremljena hranjiva podloga sadrži mnogo reflektirajućih (slika 4C) i luminiscirajućih čestica. Mjerenjem vremena života fluorescencije pokazano je kako videne čestice imaju poluživot oko 50 ps (slika 4E).

Slika 4F prikazuje 3D prikaz promatranog dijela hranjive $\frac{1}{2}$ MS podloge s dodatkom PVP-AgNP konačne koncentracije $100 \mu\text{M}$ čime se može vidjeti kako su čestice prostorno lokalizirane u svima ravninama hranjive podloge.



Slika 4. Nanočestice srebra (PVP-AgNP) u krutoj hranjivoj $\frac{1}{2}$ MS podlozi konačne koncentracije $100 \mu\text{M}$ vizualizirane pod multifotonskim pretražnim konfokalnim mikroskopom. A) svjetlo vidno polje krute hranjive $\frac{1}{2}$ MS podloge, B) refleksija PVP-AgNP- (zelene točkice) C) refleksija PVP-AgNP u krutoj hranjivoj $\frac{1}{2}$ MS; prikaz preklapljenih slika A) i B), D) luminiscenca PVP-AgNP u krutoj podlozi (crvene točkice), E) prikaz vremena života fluorescencije PVP-AgNP primjenom fluorescentne slikovne mikroskopije (FLIM), F) 3D prikaz PVP-AgNP u krutoj hranjivoj $\frac{1}{2}$ MS podlozi; crveno predstavljaju PVP-AgNP. Mjerilo prikazuje $154,4 \mu\text{m}$.

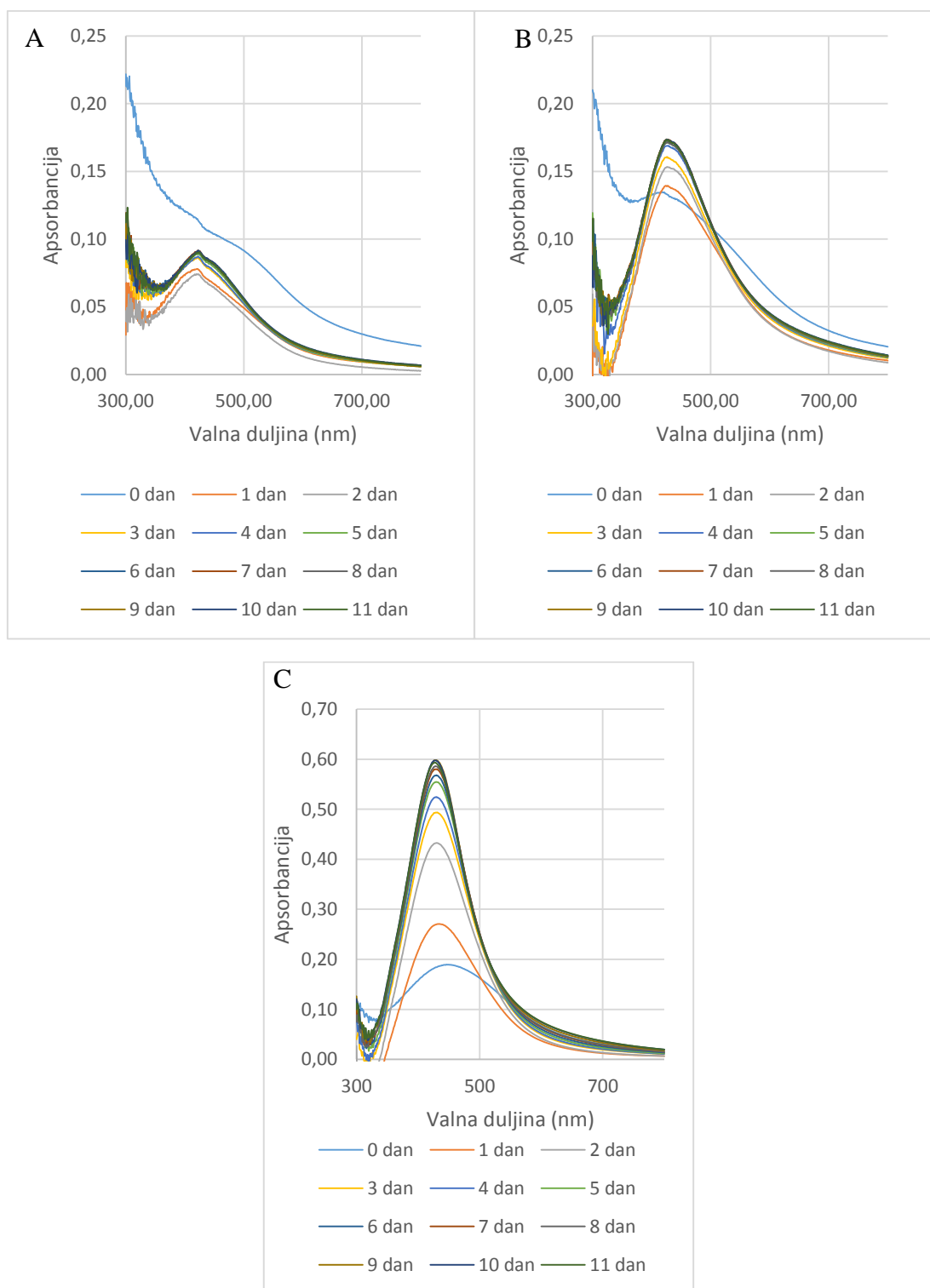
Na slici 5 prikazan je dio hranjive $\frac{1}{2}$ MS podloge s dodatkom ionskog srebra u obliku AgNO_3 konačne koncentracije $100 \mu\text{M}$. Promatrani dio vizualiziran je pod svijetlim vidnim poljem (slika 5A) te je analizirana njegova refleksija (slika 5B) i luminiscenca (slika 5D) čime je vidljivo da navedena podloga sadrži reflektirajuće (slika 5C) i luminiscirajuće čestice. Mjerenjem vremena života fluorescencije (slika 5E) i 3D prikazom (slika 5F) pokazano je da se čestice sa životom fluorescencije oko 50 ps nalaze duž svih ravnina u hranjivoj podlozi s dodatkom ionskog srebra (AgNO_3) konačne koncentracije $100 \mu\text{M}$.



Slika 5. Novonastale nanočestice srebra u krutoj hranjivoj $\frac{1}{2}$ MS podlozi nakon dodatka AgNO_3 konačne koncentracije $100 \mu\text{M}$ vizualizirane pod multifotonskim pretražnim konfokalnim mikroskopom. A) svijetlo vidno polje krute hranjive $\frac{1}{2}$ MS podloge, B) refleksija AgNP (zelene točkice) C) refleksija AgNP u krutoj hranjivoj $\frac{1}{2}$ MS; prikaz preklopljenih slika A) i B), D) luminiscenca AgNP u krutoj podlozi (crvene točkice), E) prikaz vremena života fluorescencije AgNP primjenom fluorescentne slikovne mikroskopije (FLIM), F) 3D prikaz AgNP u krutoj hranjivoj $\frac{1}{2}$ MS podlozi; crveno predstavljaju AgNP. Mjerilo prikazuje $154,4 \mu\text{m}$.

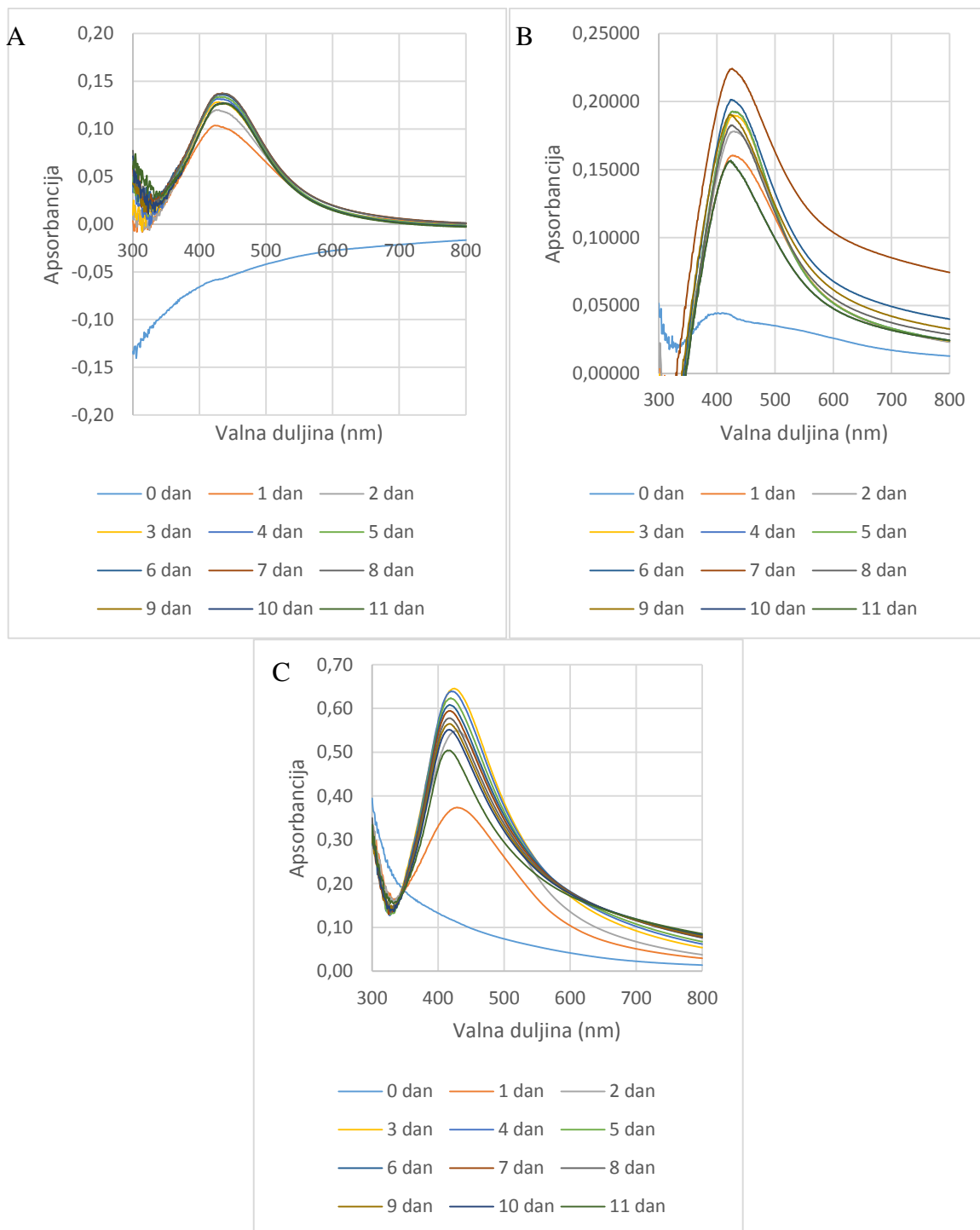
4.3. Analiza stabilnosti PVP-AgNP i ionskog srebra (AgNO_3) u $\frac{1}{2}$ MS hranjivoj podlozi

Na grafičkom prikazu (slika 6) prikazana je stabilnost PVP-AgNP u $\frac{1}{2}$ MS hranjivoj podlozi. Na slici 6A vidljivo je da, izuzev nultog dana, apsorbancija PVP-AgNP u $\frac{1}{2}$ MS hranjivoj podlozi konačne koncentracije 25 μM pri 420 nm raste do šestog dana te ostaje jednaka do jedanaestog dana. Slika 6B prikazuje kretanje apsorbancije PVP-AgNP u $\frac{1}{2}$ MS hranjivoj podlozi konačne koncentracije 50 μM . Vidljivo je da apsorbancija PVP-AgNP raste do petog dana te ostaje jednaka do jedanaestog dana. Na slici 6C prikazano je kretanje apsorbancije PVP-AgNP u $\frac{1}{2}$ MS hranjivoj podlozi konačne koncentracije 100 μM te se može vidjeti da apsorbancija PVP-AgNP raste do sedmog dana te ostaje ista do jedanaestog dana. Usporedbom stabilnosti PVP-AgNP svih promatranih koncentracija može se vidjeti kako najveću vrijednost apsorbancije na 420 nm ima $\frac{1}{2}$ MS hranjiva podloga s dodatkom 100 μM PVP-AgNP, a najmanju podloga s 25 μM PVP-AgNP.



Slika 6. Grafički prikaz apsorbancije PVP-AgNP u $\frac{1}{2}$ MS hranjivoj podlozi od nultog do jedanaestog dana. A) apsorbancija 25 μM PVP-AgNP u $\frac{1}{2}$ MS hranjivoj podlozi, B) apsorbancija 50 μM PVP-AgNP u $\frac{1}{2}$ MS hranjivoj podlozi, C) apsorbancija 100 μM PVP-AgNP u $\frac{1}{2}$ MS hranjivoj podlozi.

Na slici 7A prikazano je kretanje apsorbancije novonastalih AgNP u 1/2 MS hranjivoj podlozi s dodatkom AgNO₃ kao ionskog srebra konačne koncentracije 25 μM te je vidljivo da se apsorbancija AgNP pri 420 nm povećala već nakon prvog dana te blago raste do trećeg dana gdje ostaje stabilna do osmog dana te se potom blago smanjuje do jedanaestog dana. Slika 7B prikazuje kretanje apsorbancije novonastalih AgNP u 1/2 MS hranjivoj podlozi s dodatkom ionskog srebra (AgNO₃) konačne koncentracije 50 μM. Vidljivo je da apsorbancija AgNP raste već u prvom danu te se potom blago povećava do sedmog dana gdje potom blago opada do jedanaestog dana. Na slici 7C prikazano je kretanje apsorbancije novonastalih AgNP u 1/2 MS hranjivoj podlozi s dodatkom ionskog srebra (AgNO₃) konačne koncentracije 100 μM. Vidljivo je da se apsorbancija AgNP pri 420 nm povećavala do trećeg dana gdje je postigla svoj maksimum te se potom blago smanjivala do desetog dana s naglim padom intenziteta apsorbancije u jedanaestom danu. Usporedbom apsorbancije AgNP kod svih tretmana s AgNO₃ može se vidjeti kako se najveća apsorbancija novonastalih AgNP u hranjivoj podlozi javlja na tretmanu sa 100 μM AgNO₃, dok najmanja na tretmanu s 25 μM AgNO₃.

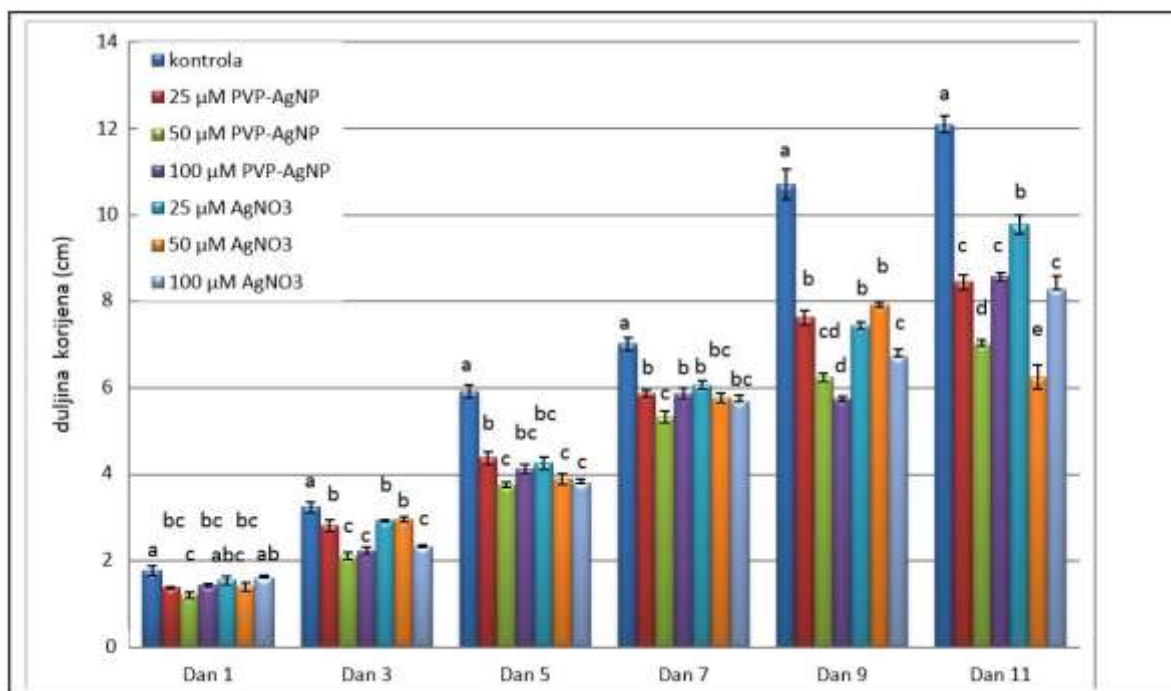


Slika 7. Grafički prikaz apsorbancije novonastalih nanočestica srebra (AgNP) iz ionskog srebra (AgNO_3) u $\frac{1}{2}$ MS hranjivoj podlozi od nultog do jedanaestog dana. A) apsorbancija Ag NP u $25 \mu\text{M}$ AgNO_3 u $\frac{1}{2}$ MS hranjivoj podlozi, B) apsorbancija AgNP u $50 \mu\text{M}$ AgNO_3 u $\frac{1}{2}$ MS hranjivoj podlozi C) apsorbancija AgNP u $100 \mu\text{M}$ AgNO_3 u $\frac{1}{2}$ MS hranjivoj podlozi.

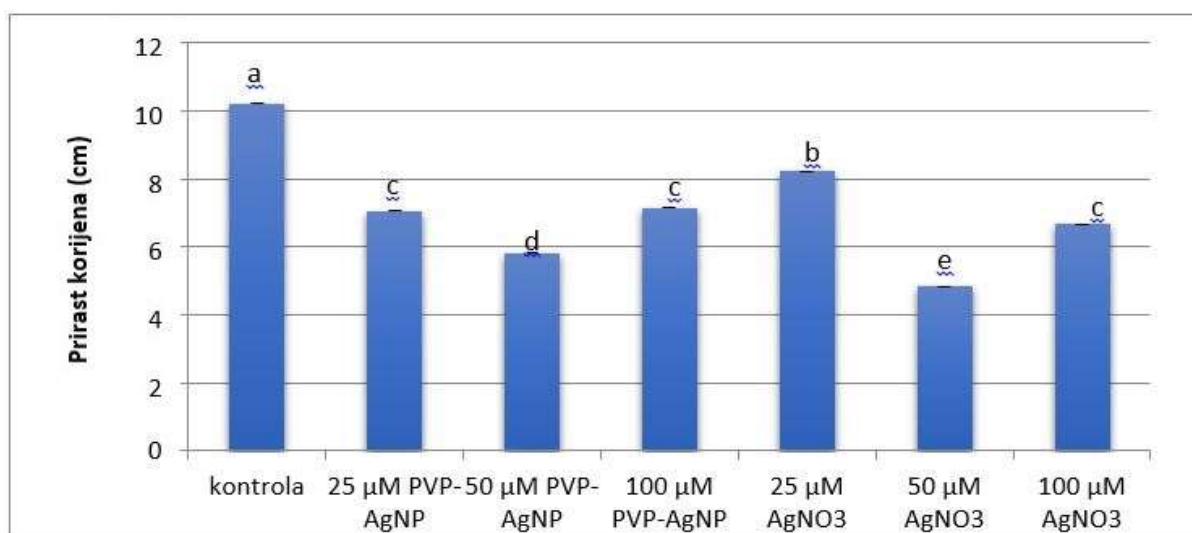
4.4. Analiza duljine korijena klijanaca uročnjaka

Slika 8 prikazuje grafički prikaz duljine korijena klijanaca uročnjaka divljeg tipa nakon prvog, trećeg, petog, sedmog, devetog i jedanaestog dana tretmana na krutim hranjivim $\frac{1}{2}$ MS podlogama bez dodataka te s dodatkom PVP-AgNP ili ionskog srebra (AgNO_3) konačnih koncentracija 25, 50 i 100 μM . Analizom duljine korijena klijanaca tretiranih s PVP-AgNP može se vidjeti kako je duljina korijena klijanaca tretiranih s 25 i 100 μM PVP-AgNP jednaka u svim promatranim danima, izuzev trećeg dana gdje je korijen klijanca na tretmanu sa 100 μM PVP-AgNP kraći od onog na tretmanu s 25 μM PVP-AgNP, ali jednak duljini korijena klijanaca tretiranih s 50 μM PVP-AgNP. Klijaneci tretirani s 50 μM PVP-AgNP imaju statistički značajno najmanju duljinu korijena u usporedbi s kontrolom te tretmanima s 25 i 100 μM PVP-AgNP za sve promatrane dane, izuzev trećeg dana gdje klijaneci tretirani s 50 i 100 μM PVP-AgNP imaju jednaku, ali statistički značajno manju duljinu od kontrole i klijanaca na tretmanu s 25 μM PVP-AgNP. Unutar tretmana s AgNO_3 vidljivo je da je duljina korijena klijanaca uglavnom jednaka na svim tretmanima do jedanaestog dana tretmana, izuzev trećeg i devetog dana gdje klijaneci tretirani sa 100 μM AgNO_3 imaju statistički značajno manju duljinu u odnosu na ostale tretmane s AgNO_3 . Nakon jedanaestog dana statistički značajno najmanju duljinu korijena imaju klijaneci tretirani s 50 μM AgNO_3 u usporedbi s kontrolom te ostalim tretmanima s AgNO_3 . Također je uočljivo kako korijen kontrolnog, ne tretiranog klijanca uvijek ima statistički značajno najveću duljinu korijena u odnosu na sve tretmane. Usporedbom svih tretmana međusobno, ali i s kontrolom vidljivo je da klijaneci izloženi koncentracijama od 50 μM PVP-AgNP i 50 μM AgNO_3 nakon jedanaestog dana imaju najmanju duljinu korijena.

Na grafičkom prikazu uočava se da je rast korijena sporiji kod tretmana s PVP-AgNP i s AgNO_3 (slika 9). Na tretmanu s PVP-AgNP, uočen je najsporiji rast korijena pri 50 μM PVP-AgNP. Pri koncentraciji od 25 i 100 μM PVP-AgNP prirast korijena je statistički manji od kontrole, no nema statističke razlike između ta dva tretman. Na tretmanu s AgNO_3 , uočen je najsporiji rast korijena pri 50 μM . Pri koncentraciji od 25 i 100 μM AgNO_3 prirast korijena je statistički manji od kontrole pri čemu je rast korijena sporiji na tretmanu sa 100 μM AgNO_3 u odnosu na 25 μM AgNO_3 .



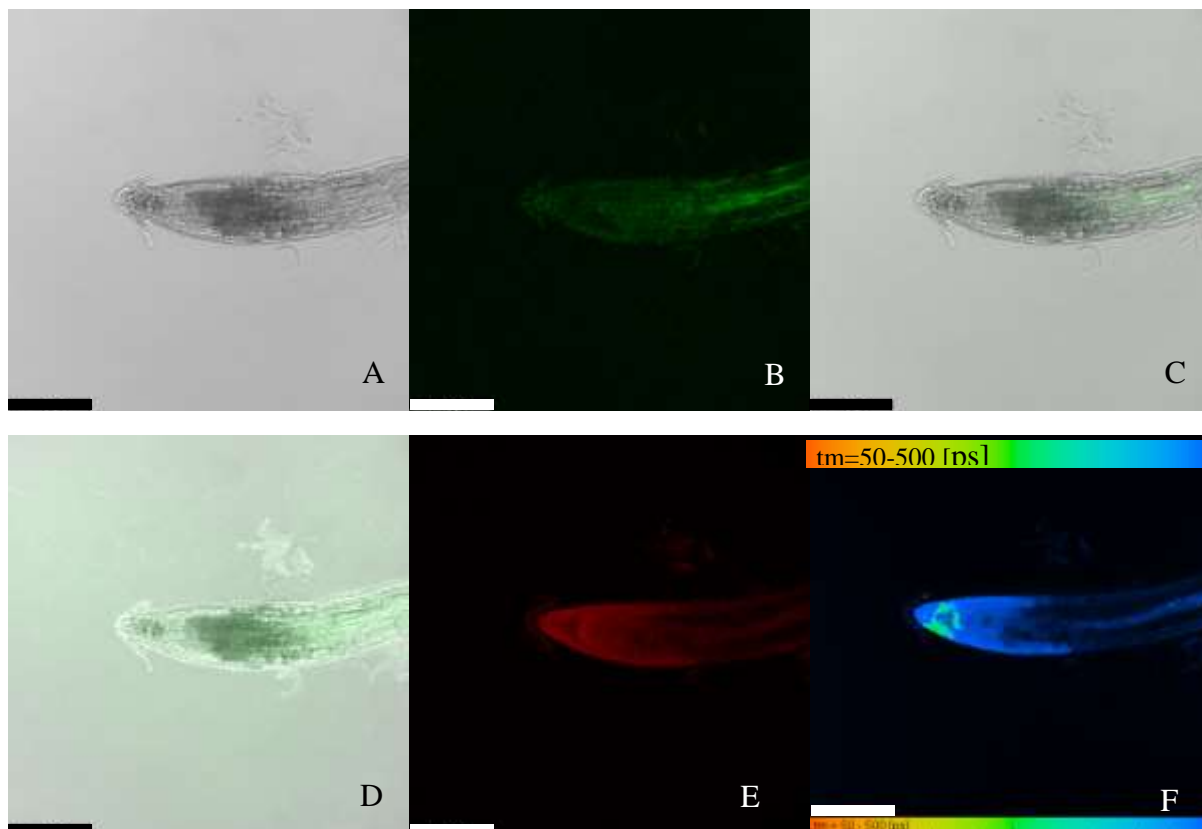
Slika 8. Grafički prikaz duljine korijena klijanaca uročnjaka divljeg tipa nakon prvog, trećeg, petog, sedmog, devetog i jedanaestog dana rasta na krutim ½ MS hranjivim podlogama bez dodataka (kontrola); s dodatkom PVP-AgNP u konačnim koncentracijama od 25, 50 i 100 µM (AgNP) te s dodatkom AgNO₃ kao ionskog srebra konačnih koncentracija 25, 50 i 100 µM. Duljina korijena je izražena u centimetrima.



Slika 9. Grafički prikaz prirasta korijena klijanaca uročnjaka divljeg tipa nakon prvog, trećeg, petog, sedmog, devetog i jedanaestog dana rasta na krutim ½ MS hranjivim podlogama bez dodataka (kontrola) te s dodatkom PVP-AgNP u konačnim koncentracijama od 25, 50 i 100 µM ili AgNO₃ kao ionskog srebra konačnih koncentracija 25, 50 i 100 µM. Prirast korijena izražen je u centimetrima.

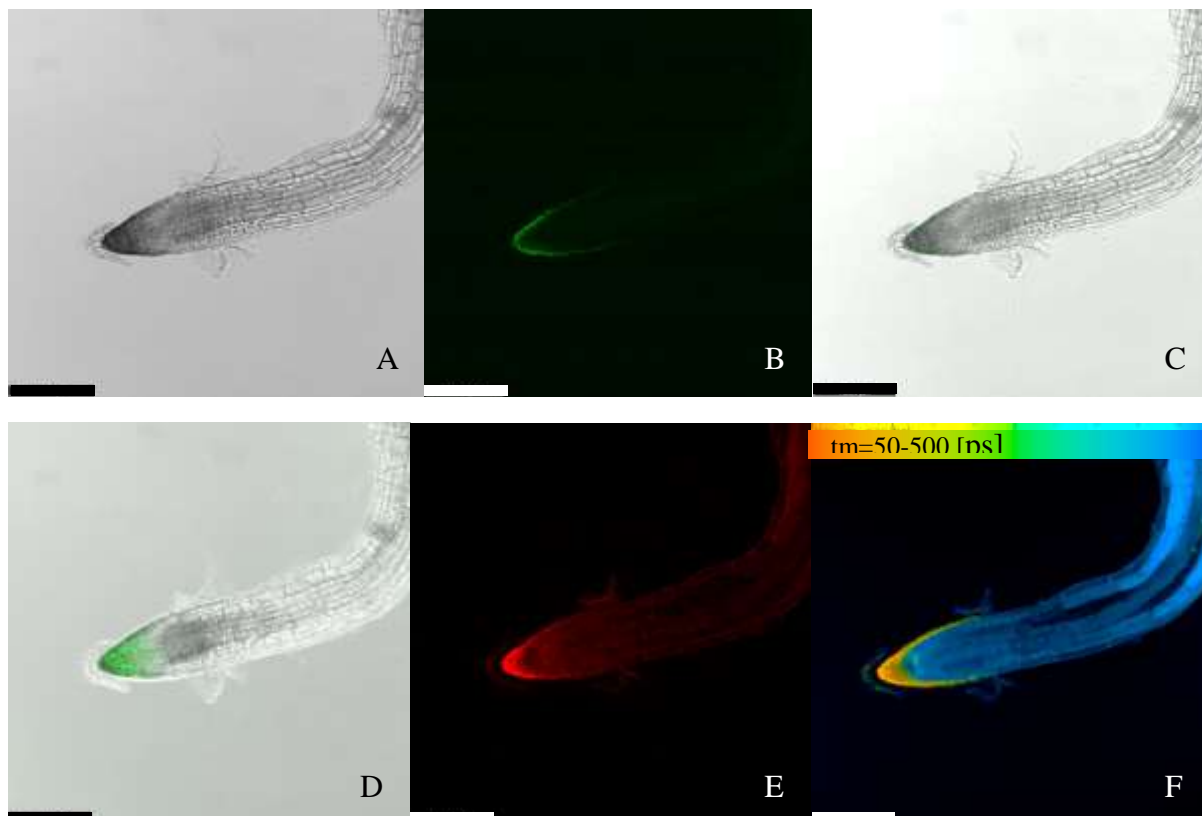
4.5. Vizualizacija i lokalizacija PVP-AgNP i novonastalih nanočestica srebra iz ionskog srebra (AgNO_3) u vršku korijena uročnjaka

Multifotonskim konfokalnim mikroskopom vizualiziran je vršak korijena uročnjaka. Slika 10 prikazuje kontrolni korijen klijanca divljeg tipa koji je rastao na $\frac{1}{2}$ MS hranjivoj podlozi bez dodataka PVP-AgNP ili ionskog srebra (AgNO_3). Korijen je prvo snimljen pri svjetlom vidnom polju (slika 10A) te mu je potom snimljena refleksija gdje se može vidjeti da kontrolni korijen sadrži određene tvari koje reflektiraju (slika 10B). Slika 10C je preklopljeni prikaz slika 10A i 10B kako bi se prikazala lokalizacija reflektirajućih tvari te se može vidjeti da se one nalaze u samom korijenu. Određivanjem luminiscencije korijena vidljive su sve tvari koje luminisciraju u vršku korijena uročnjaka (slika 10E). Time se može vidjeti da korijen sadrži uz reflektirajuće čestice dodatno i tvari koje luminisciraju. Kako bi se razaznale čestice niskog i visokog vremena života fluorescencije, određeno je vrijeme života fluorescencije svih tvari u vršku korijena te je pokazano da kontrolni korijen ne sadrži čestice s vremenom života fluorescencije ispod 100 ps (slika 10F).

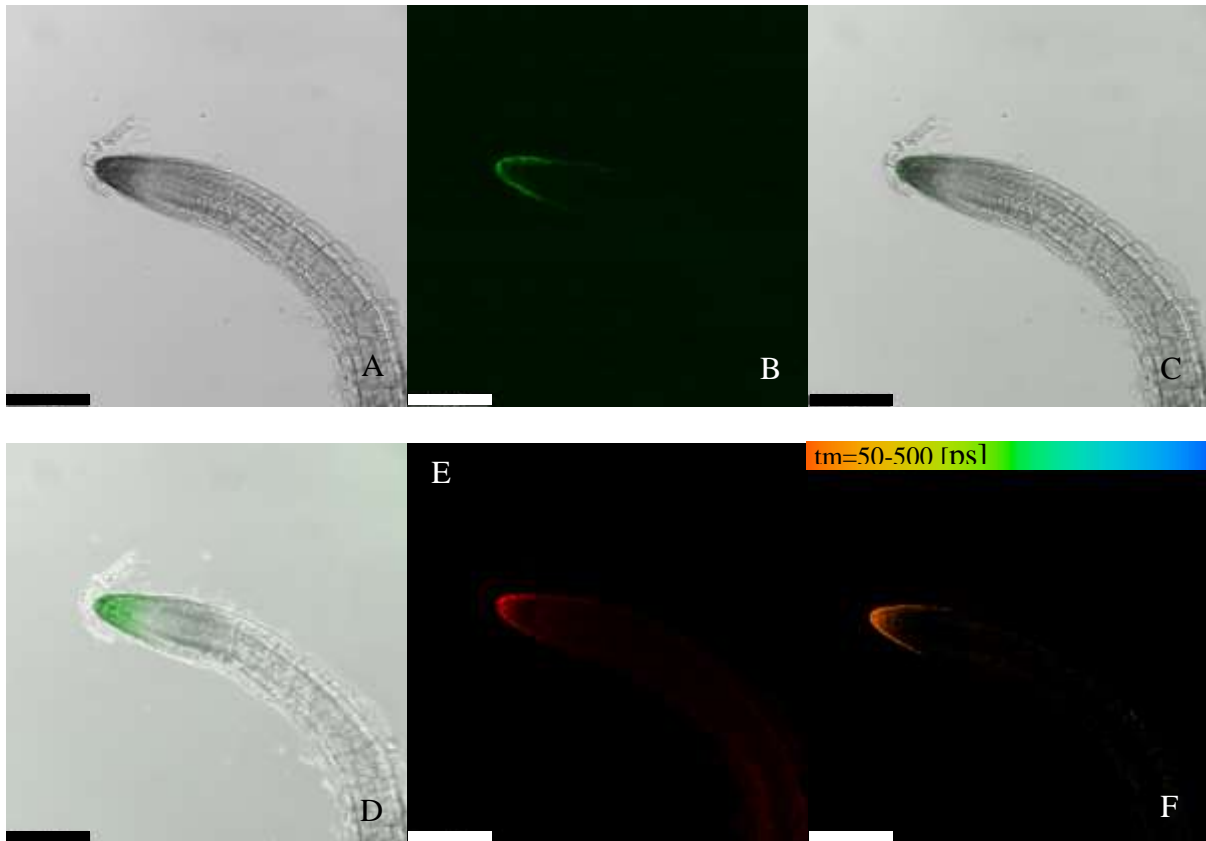


Slika 10. Kontrolni korijen uročnjaka divljeg tipa vizualiziran pod multifotonskim pretražnim konfokalnim mikroskopom. A) svijetlo vidno polje, B) tvari koje reflektiraju u korijenu (zelena boja) C) tvari koje reflektiraju u korijenu; prikaz preklopljenih slika A) i B), D) maksimalna projekcija svih snimljenih z-ravnina, E) tvari koje luminisciraju u korijenu (crvene boja), F) prikaz vremena života fluorescencije tvari u kontrolnom korijenu. Mjerilo prikazuje 154,4 μm .

Analizom korijena uročnjaka divljeg tipa tretiranog sa 100 μM PVP-AgNP ili 100 μM AgNO₃ u trajanju od jedan, tri, pet, sedam, devet i jedanaest dana pomoću multifotonskog konfokalnog mikroskopa može se vidjeti kako se nakon jednog dana tretmana sa 100 μM PVP-AgNP ili 100 μM AgNO₃ reflektirajuće (slika 11B, 11C, 12B i 12C) i luminiscentne čestice (slika 11E i 12E) s kraćim životom fluorescencije (slika 11F i 12F) nalaze u vršnim stanicama korijena (slika 11D i 12D).

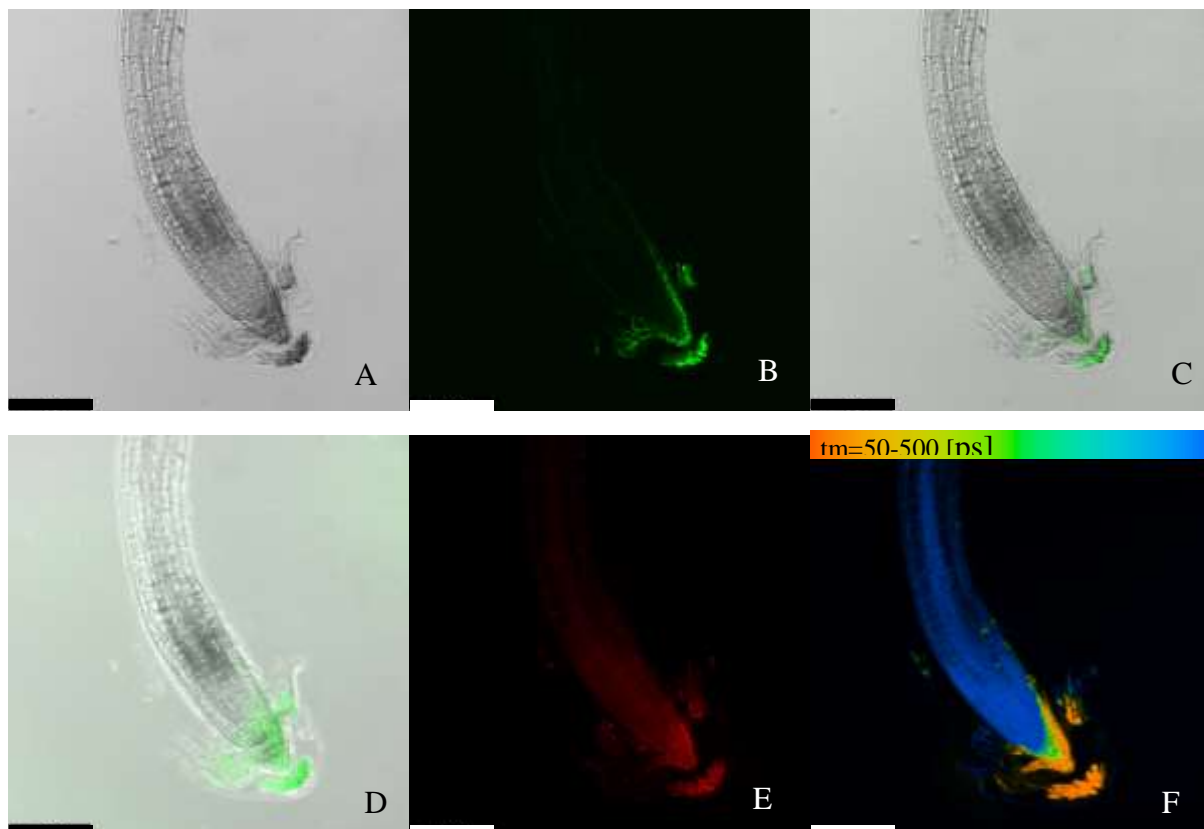


Slika 11. Lokalizacija PVP-AgNP u vršku korijena uročnjaka divljeg tipa nakon jednog dana tretmana sa $100 \mu\text{M}$ PVP-AgNP pomoću multifotonskog pretražnog konfokalnog mikroskopa. A) svijetlo vidno polje, B) refleksija PVP-AgNP (zelena boja), C) refleksija PVP-AgNP u vršku korijena; prikaz preklapljenih slika A) i B), D) maksimalna projekcija svih snimljenih z-ravnina E) luminiscenca PVP-AgNP- (crvena boja), F) prikaz vremena života fluorescencije PVP-AgNP u vršku korijena. Mjerilo prikazuje $154,4 \mu\text{m}$.

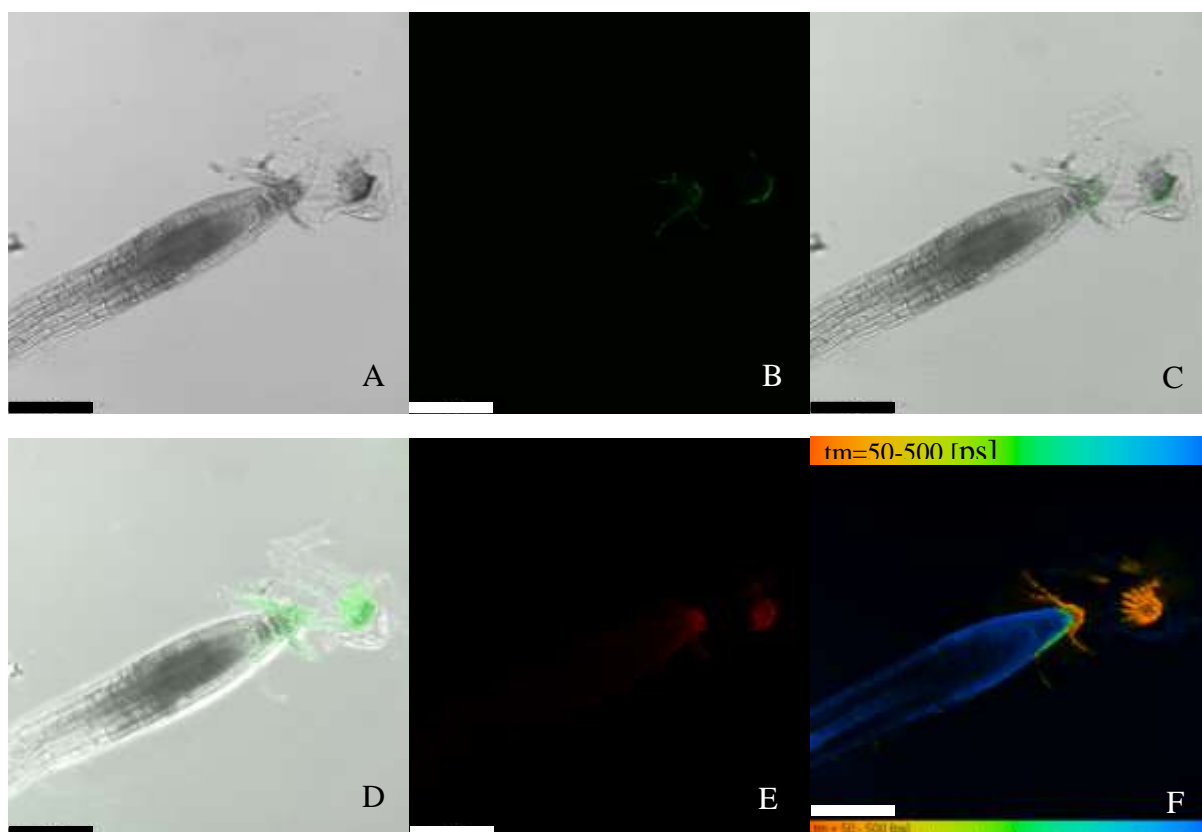


Slika 12. Lokalizacija novonastalih AgNP u vršku korijena uročnjaka divljeg tipa nakon jednog dana tretmana sa 100 μM AgNO_3 pomoću multifotonskog pretražnog konfokalnog mikroskopa. A) svijetlo vidno polje, B) refleksija AgNP (zelena boja), C) refleksija AgNP u vršku korijena; prikaz preklapljenih slika A) i B), D) maksimalna projekcija svih snimljenih z-ravnina E) luminiscenca AgNP (crvena boja), F) prikaz vremena života fluorescencije AgNP u vršku korijena. Mjerilo prikazuje 154,4 μm .

Nakon trećeg dana tretmana sa 100 μM AgNP-PVP ili 100 μM AgNO_3 može se vidjeti da se čestice koje reflektiraju (slika 13B, 13C, 14B i 14C) i luminisciraju (slika 13E i 14E), a imaju život fluorescencije oko 50 ps (slika 13F i 14F), nalaze u vršnim stanicama korijena, ali i u stanicama korijenove kape (slika 13D i 14D). Također, može se vidjeti kako takvih čestica, s ranije navedenim svojstvima, ima više u korijenu klijanaca nakon tretmana sa 100 μM PVP-AgNP nego nakon tretmana sa 100 μM AgNO_3 .

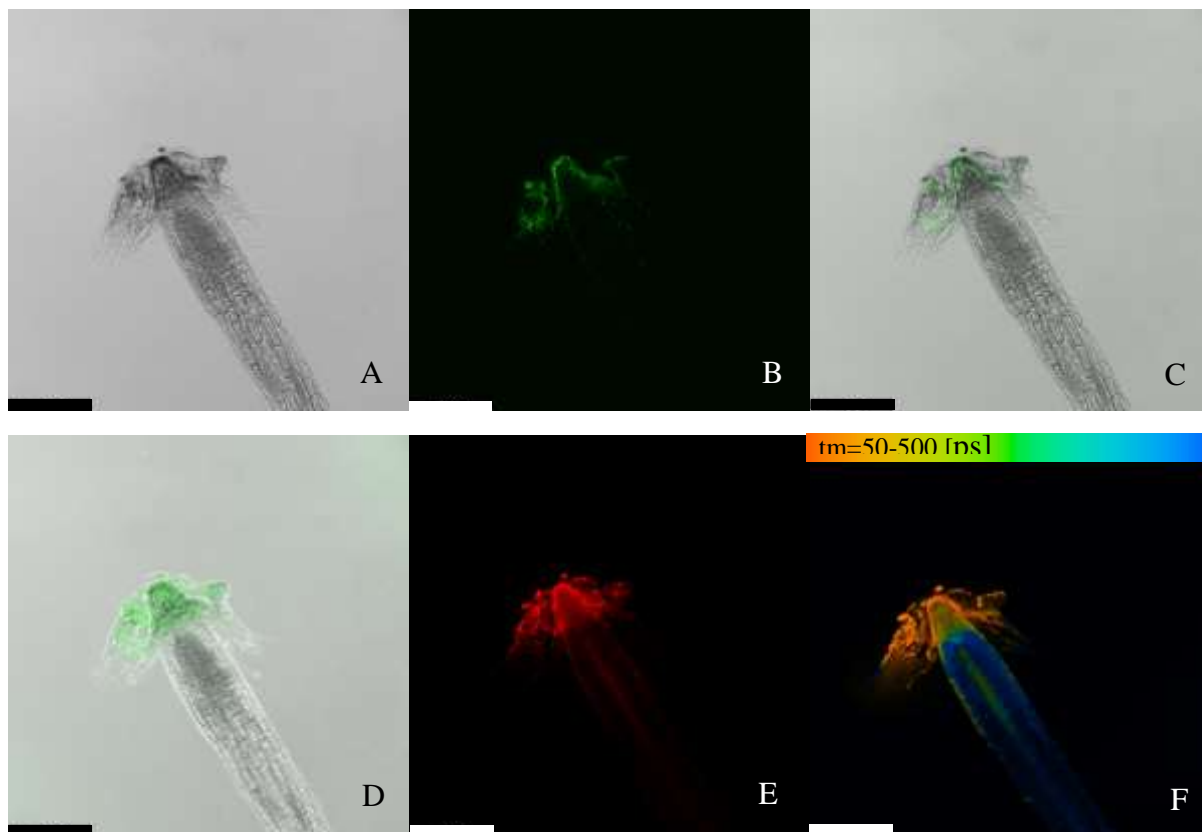


Slika 13. Lokalizacija PVP-AgNP u vršku korijena uročnjaka divljeg tipa nakon trećeg dana tretmana sa 100 μM PVP-AgNP pomoću multifotonskog pretražnog konfokalnog mikroskopa. A) svijetlo vidno polje, B) refleksija PVP-AgNP (zelena boja), C) refleksija PVP-AgNP u vršku korijena; prikaz preklopljenih slika A) i B), D) maksimalna projekcija svih snimljenih z-ravnina E) luminiscenca PVP-AgNP (crvena boja), F) prikaz vremena života fluorescencije PVP-AgNP u vršku korijena. Mjerilo prikazuje 154,4 μm .

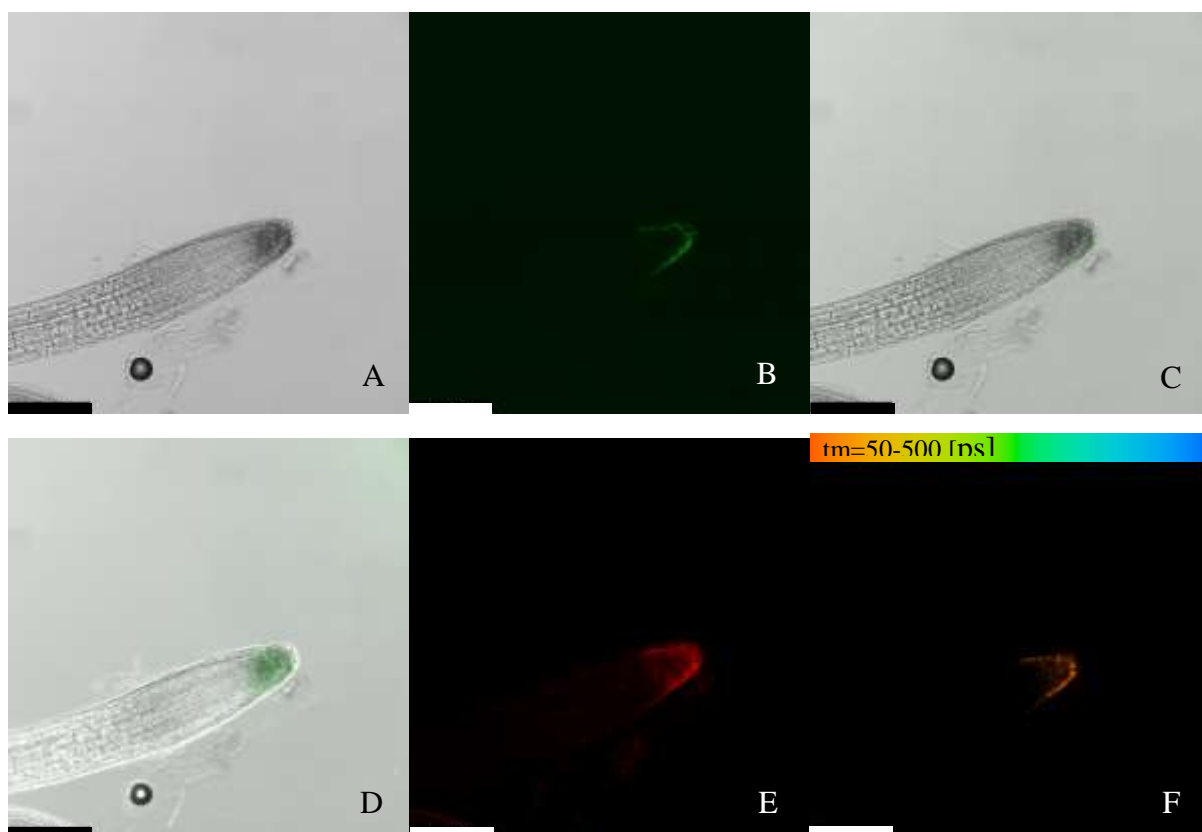


Slika 14. Lokalizacija novonastalih AgNP u vršku korijena uročnjaka divljeg tipa nakon trećeg dana tretmana sa $100 \mu\text{M}$ AgNO_3 pomoću multifotonskog pretražnog konfokalnog mikroskopa. A) svijetlo vidno polje, B) refleksija AgNP (zeleno boja), C) refleksija AgNP u vršku korijena; prikaz preklapljenih slika A) i B), D) maksimalna projekcija svih snimljenih z-ravnina E) luminiscenca AgNP (crvena boja), F) prikaz vremena života fluorescencije AgNP u vršku korijena. Mjerilo prikazuje $154,4 \mu\text{m}$.

Nakon petog dana tretmana sa $100 \mu\text{M}$ AgNP-PVP ili $100 \mu\text{M}$ AgNO_3 može se vidjeti da se reflektirajuće čestice (slika 15B, 15C, 16B i 16C) koje i luminisciraju (slika 15E i 16E), a imaju život fluorescencije oko 50 ps (slika 15F i 16F), nalaze u vršnim stanicama korijena, ali i u stanicama korijenove kape nakon tretmana sa $100 \mu\text{M}$ PVP-AgNP (slika 15D i 16D). Također, može se uočiti kako takvih reflektirajućih i luminiscirajućih čestica ima više u klijancima nakon tretmana sa $100 \mu\text{M}$ PVP-AgNP.

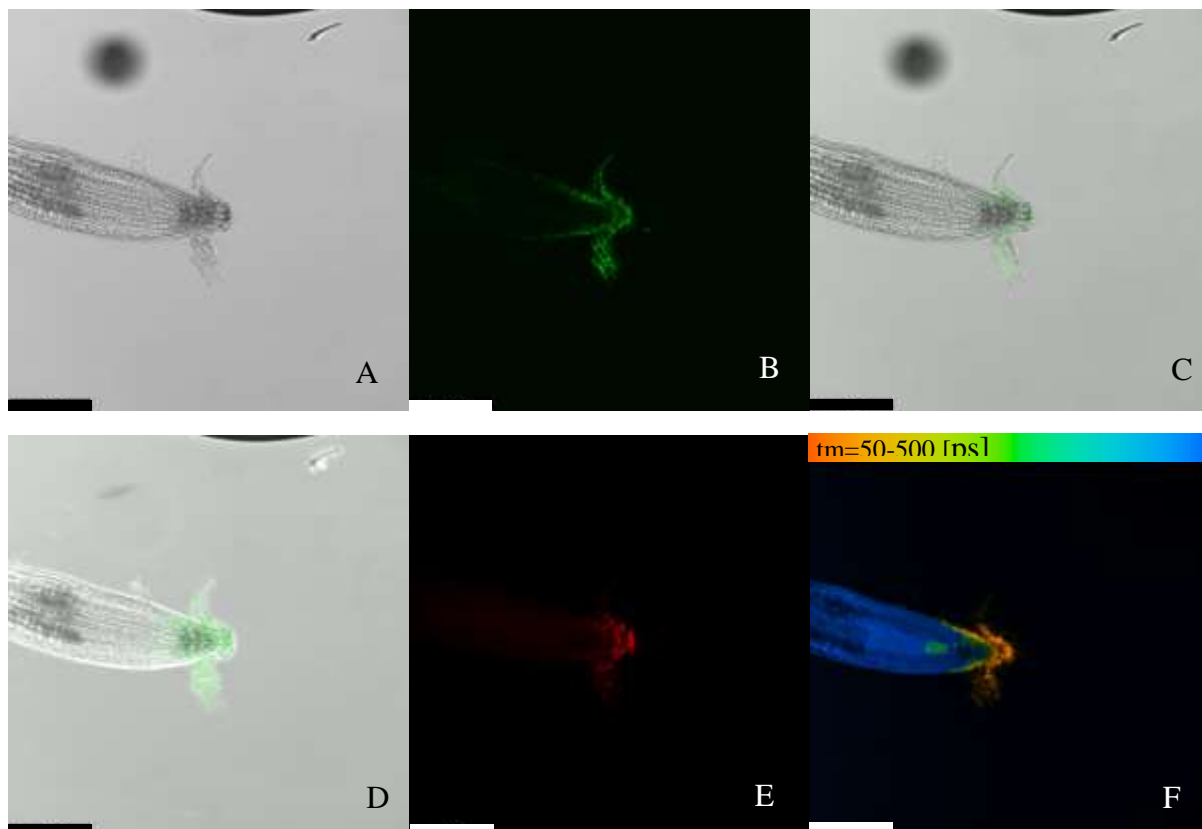


Slika 15. Lokalizacija PVP-AgNP u vršku korijena uročnjaka divljeg tipa nakon petog dana tretmana sa 100 μM PVP-AgNP pomoću multifotonskog pretražnog konfokalnog mikroskopa. A) svijetlo vidno polje, B) refleksija PVP-AgNP (zelena boja), C) refleksija PVP-AgNP u vršku korijena; prikaz preklopljenih slika A) i B), D) maksimalna projekcija svih snimljenih z-ravnina E) luminiscenca PVP-AgNP (crvena boja), F) prikaz vremena života fluorescencije PVP-AgNP u vršku korijena. Mjerilo prikazuje 154,4 μm .

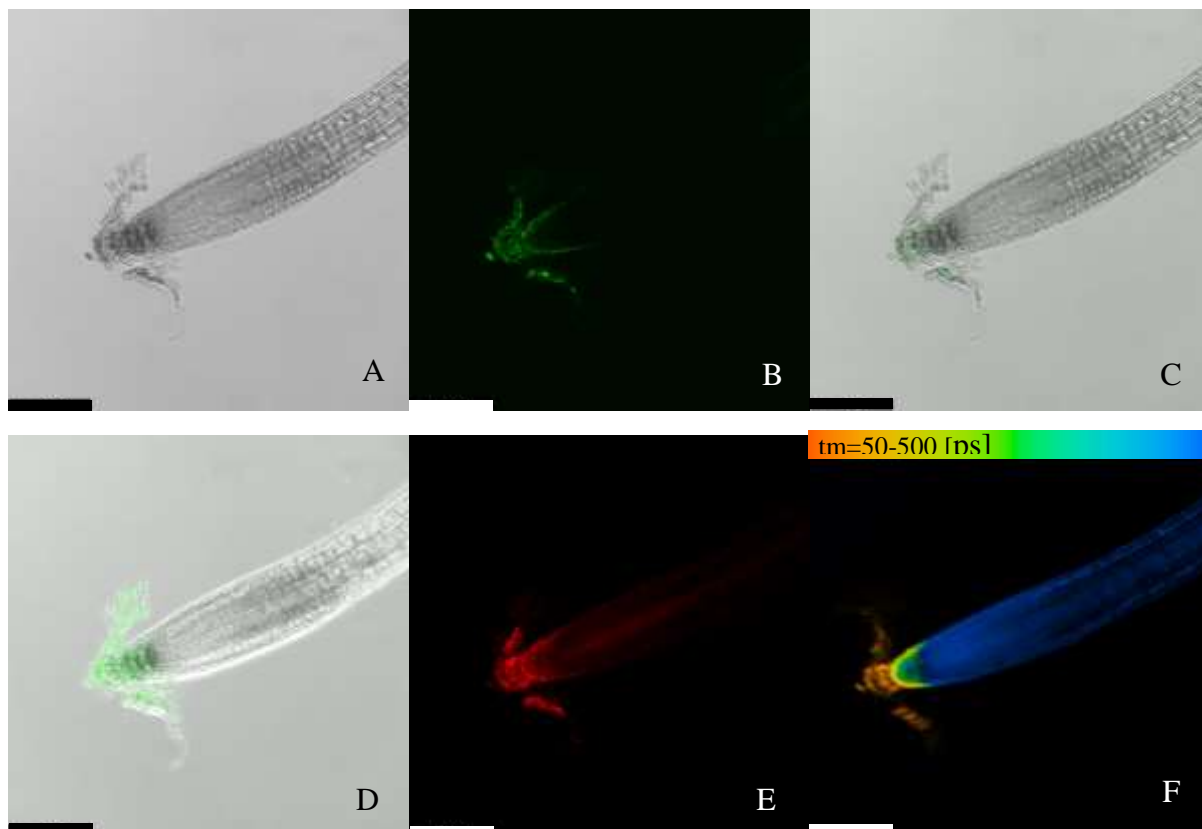


Slika 16. Lokalizacija novonastalih AgNP u vršku korijena uročnjaka divljeg tipa nakon petog dana tretmana sa 100 μM AgNO_3 pomoću multifotonskog pretražnog konfokalnog mikroskopa. A) svijetlo vidno polje, B) refleksija AgNP (zelena boja), C) refleksija AgNP u vršku korijena; prikaz preklopljenih slika A) i B), D) maksimalna projekcija svih snimljenih z-ravnina E) luminiscenca AgNP (crvena boja), F) prikaz vremena života fluorescencije AgNP u vršku korijena. Mjerilo prikazuje 154,4 μm .

Nakon sedmog dana tretmana sa 100 μM AgNP-PVP ili 100 μM AgNO_3 može se vidjeti da reflektirajućih čestica (slika 17B, 17C, 18B i 18C) koje i luminisciraju (slika 17E i 18E), a imaju život fluorescencije oko 50 ps (slika 17F i 18F), ima u podjednakoj količini u vršnim stanicama korijena, ali i u stanicama korijenove kape kod oba tretmana (slika 17D i 18D).

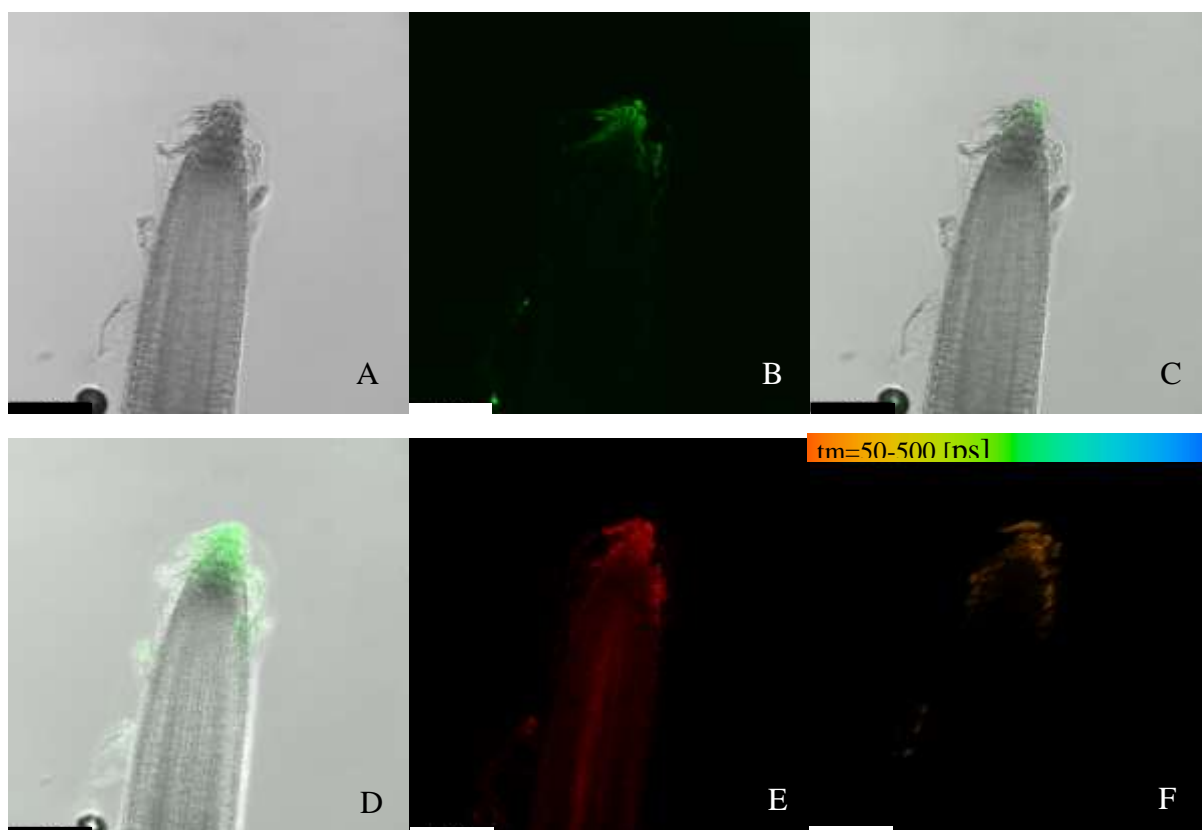


Slika 17. Lokalizacija PVP-AgNP u vršku korijena uročnjaka divljeg tipa nakon sedmog dana tretmana sa $100 \mu\text{M}$ PVP-AgNP pomoću multifotonskog pretražnog konfokalnog mikroskopa. A) svijetlo vidno polje, B) refleksija PVP-AgNP (zelena boja), C) refleksija PVP-AgNP u vršku korijena; prikaz preklopljenih slika A) i B), D) maksimalna projekcija svih snimljenih z-ravnina E) luminiscenca PVP-AgNP (crvena boja), F) prikaz vremena života fluorescencije PVP-AgNP u vršku korijena. Mjerilo prikazuje $154,4 \mu\text{m}$.

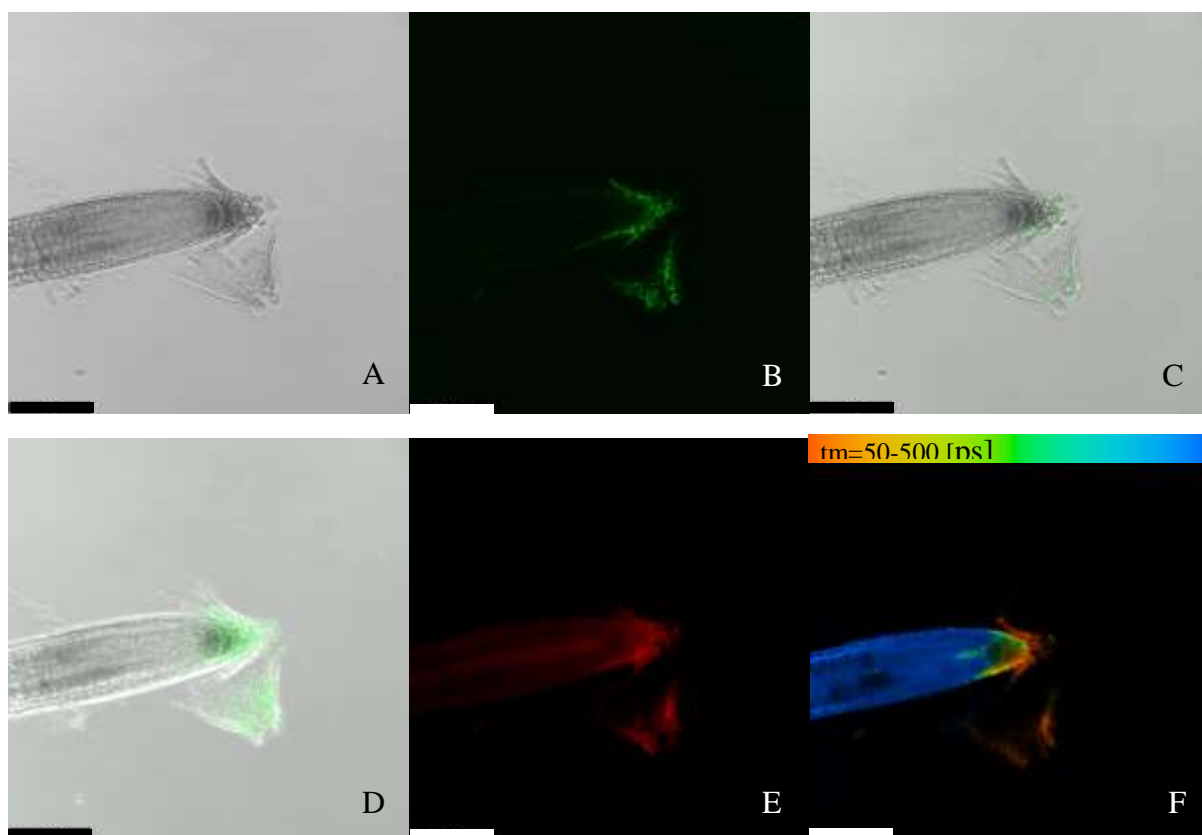


Slika 18. Lokalizacija novonastalih AgNP u vršku korijena uročnjaka divljeg tipa nakon sedmog dana tretmana sa 100 μM AgNO_3 pomoću multifotonskog pretražnog konfokalnog mikroskopa. A) svijetlo vidno polje, B) refleksija AgNP (zelena boja), C) refleksija AgNP u vršku korijena; prikaz preklopljenih slika A) i B), D) maksimalna projekcija svih snimljenih z-ravnina E) luminiscenca AgNP (crvena boja), F) prikaz vremena života fluorescencije AgNP u vršku korijena. Mjerilo prikazuje 154,4 μm .

Nakon devetog dana tretmana sa 100 μM AgNP-PVP ili 100 μM AgNO_3 može se vidjeti da se reflektirajuće čestice (slika 19B, 19C, 20B i 20C) koje i luminsciraju (slika 19E i 20E), a imaju život fluorescencije oko 50 ps (slika 19F i 20F), nalaze u vršnim stanicama korijena, ali i u stanicama korijenove kape nakon tretmana sa 100 μM PVP-AgNP i 100 μM AgNO_3 (slika 19D i 20D).

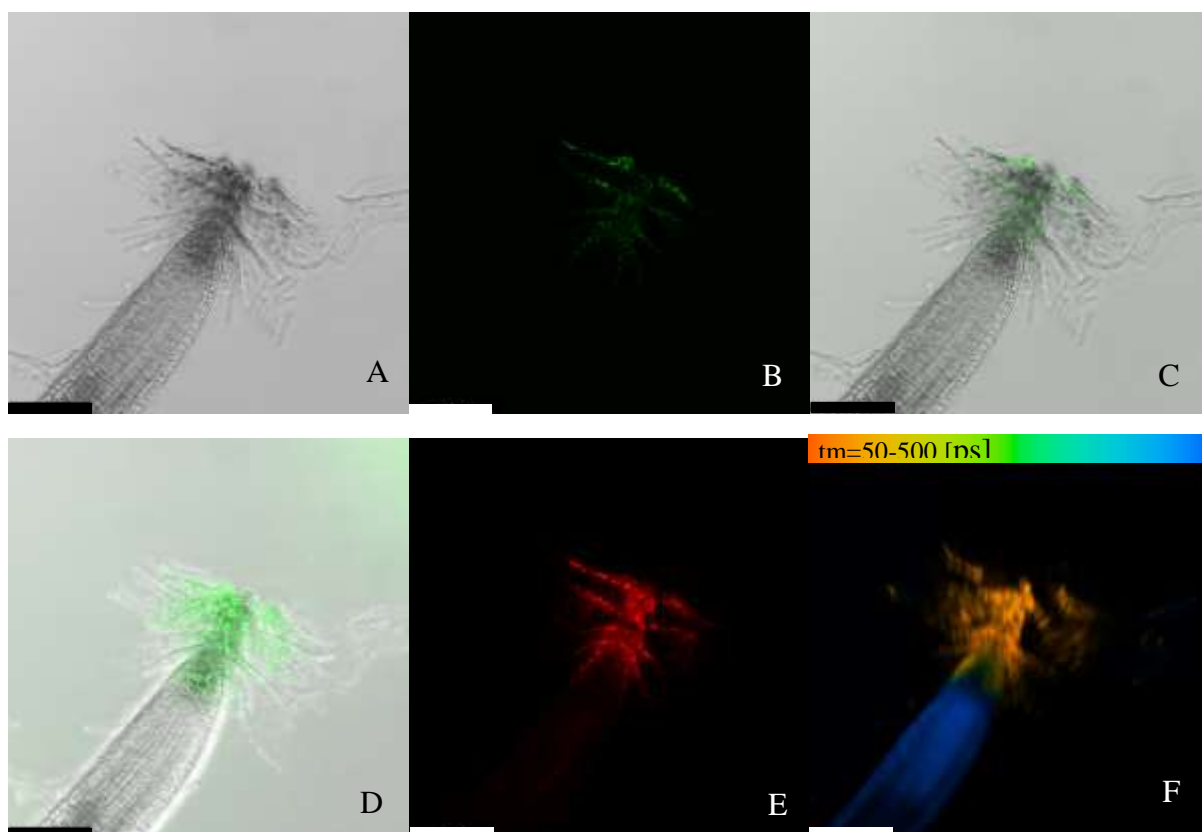


Slika 19. Lokalizacija PVP-AgNP u vršku korijena uročnjaka divljeg tipa nakon devetog dana tretmana sa 100 μM PVP-AgNP pomoću multifotonskog pretražnog konfokalnog mikroskopa. A) svijetlo vidno polje, B) refleksija PVP-AgNP (zelena boja), C) refleksija PVP-AgNP u vršku korijena; prikaz preklopljenih slika A) i B), D) maksimalna projekcija svih snimljenih z-ravnina E) luminiscenca PVP-AgNP (crvena boja), F) prikaz vremena života fluorescencije PVP-AgNP u vršku korijena. Mjerilo prikazuje 154,4 μm .

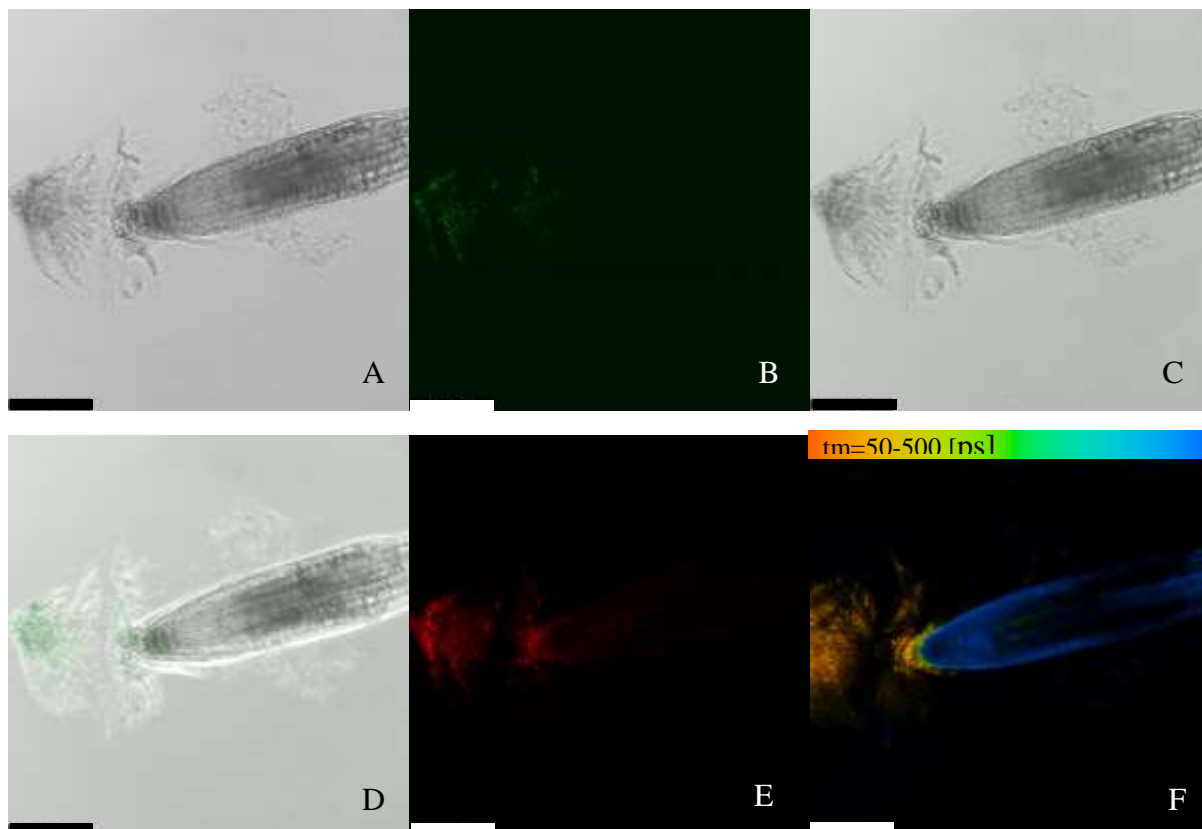


Slika 20. Lokalizacija novonastalih AgNP u vršku korijena uročnjaka divljeg tipa nakon devetog dana tretmana sa 100 μM AgNO_3 pomoću multifotonskog pretražnog konfokalnog mikroskopa. A) svijetlo vidno polje, B) refleksija AgNP (zelena boja), C) refleksija AgNP u vršku korijena; prikaz preklapljenih slika A) i B), D) maksimalna projekcija svih snimljenih z-ravnina E) luminiscenca AgNP (crvena boja), F) prikaz vremena života fluorescencije AgNP u vršku korijena. Mjerilo prikazuje 154,4 μm .

Nakon jedanaestog dana tretmana sa 100 μM AgNP-PVP ili 100 μM AgNO_3 može se vidjeti da se reflektirajuće čestice (slika 21B, 21C, 22B i 22C) koje i luminisciraju (slika 21E 22E), a imaju život fluorescencije oko 50 ps (slika 21F i 22F), nalaze u vršnim stanicama korijena, ali i u stanicama korijenove kape (slika 21D i 22D). Također se može uočiti kako takvih reflektirajućih i luminiscirajućih čestica ima više na vršnim stanicama korijena u klijancima nakon tretmana sa 100 μM PVP-AgNP nego nakon tretmana sa 100 μM AgNO_3 .



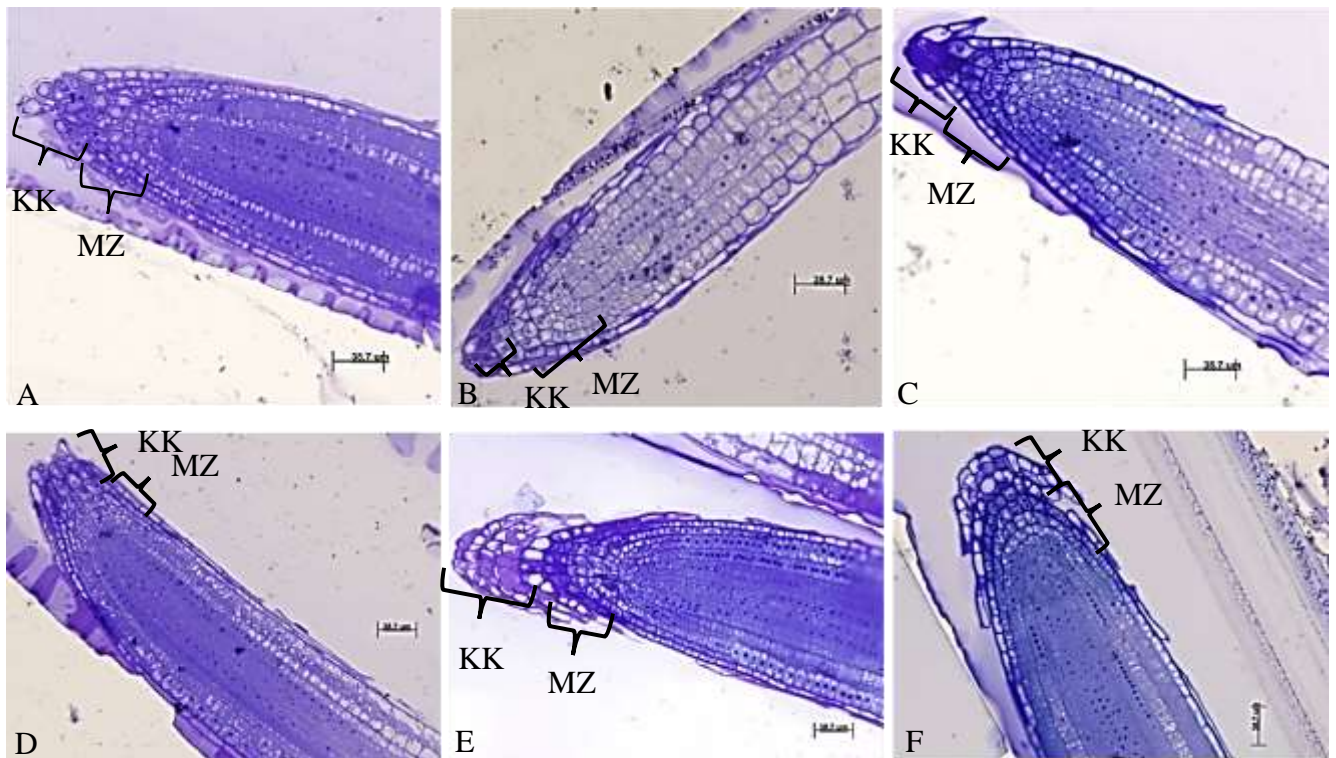
Slika 21. Lokalizacija PVP-AgNP u vršku korijena uročnjaka divljeg tipa nakon jedanaest dana tretmana sa 100 μM PVP-AgNP pomoću multifotonskog pretražnog konfokalnog mikroskopa. A) svijetlo vidno polje, B) refleksija PVP-AgNP (zelena boja), C) refleksija PVP-AgNP u vršku korijena; prikaz preklopljenih slika A) i B), D) maksimalna projekcija svih snimljenih z-ravnina E) luminiscenca PVP-AgNP (crvena boja), F) prikaz vremena života fluorescencije PVP-AgNP u vršku korijena. Mjerilo prikazuje 154,4 μm .



Slika 22. Lokalizacija novonastalih AgNP u vršku korijena uročnjaka divljeg tipa nakon jedanaestog dana tretmana sa 100 μM AgNO_3 pomoću multifotonskog pretražnog konfokalnog mikroskopa. A) svijetlo vidno polje, B) refleksija AgNP (zelena boja), C) refleksija AgNP u vršku korijena; prikaz preklopljenih slika A) i B), D) maksimalna projekcija svih snimljenih z-ravnina E) luminiscenca AgNP (crvena boja), F) prikaz vremena života fluorescencije AgNP u vršku korijena. Mjerilo prikazuje 154,4 μm .

4.6. Analiza promjena strukture stanica i ultrastrukture organela kotiledona i vrška korijena

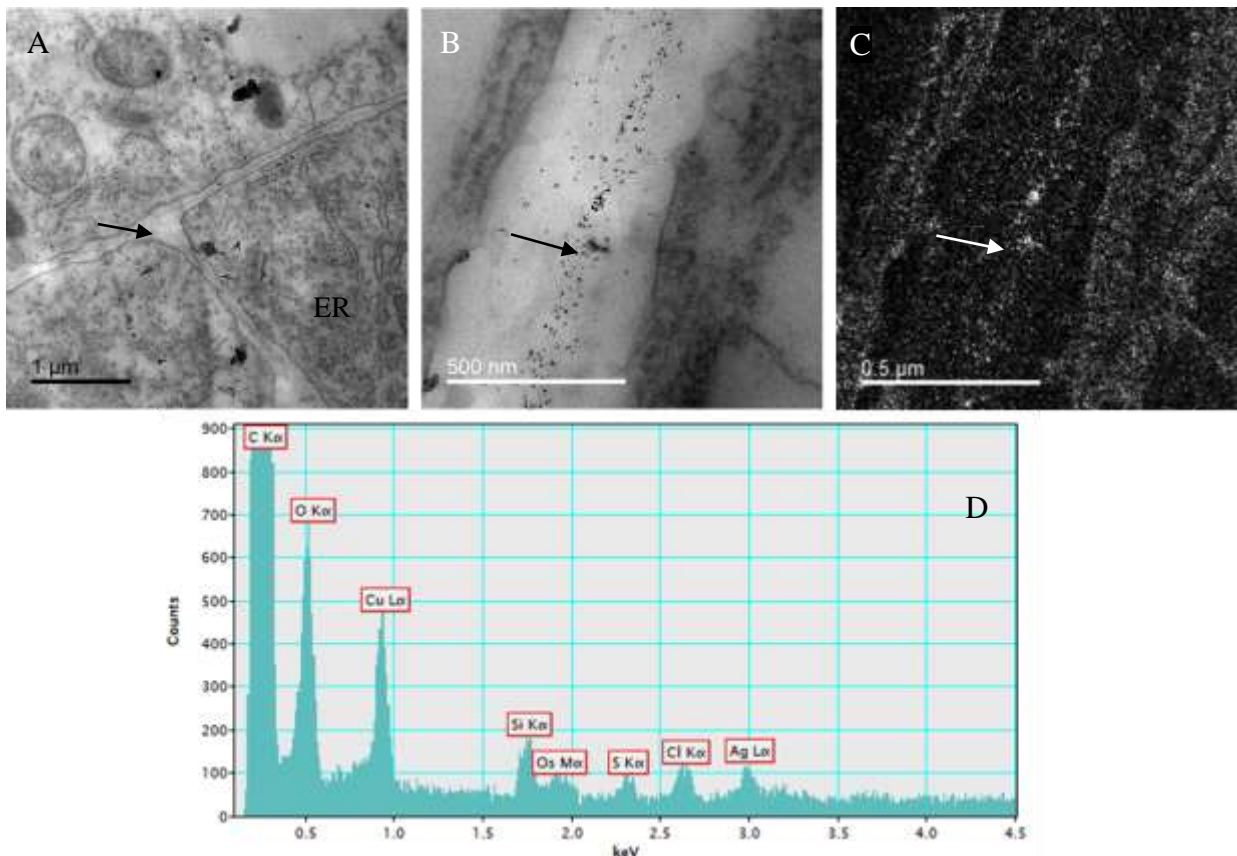
Analizom uzdužnih presjeka vrška korijena kontrolnog klijanca te tretiranih klijanaca divljeg tipa sa 100 μM PVP-AgNP ili 100 μM AgNO_3 nakon jednog i jedanaestog dana nisu uočljive značajne promjene u strukturi stanica tretiranih i kontrolnih klijanaca (slika 23). Na uzdužnim presjecima može se uočiti dio korijenove kape te zona meristema, a vidljive su i jezgre stanica.



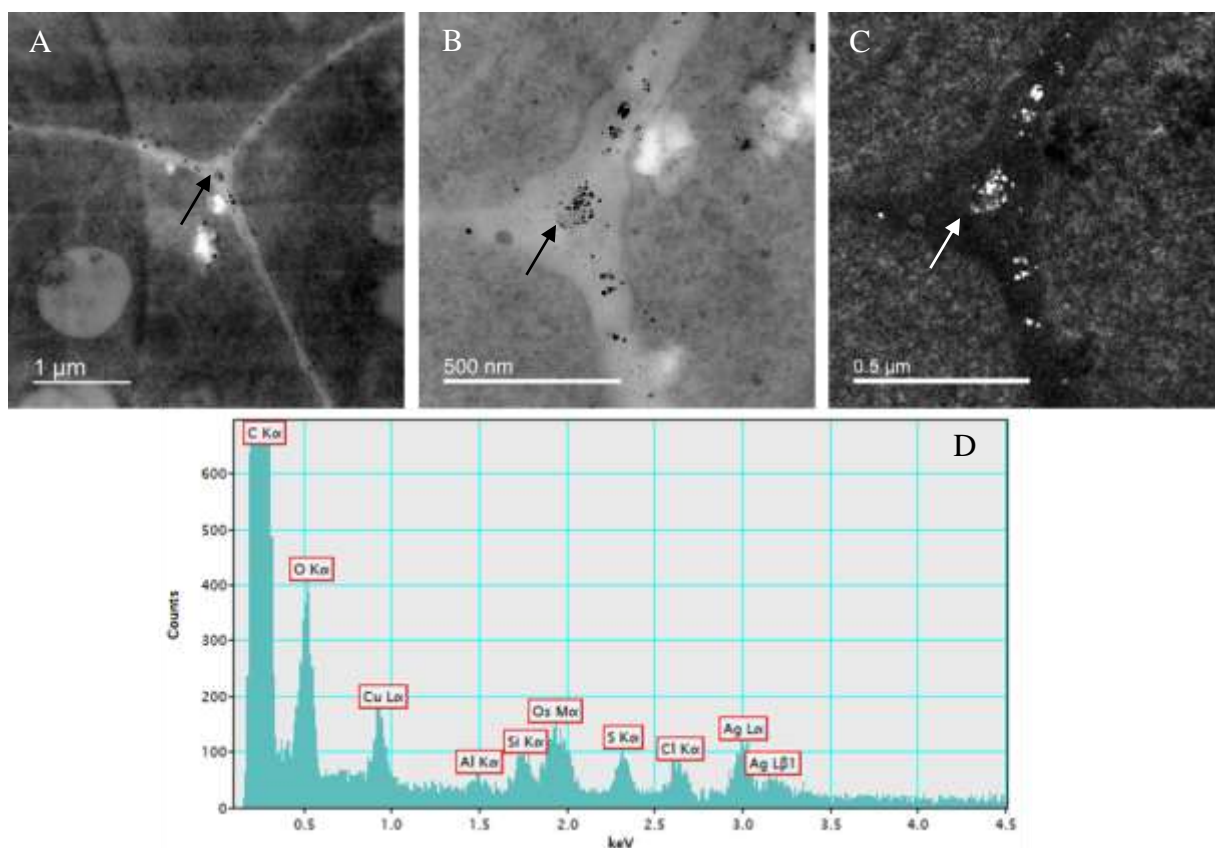
Slika 23. Uzdužni prerezi korijenovog vrška klijanaca uročnjaka divljeg tipa snimljeni pod svjetlosnim mikroskopom. A) kontrolni korijen nakon prvog dana tretmana B) korijen klijanca tretiran sa 100 μM PVP-AgNP nakon prvog dana tretmana C) korijen klijanca tretiran sa 100 μM AgNO_3 nakon prvog dana tretmana D) kontrolni korijen nakon jedanaestog dana tretmana E) korijen klijanca tretiran sa 100 μM PVP-AgNP nakon jedanaestog dana tretmana F) korijen klijanca tretiran sa 100 μM AgNO_3 nakon jedanaestog dana tretmana. Slovne oznake označuju korijenovu kapu (KK) te meristemsku zonu (MZ). Mjerilo prikazuje 38,7 μm .

Na transmisijskim elektronskim snimkama poprečnih prereza vrška korijena uročnjaka divljeg tipa nisu uočene razlike između ultrastrukture organela klijanaca tretiranih s 100 μM PVP-AgNP (slika 24 i 26) ili 100 μM AgNO_3 (slika 25 i 27) nakon prvog (slika 24 i 25) i jedanaestog dana (slika 26 i 27). Na slikama je moguće uočiti normalnu ultrastrukturu stanica i organela npr. endoplazmatski retikulum (ER) (slika 24A) te amiloplasti sa škrobnim zrcima (a) (slika 26A). Nadalje, PVP-AgNP te novonastale AgNP nakon tretmana sa 100 μM AgNO_3 vizualizirane su u staničnoj stijenci i međustaničnom prostoru korijenove kape. Slike 24A i 24B prikazuju PVP-AgNP lokalizirane u staničnoj stijenci i međustaničnom prostoru korijenove kape već nakon prvog dana tretmana, a slike 25A i 25B prikazuju novonastale AgNP u staničnoj stijenci i međustaničnom prostoru korijenove kape također nakon prvog

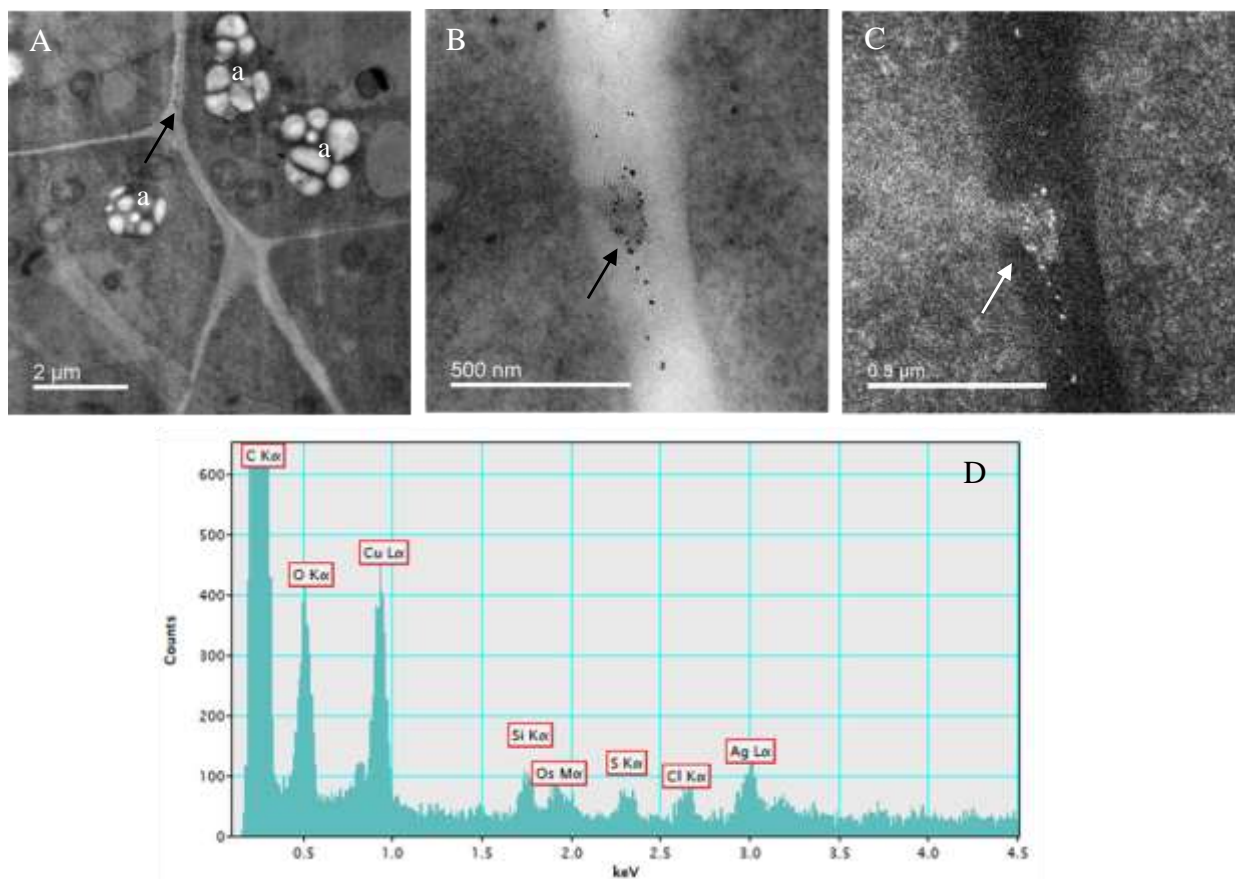
dana tretmana s 100 μM AgNO_3 . Također, nakon jedanaestog dana tretmana PVP-AgNP (slika 26A i 26B) kao i novonastale AgNP (slika 27A i 27B) su lokalizirane u staničnoj stijenci i međustaničnom prostoru korijenove kape. Utvrđivanjem elementarne mape srebra (slika 24C, 25C, 26C i 27C) te spektra energijski razlučujuće/disperzivne rendgenske spektroskopije (slika 24D, 25D, 26D i 27D) potvrđeno je da su uočene čestice upravo nanočestice srebra.



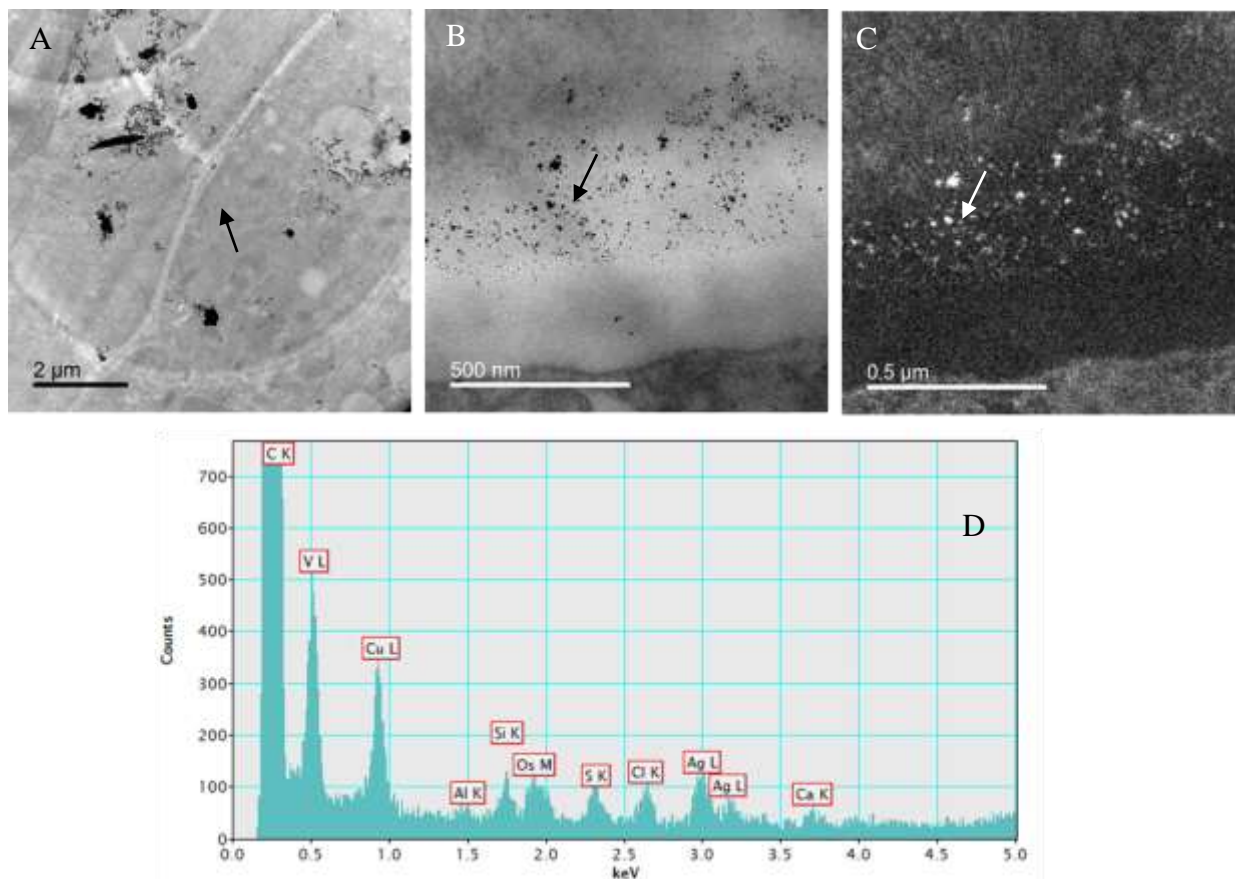
Slika 24. Poprečni prerezi vrška korijena uročnjaka divljeg tipa vizualizirani pod transmisijskim elektronskim mikroskopom nakon prvog dana tretmana sa 100 μM PVP-AgNP. A) svijetlo vidno polje B) svijetlo vidno polje uvećanog dijela korijena C) mapa elementa srebra D) spektar energijski razlučujuće/disperzivne rendgenske spektroskopije (EDX). Označen je endoplazmatski retikulum (ER) te strelice pokazuju na PVP-AgNP.



Slika 25. Poprečni prerezi vrška korijena uročnjaka divljeg tipa vizualizirani pod transmisijskim elektronskim mikroskopom nakon prvog dana tretmana sa 100 μM AgNO₃. A) svijetlo vidno polje B) svijetlo vidno polje uvećanog dijela korijena C) mapa elementa srebra D) spektar energijski razlučujuće/disperzivne rendgenske spektroskopije (EDX). Strelice pokazuju na AgNP.

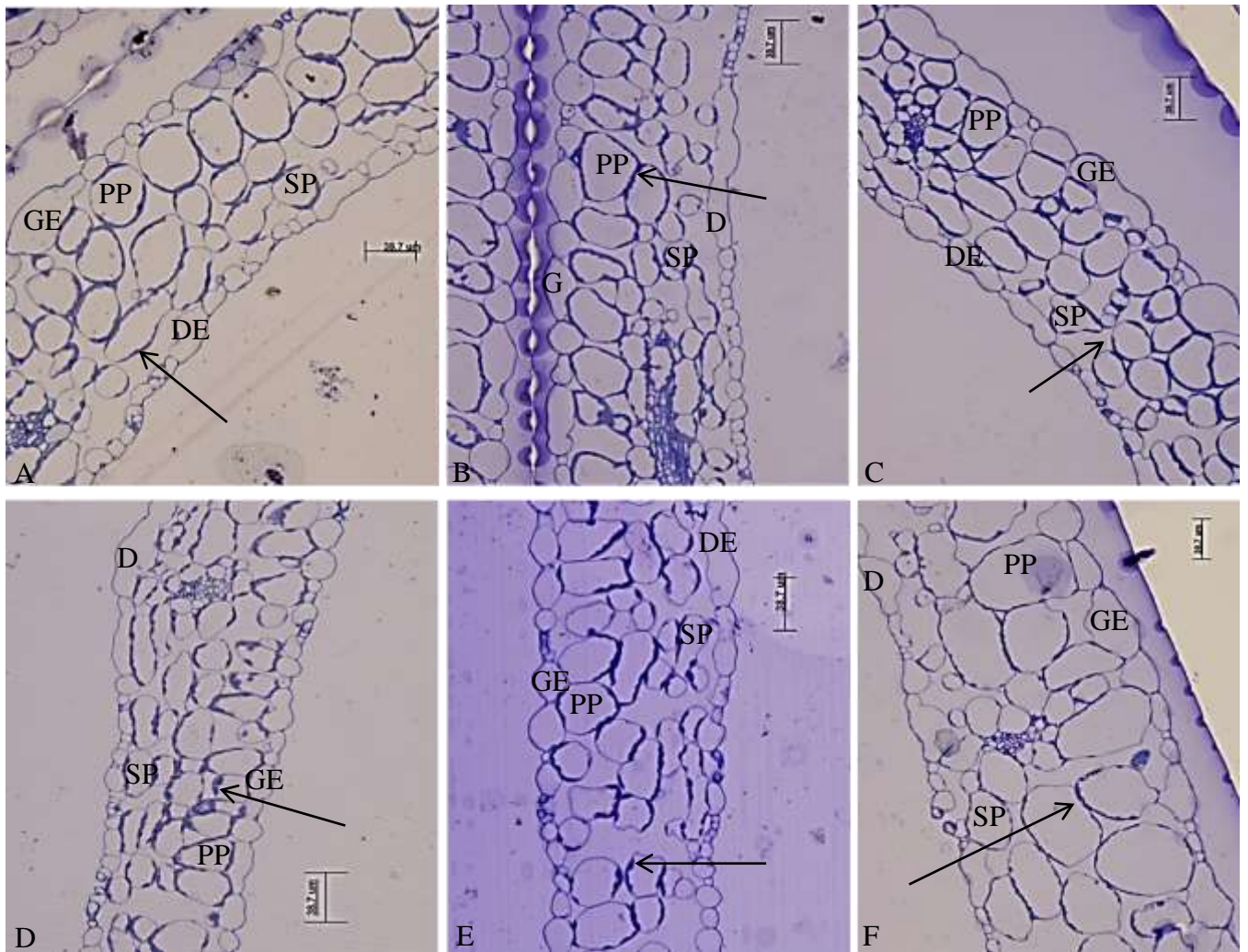


Slika 26. Poprečni prerezi vrška korijena uročnjaka divljeg tipa vizualizirani pod transmisijskim elektronskim mikroskopom nakon jedanaestog dana tretmana sa 100 μM PVP-AgNP. A) svijetlo vidno polje B) svijetlo vidno polje uvećanog dijela korijena C) mapa elementa srebra D) spektar energijski razlučujuće/disperzivne rendgenske spektroskopije (EDX). Označeni su amiloplasti (a) te strelice pokazuju na PVP-AgNP.



Slika 27. Poprečni prerezi vrška korijena uročnjaka divljeg tipa vizualizirani pod transmisijskim elektronskim mikroskopom nakon jedanaestog dana tretmana sa 100 μM AgNO_3 . A) svijetlo vidno polje B) svijetlo vidno polje uvećanog dijela korijena C) mapa elementa srebra D) spektar energijski razlučujuće/disperzivne rendgenske spektroskopije (EDX). Strelice pokazuju na AgNP.

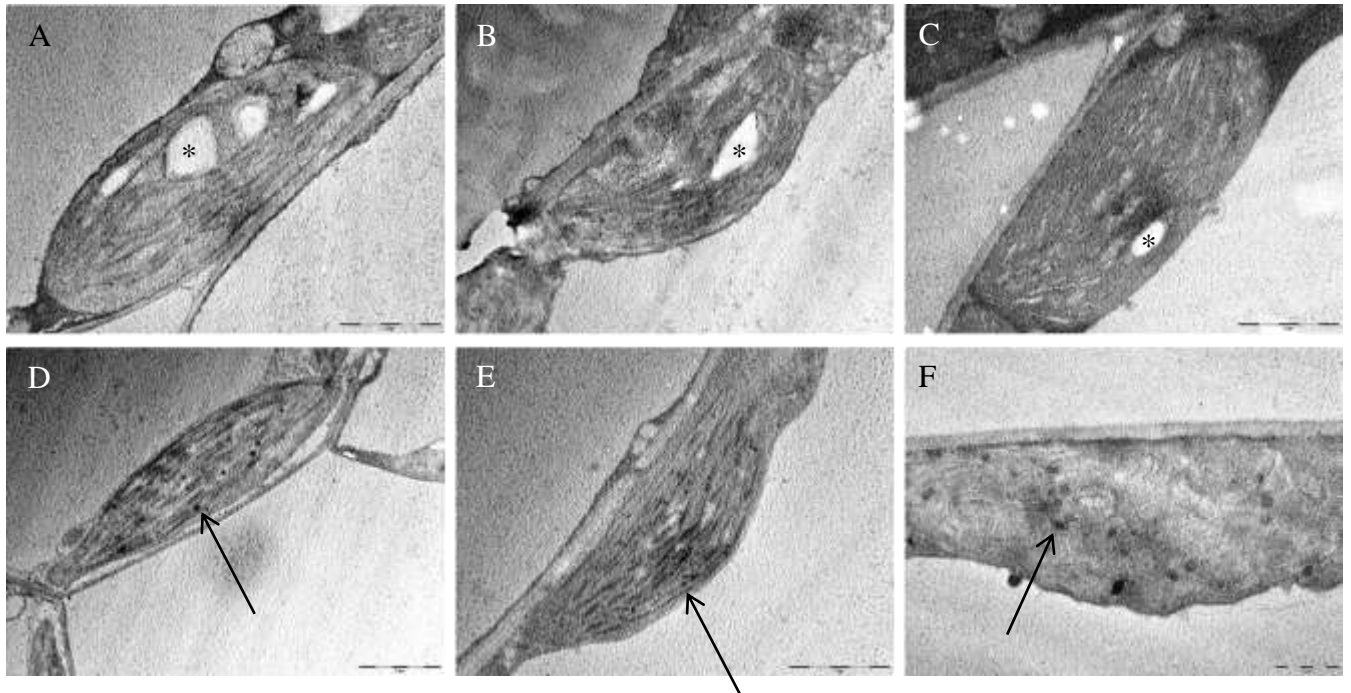
Na prerezima kotiledona klijanaca uročnjaka divljeg tipa, također nema uočljivih razlika u strukturi stanica između kontrolnih (slika 28A i 28D) i tretiranih klijanaca sa 100 μM PVP-AgNP (slika 28B i 28D) ili 100 μM AgNO_3 (slika 28C i 28E) nakon prvog i jedanaestog dana. Na svim prerezima se može uočiti pravilna adaksijalno-abaksijalna polarnost stanica kotiledona, gornja i donja epiderma te palisadni (PP) i spužvasti parenhim (SP) u kojima se mogu uočiti kloroplasti. Jedino, nakon jedanaestog dana tretmana sa 100 μM AgNO_3 može se uočiti da su stanice palisadnog i spužvastog parenhima veće od PP i SP prvog dana tretmana sa 100 μM PVP-AgNP i 100 μM AgNO_3 i jedanaestog dana tretmana sa 100 μM PVP-AgNP stanica.



Slika 28. Prezezi kotiledona klijanaca uročnjaka divljeg tipa snimljeni pod svjetlosnim mikroskopom. A) kotiledon kontrolnog klijanca nakon prvog dana tretmana, B) kotiledon klijanca tretiran sa 100 μM PVP-AgNP nakon prvog dana tretmana, C) kotiledon klijanca tretiran sa 100 μM AgNO_3 nakon prvog dana tretmana, D) kotiledon kontrolnog klijanca nakon jedanaestog dana tretmana E) kotiledon klijanca tretiran sa 100 μM PVP-AgNP nakon jedanaest dana tretmana F) kotiledon klijanca tretiran sa 100 μM AgNO_3 nakon jedanaest dana tretmana. Strelice pokazuju kloroplaste. Slovne oznake označavaju gornju epidermu (GE), palisadni parenhim (PP), spužvasti parenhim (SP) i donju epidermu (DE). Mjerilo prikazuje 38,7 μm .

Analizom kloroplasta klijanaca transmisijskom elektronskom mikroskopijom nisam uočio značajne razlike između tretiranih i ne tretiranih klijanaca nakon prvog dana tretmana s PVP-AgNP ili s ionskim srebrom (AgNO_3) (Slika 29A, B i C). Svi kloroplasti imaju razvijen tilakoidni sustav te sadrže po jedno škrobno zrnce. Analizom kloroplasta klijanaca nakon

jedanaestog dana tretmana može se vidjeti kako su kloroplasti kontrolnog klijanca te klijanca tretiranog s koncentracijom od 100 μM PVP-AgNP jednaki po strukturi te sadrže brojne sitne plastoglobule. Kod kloroplasta nakon jedanaestog dana tretmana sa 100 μM AgNO_3 može se vidjeti razlika u odnosu na kontrolu te klijanac tretiran sa 100 μM PVP-AgNP. Naime, nakon tretmana sa 100 μM AgNO_3 , tilakoidni sustav kloroplasta je narušen te se u njemu nalaze brojni plastoglobuli koji su veći od plastoglobula u kloroplastu kontrolnog klijanca i klijanca na tretmanu s PVP-AgNP.



Slika 29. Kloroplasti klijanca uročnjaka divljeg tipa pod transmisijskim elektronskim mikroskopom. A) kloroplast kontrolnog klijanca nakon prvog dana tretmana, B) kloroplast klijanca koji je tretiran sa 100 μM PVP-AgNP nakon prvog dana tretmana, C) kloroplast klijanca koji je tretiran sa 100 μM AgNO_3 nakon prvog dana, D) kloroplast kontrolnog klijanca nakon jedanaestog dana tretmana, E) kloroplast klijanca koji je tretiran sa 100 μM PVP-AgNP nakon jedanaestog dana tretmana, F) kloroplast klijanca koji je tretiran sa 100 μM AgNO_3 nakon jedanaestog dana. Zvezdica (*) označava škrobna zrnca, a strelica plastoglobule. Mjerilo prikazuje 2 μm .

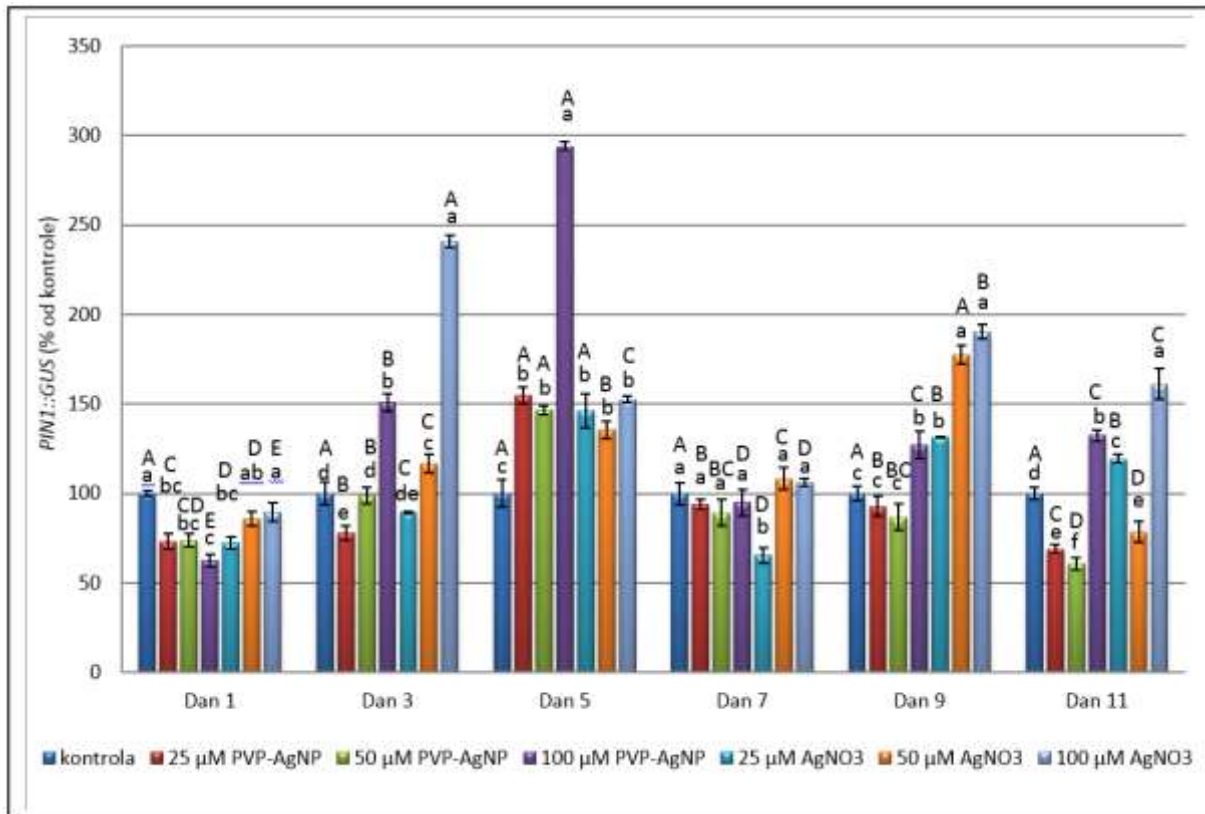
4.7. Analiza utjecaja PVP-AgNP i ionskog srebra (AgNO_3) na nakupljanje i transport auksina

4.7.1. Praćenje promjene u ekspresiji reporter gena *DR5::GUS*, *PIN1::GUS*, *PIN7::GUS* u korijenu uročnjaka

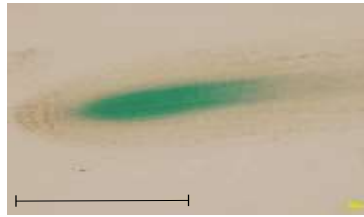
Primjer polarne lokalizacije PIN1 proteina u stanicama stele pomoću ekspresije *PIN1::GUS* reporter gena u korijenu klijanca transgenične reporter linije uročnjaka dan je na slici 31. Analizom ekspresije reporter gena *PIN1::GUS* mogu se uočiti statistički značajne razlike (slika 30 i slika 32). Već nakon prvog dana tretmana može se vidjeti kako je intenzitet ekspresije manji na tretmanu s 25, 50 i 100 μM PVP-AgNP te s 25 μM AgNO_3 u odnosu na kontrolu dok je intenzitet ekspresije kod 50 i 100 μM AgNO_3 jednak kontroli. Nakon tri dana tretmana intenzitet ekspresije je manji kod tretmana s 25 μM PVP-AgNP dok je kod tretmana sa 100 μM PVP-AgNP te s 50 i 100 μM AgNO_3 veći. Ekspresija je bila jednaka kontroli nakon tretmana s 50 μM PVP-AgNP i 25 μM AgNO_3 . Analizom ekspresije nakon pet dana tretmana uočljivo je kako je ekspresija kod svih tretmana značajno veća u odnosu na kontrolu s time da je kod svih tretmana intenzitet ekspresije jednak, izuzev tretmana sa 100 μM PVP-AgNP gdje je intenzitet znatno veći u odnosu na kontrolu, ali i na ostale tretmane. Nakon sedmog dana tretmana može se vidjeti kako je intenzitet ekspresije reporter gena jednak kontroli u svim tretmanima, osim nakon tretmana s 25 μM AgNO_3 gdje je intenzitet značajno manji u odnosu na kontrolu. Nakon devetog dana tretmana, ekspresija je bila jednaka kontroli na tretmanima s 25 i 50 μM PVP-AgNP dok je kod tretmana sa 100 μM PVP-AgNP te s 25, 50 i 100 μM AgNO_3 ekspresija značajno veća u odnosu na kontrolu. Jedanaestog dana tretmana, intenzitet ekspresije je manji kod tretmana s 25 i 50 μM PVP-AgNP te s 50 μM AgNO_3 , dok je kod tretmana sa 100 μM PVP-AgNP te s 25 i 100 μM AgNO_3 uočljiva veća ekspresija u odnosu na kontrolu.

Analizom intenziteta ekspresije reporter gena *PIN1::GUS* pojedinih tretmana po danima može se vidjeti kako je intenzitet ekspresije kod tretmana s 25 i 50 μM PVP-AgNP veći sve do petog dana nakon čega se do jedanaestog dana vraća na početnu razinu (slika 30 i slika 32). Slični trend se može vidjeti i kod tretmana sa 100 μM PVP-AgNP gdje je ekspresija statistički veća do petog dana. Isti trend prati i intenzitet ekspresije kod tretmana s 25 μM AgNO_3 . Kod tretmana s 50 μM AgNO_3 , ekspresija je značajno veća u odnosu na početnu vrijednost nakon petog i devetog dana. Kod tretmana sa 100 μM AgNO_3 , ekspresija reporter gena je značajno veća nakon trećeg dana, nakon kojeg se smanjivala sve do sedmog dana, ali

je cijelo vrijeme bila viša u odnosu na ekspresiju nakon prvog dana. Nakon sedmog dana, ekspresija je ponovno naglo veća do devetog dana.



Slika 30. Razina intenziteta ekspresije reporter gena *PIN1::GUS* u klijancima transgenične reporter linije nakon prvog, trećeg, petog, sedmog, devetog i jedanaestog dana tretmana na podlogama koje su sadržavale PVP-AgNP ili AgNO₃. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti relativnog intenziteta ekspresije u odnosu na kontrolni klijanac. Stupci unutar pojedinog promatranog dana označeni različitim malim tiskanim slovom statistički se značajno razlikuju unutar promatranog dana, a stupci određenih tretmana označeni različitim velikim tiskanim slovima se statistički značajno razlikuju između pojedinih dana ($p < 0,05$; Newman-Keuls test).



Slika 31. Primjer lokalizacije ekspresije *PIN1::GUS* reporter gena u korijenu pomoću svjetlosnog mikroskopa. Mjerilo prikazuje 100 μm .

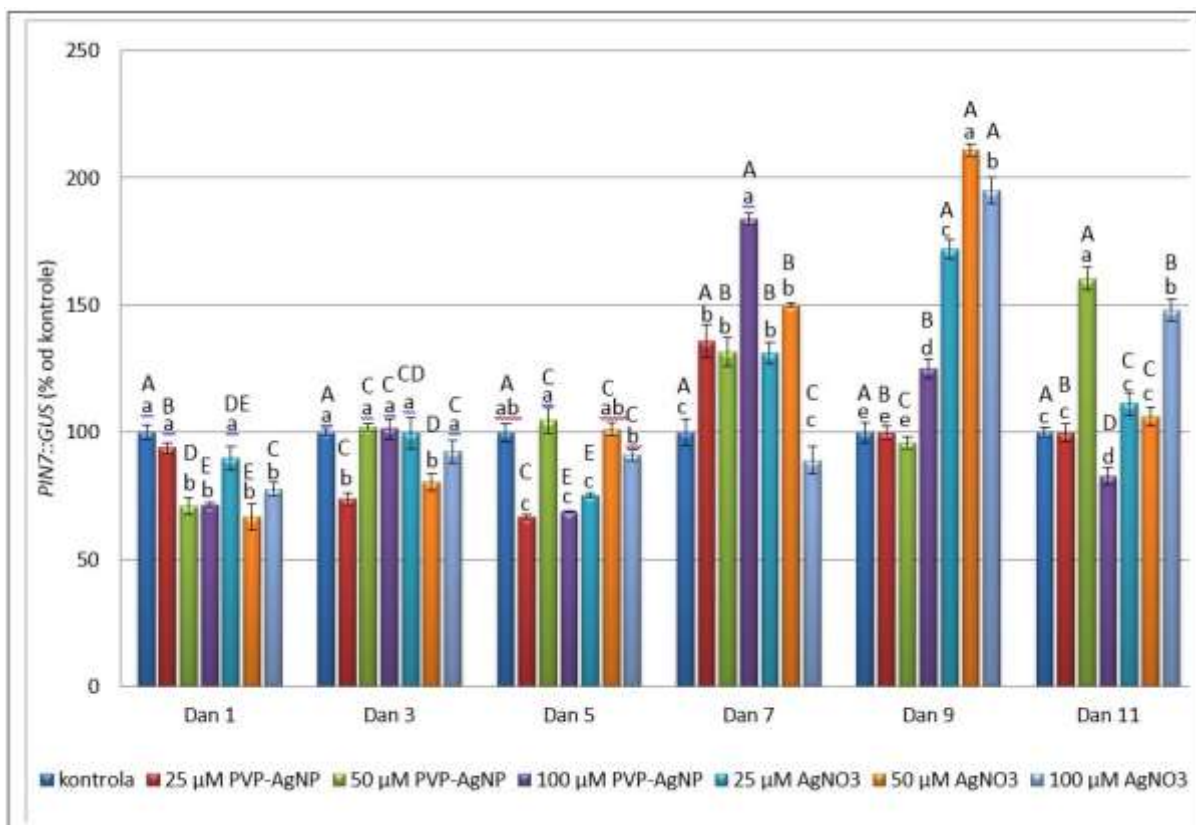
dan	kontrola	25 μM PVP-AgNP	50 μM PVP-AgNP	100 μM PVP-AgNP	25 μM AgNO ₃	50 μM AgNO ₃	100 μM AgNO ₃
1							
3							
5							
7							
9							
11							

Slika 32. Prikaz ekspresije *PIN1::GUS* u vrhovima korijena klijanaca transgenične reporter linije uročnjaka nakon prvog, trećeg i petog dana tretmana. Ekspresija *PIN1::GUS* reporter gena u vrhovima korijena kontrolnog klijanca, te klijanaca tretiranih s 25 μM PVP-AgNP, 50 μM PVP-AgNP, 100 μM PVP-AgNP, 25 μM AgNO₃, 50 μM AgNO₃ i 100 μM AgNO₃. Mjerilo prikazuje 100 μm .

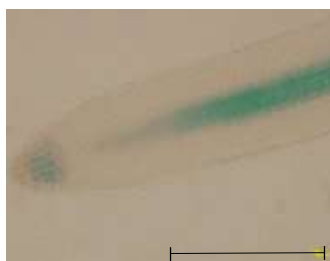
Primjer lokalizacije PIN7 proteina u stanicama stele te stanicama kolumele pomoću ekspresije *PIN7::GUS* reporter gena prikazan je na slici 34. Analizom promjene ekspresije reporter gena *PIN7::GUS* mogu se uočiti razne statistički značajne promjene (slika 33 i slika

35). Nakon prvog dana se može uočiti kako su, izuzev tretmana s 25 μM PVP-AgNP i 25 μM AgNO_3 gdje je ekspresija ostala jednaka kontroli, ekspresije svih ostalih tretmana značajno manje. Nakon trećeg dana tretmana može se vidjeti kako se trend promijenio te je ekspresija kod tretmana s 25 μM PVP-AgNP i 25 μM AgNO_3 manja u odnosu na kontrolu, dok su ekspresije na ostalim tretmanima jednake kontroli. Nakon petog dana tretmana, ekspresija je manja kod tretmana s 25 i 100 μM PVP-AgNP te s 25 μM AgNO_3 dok je ekspresija s 50 μM PVP-AgNP te s 50 i 100 μM AgNO_3 ostala jednaka kontroli. Do petog dana tretmana, ekspresija nije veća niti na jednom tretmanu, u odnosu na kontrolu. Tek nakon sedmog dana tretmana, ekspresija je kod svih tretmana značajno veća u odnosu na kontrolu, izuzev tretmana sa 100 μM AgNO_3 gdje je ostala jednaka kontroli. Nakon devetog dana tretmana, ekspresija je veća u odnosu na kontrolu kod tretmana sa 100 μM PVP-AgNP te sa svim promatranim koncentracijama AgNO_3 . Kod ostalih tretmana ekspresija je ostala jednaka ekspresiji kontrole. Nakon jedanaestog dana tretmana može se vidjeti kako je ekspresija kod tretmana s 25 μM PVP-AgNP te s 25 i 50 μM AgNO_3 jednaka kontroli, ekspresija nakon tretmana sa 100 μM PVP-AgNP je manja, a nakon tretmana s 50 μM PVP-AgNP i sa 100 μM AgNO_3 ekspresija je značajno veća u odnosu na kontrolu.

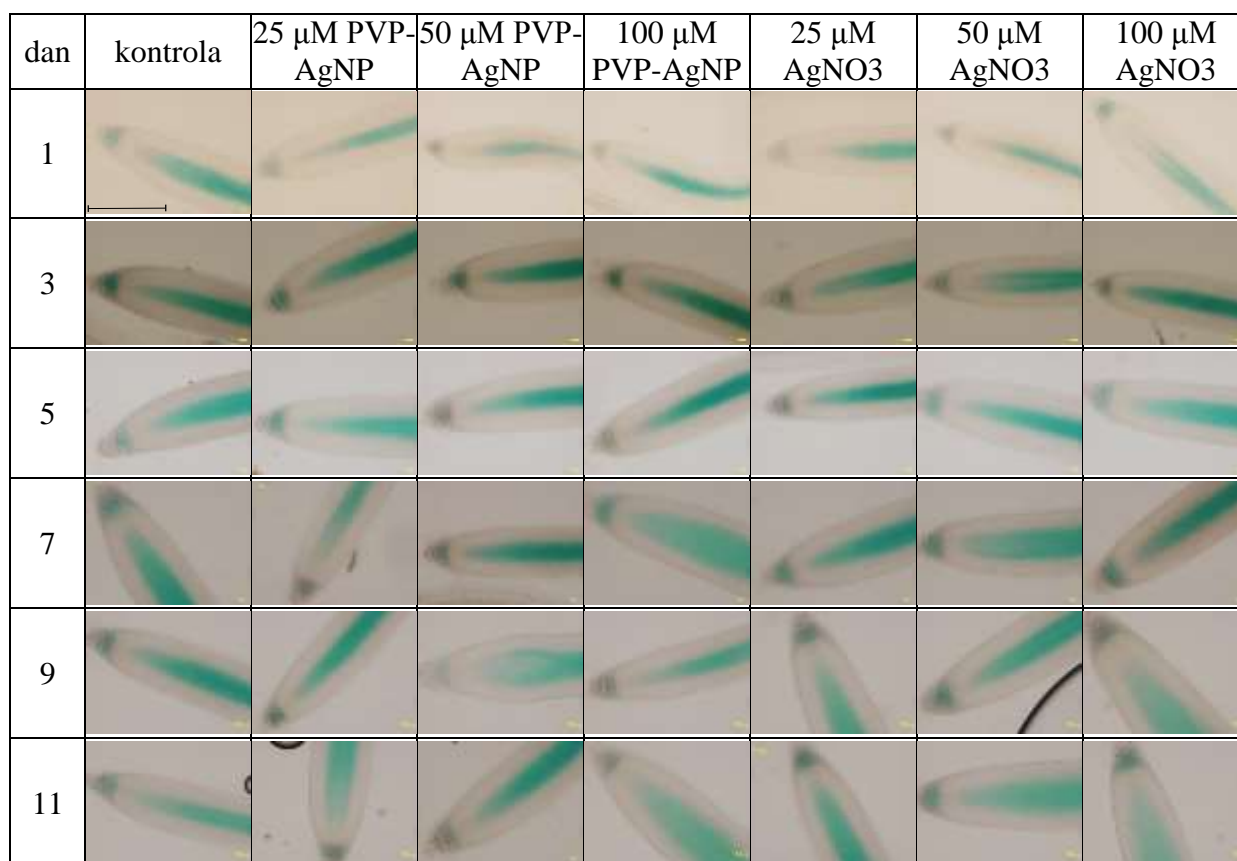
Praćenjem promjene ekspresije reporter gena *PIN7::GUS* po danima, može se vidjeti kako je kod tretmana s 25 μM PVP-AgNP ekspresija značajno manja nakon trećeg dana tretmana (slika 32 i slika 33). Nakon sedmog dana može se vidjeti značajno veća ekspresija nakon koje se vraća na svoju početnu vrijednost. Kod tretmana s 50 μM PVP-AgNP može se uočiti kako je ekspresija veća nakon trećeg, sedmog i jedanaestog dana. Kod tretmana sa 100 μM PVP-AgNP ekspresija je značajno veća nakon trećeg, sedmog i jedanaestog dana u odnosu na svoju početnu vrijednost. Analizom promjene ekspresije po danima na tretmanu s 25 μM AgNO_3 može se vidjeti kako je ekspresija značajno veća nakon sedmog i devetog dana. Kod tretmana s 50 μM AgNO_3 , ekspresija je značajno veća svaki dan do jedanaestog dana. Na tretmanu sa 100 μM AgNO_3 , ekspresija reporter gena *PIN7::GUS* je značajno veća nakon devetog i jedanaestog dana.



Slika 33. Razina intenziteta ekspresije reporter gena *PIN7::GUS* u klijancima transgenične reporter linije nakon prvog, trećeg, petog, sedmog, devetog i jedanaestog dana tretmana na podlogama koje su sadržavale PVP-AgNP ili AgNO₃. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti relativnog intenziteta ekspresije u odnosu na kontrolni klijanac. Stupci unutar pojedinog promatranog dana označeni različitim malim tiskanim slovima statistički se značajno razlikuju unutar promatranog dana, a stupci određenih tretmana označeni različitim velikim tiskanim slovima se statistički značajno razlikuju između pojedinih dana ($p < 0,05$; Newman-Keuls test).



Slika 34. Prikaz lokalizacije ekspresije *PIN7::GUS* reporter gena u korijenu pomoću svjetlosnog mikroskopa. Mjerilo prikazuje 100 μm.



Slika 35. Prikaz ekspresije *PIN7::GUS* u vrhovima korijena klijanaca transgenične reporter linije uročnjaka nakon prvog, trećeg i petog dana tretmana. Ekspresija *PIN7::GUS* reporter gena u vrhovima korijena kontrolnog klijanca te klijanaca tretiranih s 25 μ M PVP-AgNP, 50 μ M PVP-AgNP, 100 μ M PVP-AgNP, 25 μ M AgNO₃, 50 μ M AgNO₃ i 100 μ M AgNO₃. Mjerilo prikazuje 100 μ m.

Primjer lokalizacije ekspresije *DR5::GUS* reporter gena u vršku korijena klijanca transgenične reporter linije uročnjaka prikazan je na slici 36. Analizom promjene ekspresije reporter gena *DR5::GUS* uočio sam kako ekspresija reporter gena nije bila dovoljno reproducibilna i to vjerojatno zbog biljaka koje su najvjerojatnije bili heterozigoti za ovo praćeno svojstvo. Zbog toga, nisam proveo analizu intenziteta ekspresije reporter gena *DR5::GUS* (slika 37).



Slika 36. Prikaz lokalizacije ekspresije *DR5::GUS* reporter gena u korijenu pomoću svjetlosnog mikroskopa. Mjerilo prikazuje 100 μm . Slika preuzeta i prilagođena prema Buer i Muday, 2004.

dan	kontrola	25 μM PVP-AgNP	50 μM PVP-AgNP	100 μM PVP-AgNP	25 μM AgNO ₃	50 μM AgNO ₃	100 μM AgNO ₃
1							
3							
5							

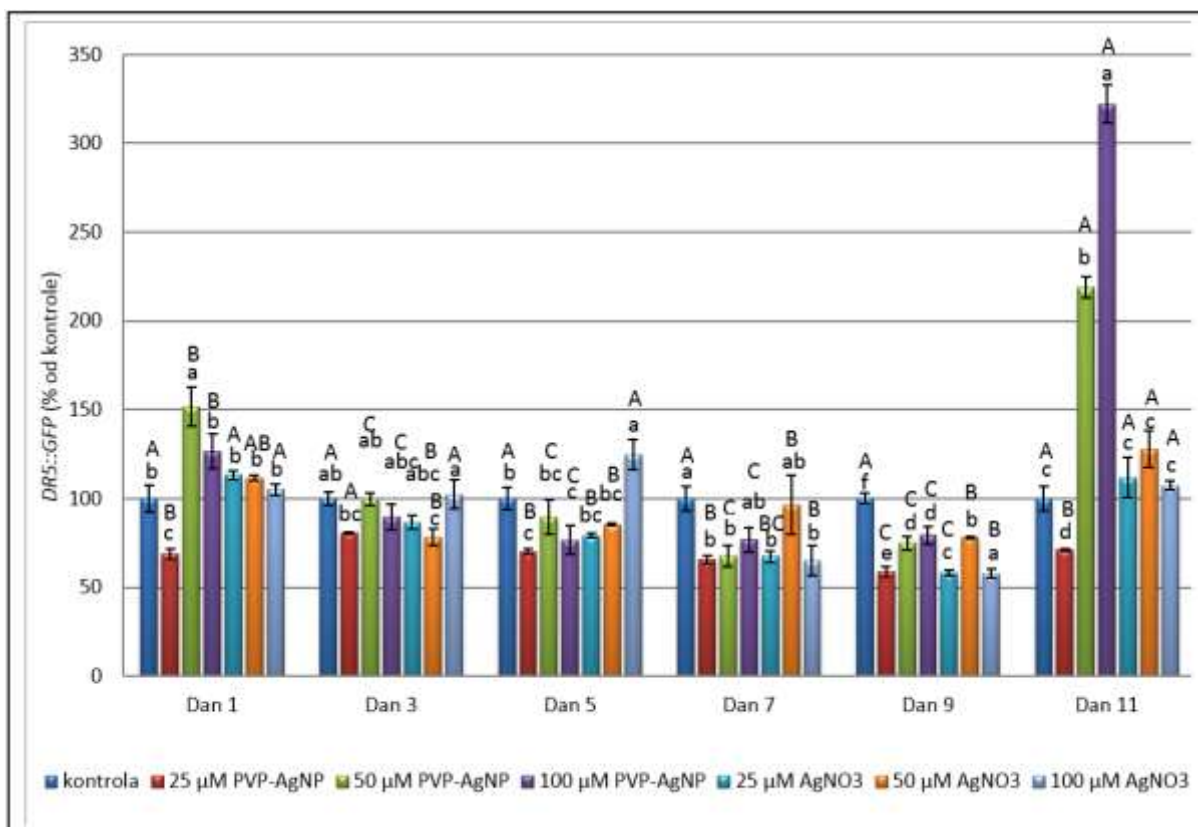
Slika 37. Prikaz ekspresije *DR5::GUS* u vrhovima korijena klijanaca transgenične reporter linije uročnjaka nakon prvog, trećeg i petog dana tretmana. Ekspresija *DR5::GUS* reporter gena u vrhovima korijena kontrolnog klijanca te klijanaca tretiranih s 25 μM PVP-AgNP, 50 μM PVP-AgNP, 100 μM PVP-AgNP, 25 μM AgNO₃, 50 μM AgNO₃ i 100 μM AgNO₃. Mjerilo prikazuje 100 μm .

4.7.2. Praćenje promjene u ekspresiji reporter gena *DR5::GFP*, *PIN1::GFP*, *PIN7::GFP* u korijenu uročnjaka fluorescencijskom mikroskopijom

Primjer lokalizacije ekspresije *DR5::GFP* reporter gena u vršku korijena klijanaca transgenične reporter linije uročnjaka prikazan je na slici 39. Analizom promjene ekspresije reporter gena *DR5::GFP* mogu se uočiti razne statistički značajne promjene (slika 38 i slika 40). Nakon prvog dana tretmana s 50 μM PVP-AgNP, ekspresija je veća u odnosu na kontrolu i na ostale tretmane, dok je kod ostalih tretmana ekspresija jednaka kontroli, izuzev tretmana s 25 μM PVP-AgNP gdje je ekspresija manja. Nakon trećeg dana tretmana, ekspresija *DR5::GFP* reporter gena je jednaka pri svim tretmanima u odnosu na kontrolni klijanac, osim

u slučaju tretmana s 50 μM AgNO_3 gdje je ekspresija manja u odnosu na kontrolu. Peti dan tretmana može se vidjeti da je ekspresija manja kod tretmana s 25 μM PVP-AgNP, a značajno veća nakon tretmana sa 100 μM AgNO_3 . Nakon sedmog dana tretmana može se uočiti da je ekspresija manja u svim tretmanima u odnosu na kontrolu, osim u slučaju tretmana sa 100 μM PVP-AgNP i 50 μM AgNO_3 gdje je ekspresija jednaka ekspresiji kontrole. Nakon devetog dana tretmana ekspresija je manja na svim tretmanima u odnosu na kontrolu. Jedanaestog dana nakon tretmana, ekspresija je manja kod klijanaca tretiranih s 25 μM PVP-AgNP u odnosu na kontrolu. S druge strane, ekspresija je nakon tretmana sa svim korištenim koncentracijama AgNO_3 jednaka kontroli dok je nakon tretmana s 50 i 100 μM PVP-AgNP ekspresija značajno veća u odnosu na kontrolu.

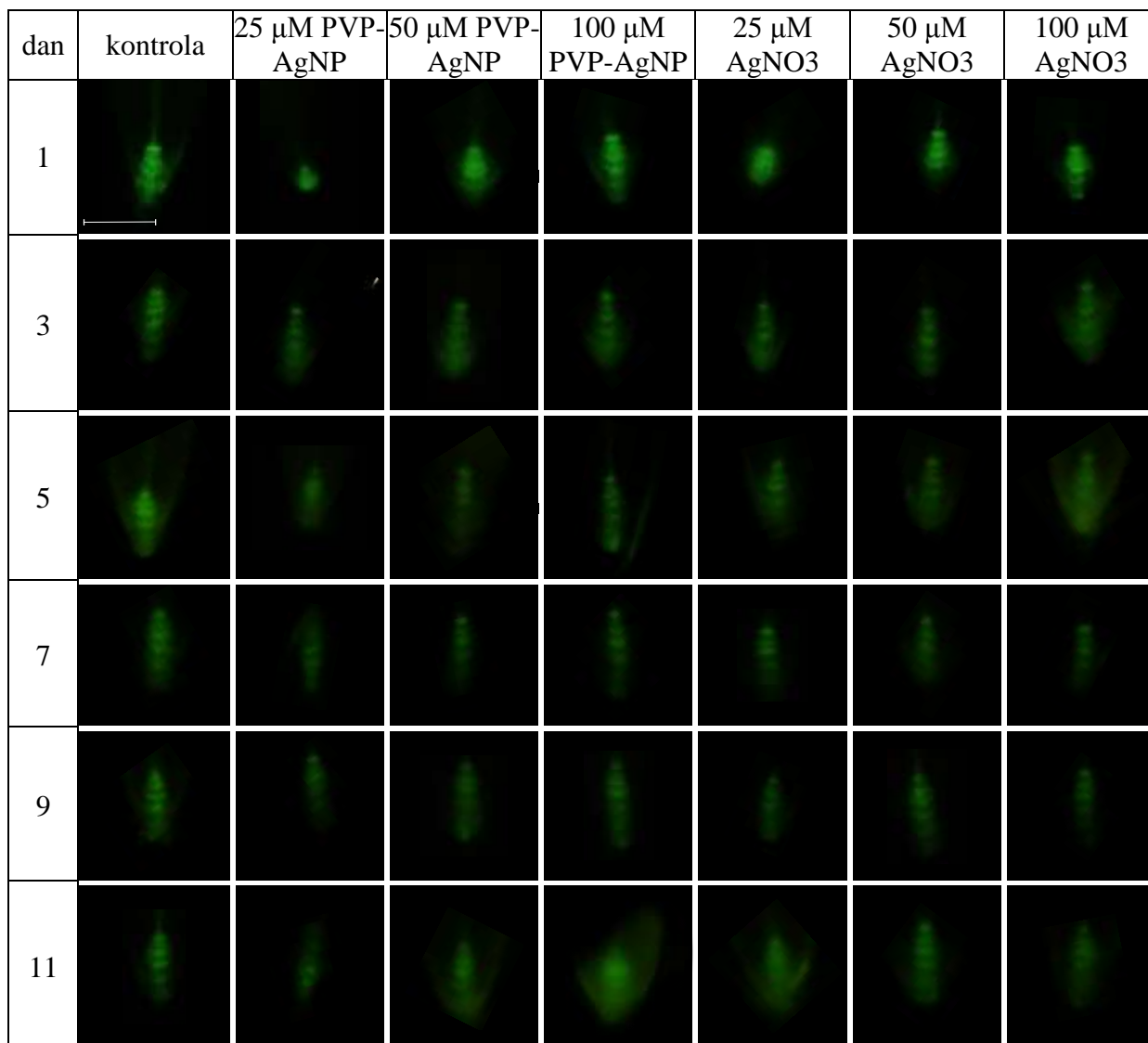
Analizom ekspresije reporter gena *DR5::GFP* pojedinih tretmana po danima tretmana može se vidjeti kako je kod tretmana s 25 μM PVP-AgNP ekspresija blago veća jedino nakon trećeg dana te blago manja nakon devetog dana (slika 38 i slika 40). Kod tretmana s 50 i 100 μM PVP-AgNP može se uočiti kako je ekspresija značajno manja nakon trećeg dana te značajno veća nakon jedanaestog dana. Analizom promjene ekspresije po danima na tretmanu s 25 μM AgNO_3 može se vidjeti kako je ekspresija značajno manja nakon trećeg i devetog dana. Kod tretmana s 50 μM AgNO_3 , ekspresija se nije značajno promijenila. Na tretmanu sa 100 μM AgNO_3 , ekspresija reporter gena *DR5::GFP* je značajno manja nakon sedmog dana.



Slika 38. Razina intenziteta ekspresije reporter gena *DR5::GFP* u klijancima transgenične reporter linije nakon prvog, trećeg, petog, sedmog, devetog i jedanaestog dana tretmana na podlogama koje su sadržavale PVP-AgNP ili AgNO_3 . Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti relativnog intenziteta ekspresije u odnosu na kontrolni klijanac. Stupci unutar pojedinog promatranog dana označeni različitim malim tiskanim slovom statistički se značajno razlikuju unutar promatranog dana, a stupci određenih tretmana označeni različitim velikim tiskanim slovima se statistički značajno razlikuju između pojedinih dana ($p < 0,05$; Newman-Keuls test).



Slika 39. Prikaz lokalizacije ekspresije *DR5::GFP* reporter gena u korijenu pomoću fluorescencijskog mikroskopa. A) fazno-kontrastna slika, B) prikaz fluorescencije *DR5::GFP* reporter gena C) prikaz preklopljenih slika A) i B). Mjerilo prikazuje 100 µm.

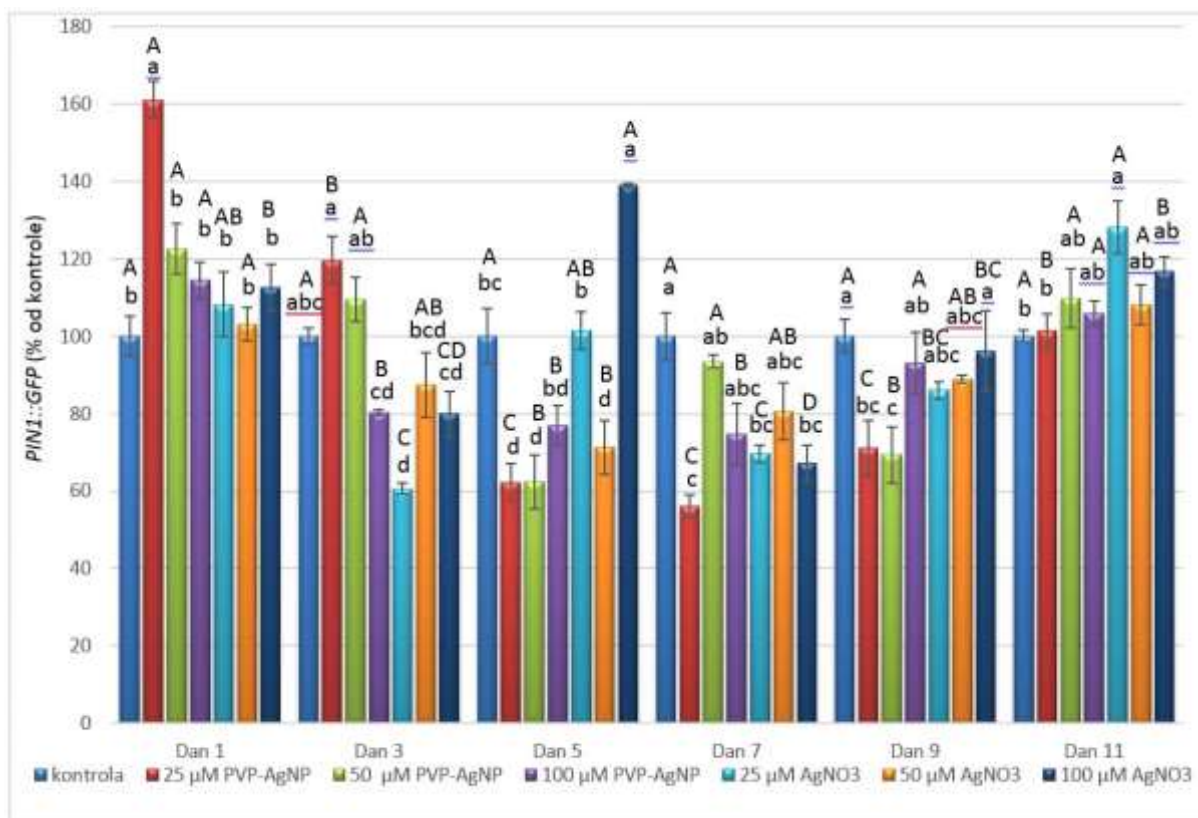


Slika 40. Prikaz ekspresije *DR5::GFP* u vrhovima korijena klijanaca transgenične reporter linije uročnjaka nakon prvog, trećeg i petog dana tretmana. Ekspresija *PIN1::GUS* reporter gena u vrhovima korijena kontrolnog klijanca, te klijanaca tretiranih s 25 μ M PVP-AgNP, 50 μ M PVP-AgNP, 100 μ M PVP-AgNP, 25 μ M AgNO₃, 50 μ M AgNO₃ i 100 μ M AgNO₃. Mjerilo prikazuje 100 μ m.

Primjer polarne lokalizacije PIN1 proteina u stanicama stele pomoću ekspresije *PIN1::GFP* reporter gena u korijenu klijanca transgenične reporter linije uročnjaka dan je na slici 42. Analizom promjene ekspresije reporter gena *PIN1::GFP* vidljive su statistički značajne promjene (slika 41 i slika 43). Nakon prvog dana tretmana s koncentracijom od 25 μ M PVP-AgNP, ekspresija je veća u odnosu na kontrolu i ostale tretmane koji su međusobno jednaki. Treći dan tretmana može se vidjeti kako je ekspresija svih tretmana jednaka kontroli,

izuzev tretmana s koncentracijom od 25 μM AgNO_3 gdje je ekspresija manja u odnosu na kontrolu. Nakon petog dana tretmana ekspresija je kod tretmana s 25 i 50 μM PVP-AgNP te 50 μM AgNO_3 manja u odnosu na kontrolu, kod tretmana s 100 μM PVP-AgNP i 25 μM AgNO_3 ekspresija je jednaka ekspresiji kontrole dok je tretmanom sa 100 μM AgNO_3 ekspresija značajno veća u odnosu na kontrolu. Sedmi dan tretmana, ekspresija reporter gena *PINI::GFP* je manja u odnosu na kontrolu kod tretmana s 25 μM PVP-AgNP te s 25 i 100 μM AgNO_3 dok je ekspresija kod ostalih tretmana jednaka ekspresiji kontrole. Nakon devetog dana tretmana, ekspresija kod tretmana s 25 i 50 μM PVP-AgNP je manja u odnosu na kontrolu dok je kod ostalih tretmana jednaka ekspresiji kontrole. Jedanaestog dana tretmana, značajno veća ekspresija u odnosu na kontrolu je vidljiva nakon tretmana s 25 μM AgNO_3 dok je kod ostalih tretmana jednaka ekspresiji kontrole.

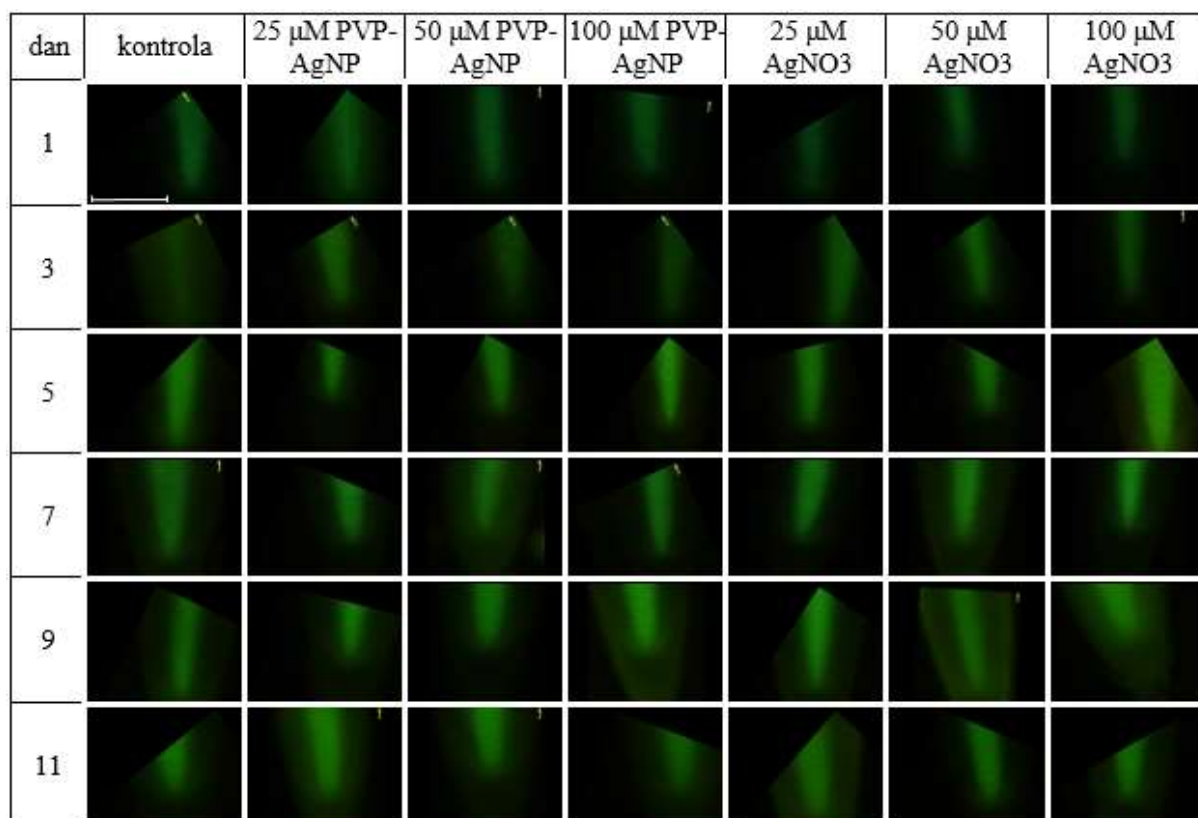
Analizom promjene ekspresije reporter gena *PINI::GFP* po danima, može se vidjeti kako je kod tretmana s 25 i 100 μM PVP-AgNP ekspresija značajno manja nakon trećeg i petog dana (slika 41 i slika 43). Kod tretmana s 50 μM PVP-AgNP može se uočiti kako je ekspresija značajno manja nakon petog i devetog dana tretmana. Analizom promjene ekspresije po danima na tretmanu s 25 μM AgNO_3 može se vidjeti kako je ekspresija značajno manja samo nakon trećeg dana dok se u ostalim danima vraća na razinu ekspresije prvog dana. Kod tretmana s 50 μM AgNO_3 , ekspresija je značajno manja samo nakon petog dana dok je kod tretmana sa 100 μM AgNO_3 , ekspresija značajno manja samo nakon trećeg, a značajno veća samo nakon petog dana.



Slika 41. Razina intenziteta ekspresije reporter gena *PIN1::GFP* u klijancima transgenične reporter linije nakon prvog, trećeg, petog, sedmog, devetog i jedanaestog dana tretmana na podlogama koje su sadržavale PVP-AgNP ili AgNO₃. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti relativnog intenziteta ekspresije u odnosu na kontrolni klijanac. Stupci unutar pojedinog promatranog dana označeni različitim malim tiskanim slovom statistički se značajno razlikuju unutar promatranog dana, a stupci određenih tretmana označeni različitim velikim tiskanim slovima se statistički značajno razlikuju između pojedinih dana ($p < 0,05$; Newman-Keuls test).



Slika 42. Prikaz lokalizacije ekspresije *PIN1::GFP* reporter gena u korijenu pomoću fluorescencijskog mikroskopa. A) fazno-kontrastna slika, B) prikaz fluorescencije *PIN1::GFP* reporter gena C) prikaz preklapljenih slika A) i B). Mjerilo prikazuje 100 μm.

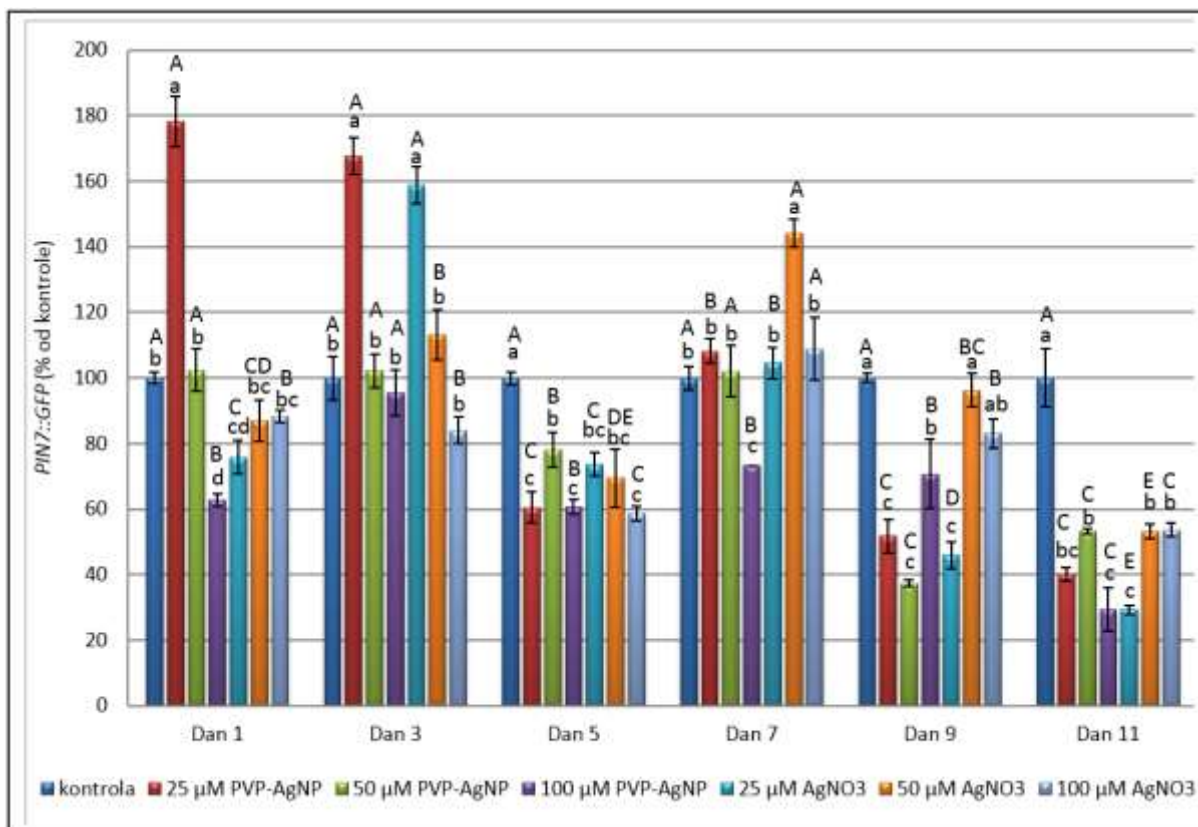


Slika 43. Prikaz ekspresije *PIN1::GFP* u vrhovima korijena klijanaca transgenične reporter linije uročnjaka nakon prvog, trećeg i petog dana tretmana. Ekspresija *PIN1::GUS* reporter gena u vrhovima korijena kontrolnog klijanca, te klijanaca tretiranih s 25 μ M PVP-AgNP, 50 μ M PVP-AgNP, 100 μ M PVP-AgNP, 25 μ M AgNO₃, 50 μ M AgNO₃ i 100 μ M AgNO₃. Mjerilo prikazuje 100 μ m.

Primjer polarne lokalizacije PIN7 proteina u stanicama stele i kolumele pomoću ekspresije *PIN7::GFP* reporter gena u korijenu klijanaca transgenične reporter linije uročnjaka dan je na slici 45. Analizom promjene ekspresije reporter gena *PIN7::GFP* mogu se uočiti statistički značajne razlike (slika 44 i slika 46). Nakon prvog dana tretmana ekspresija je kod tretmana s 25 μ M PVP-AgNP značajno veća u odnosu na kontrolu, ekspresija kod tretmana sa 100 μ M PVP-AgNP i 25 μ M AgNO₃ je manja u odnosu na kontrolu dok su ekspresije kod ostalih tretmana ostale jednake kontroli. Treći dan nakon tretmana, ekspresije reporter gena su kod tretmana s 25 μ M PVP-AgNP i 25 μ M AgNO₃ značajno veće u odnosu na kontrolu dok ekspresije na ostalim tretmanima ostaju jednake ekspresiji kontrole. Nakon petog dana tretmana, ekspresije reporter gena su u svim tretmanima značajno manje u odnosu na kontrolu. Nakon sedmog dana tretmana ekspresije

nakon svih promatranih tretmana ostaju jednake ekspresiji kontrole, izuzev 100 μM PVP-AgNP gdje je ekspresija manja u odnosu na kontrolu te tretmana s 50 μM AgNO_3 gdje je ekspresija reporter gena veća u odnosu na ekspresiju kontrole. Devetog dan tretmana, ekspresije nakon tretmana sa svim promatranim koncentracijama PVP-AgNP te s koncentracijom od 25 μM AgNO_3 su značajno manje u odnosu na kontrolu, dok je ekspresija kod tretmana s 50 i 100 μM AgNO_3 jednaka kontroli. Nakon jedanaest dana tretmana, kod svih tretmana ekspresije su značajno manje u odnosu na kontrolu, pri čemu su najniže vrijednosti uočene nakon tretmana s 25 i 100 μM PVP-AgNP te nakon tretmana s 25 μM AgNO_3 .

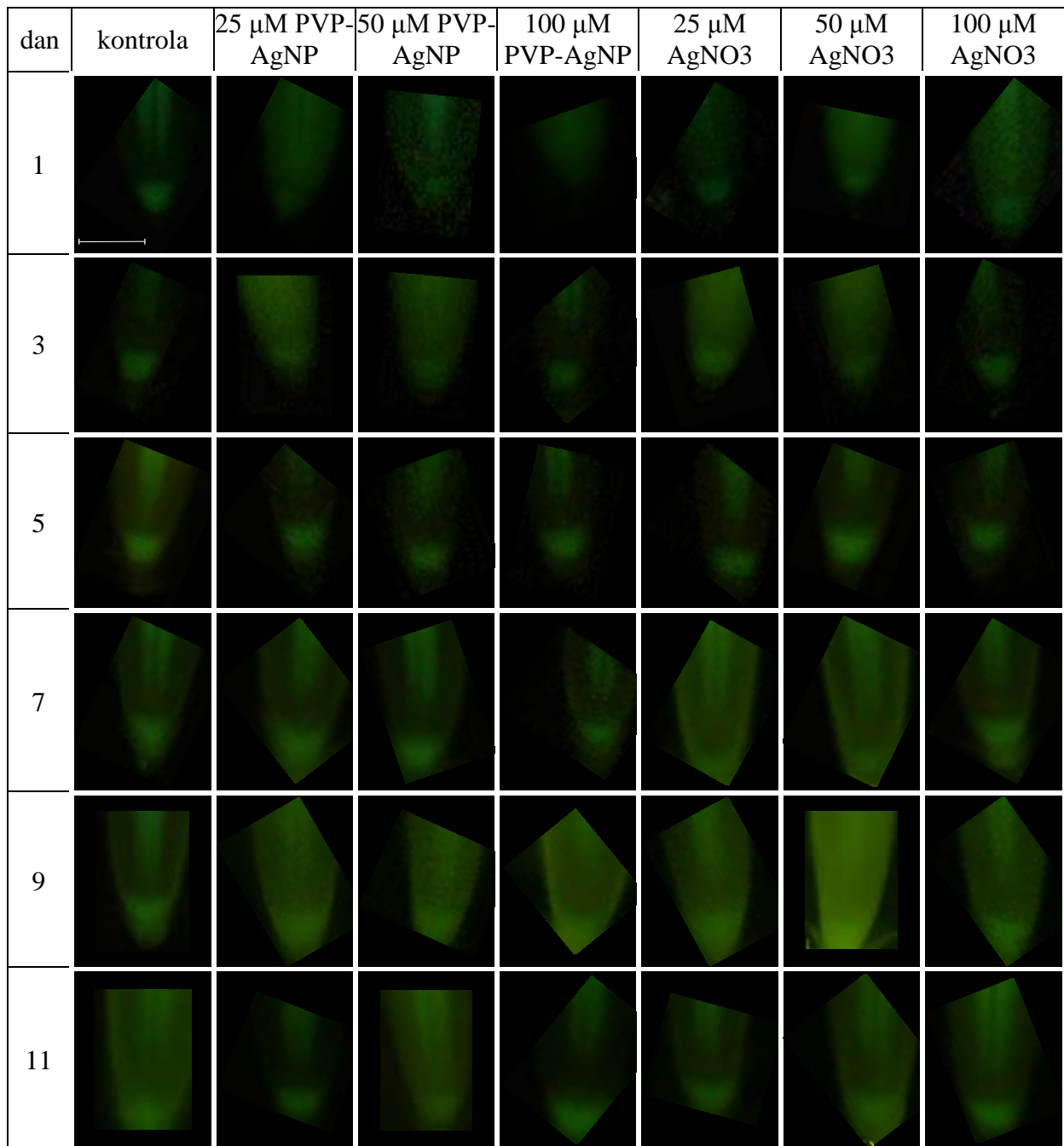
Praćenjem promjene ekspresije reporter gena *PIN7::GFP* po danima, može se vidjeti kako je kod tretmana s 25 μM PVP-AgNP ekspresija značajno manja nakon petog, sedmog, devetog i jedanaestog dana (Slika 38 i Slika 39). Kod tretmana s 50 μM PVP-AgNP može se uočiti kako je ekspresija značajno manja nakon petog, devetog i jedanaestog dana. Kod tretmana sa 100 μM PVP-AgNP ekspresija je značajno veća samo nakon trećeg, a značajno manja samo nakon jedanaestog dana. Analizom promjene ekspresije po danima na tretmanu s 25 μM AgNO_3 može se vidjeti kako je ekspresija značajno veća nakon trećeg i sedmog dana, a značajno manja nakon devetog i jedanaestog dana. Kod tretmana s 50 μM AgNO_3 , ekspresija je značajno veća nakon trećeg i sedmog, a značajno manja samo nakon jedanaestog dana. Na tretmanu sa 100 μM AgNO_3 , ekspresija reporter gena *PIN7::GFP* je značajno manja nakon petog i jedanaestog dana, a veća samo nakon sedmog dana tretmana.



Slika 44. Razina intenziteta ekspresije reporter gena *PIN7::GFP* u klijancima transgenične reporter linije nakon prvog, trećeg, petog, sedmog, devetog i jedanaestog dana tretmana na podlogama koje su sadržavale PVP-AgNP ili AgNO₃. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti relativnog intenziteta ekspresije u odnosu na kontrolni klijanac. Stupci unutar pojedinog promatranog dana označeni različitim malim tiskanim slovom statistički se značajno razlikuju unutar promatranog dana, a stupci određenih tretmana označeni različitim velikim tiskanim slovima se statistički značajno razlikuju između pojedinih dana ($p < 0,05$; Newman-Keuls test).



Slika 45. Prikaz lokalizacije ekspresije *PIN7::GFP* reporter gena u korijenu pomoću fluorescencijskog mikroskopa. A) fazno-kontrastna slika, B) prikaz fluorescencije *PIN7::GFP* reporter gena C) prikaz preklapljenih slika A) i B). Mjerilo prikazuje 100 μm.



Slika 46. Prikaz ekspresije *PIN7::GFP* u vrhovima korijena klijanaca transgenične reporter linije uročnjaka nakon prvog, trećeg i petog dana tretmana. Ekspresija *PIN1::GUS* reporter gena u vrhovima korijena kontrolnog klijanca, te klijanaca tretiranih s 25 μ M PVP-AgNP, 50 μ M PVP-AgNP, 100 μ M PVP-AgNP, 25 μ M AgNO₃, 50 μ M AgNO₃ i 100 μ M AgNO₃. Mjerilo prikazuje 100 μ m.

5. RASPRAVA

Nanočestice srebra su zbog svojih pozitivnih karakteristika sve češće prisutne u raznovrsnim komercijalnim proizvodima putem kojih se oslobađaju u okoliš te se sve više poteže pitanje njihovog utjecaja na okoliš. Tokom godina, mnoga istraživanja su se bavila utjecajem nanočestica, no pretežito su bila usmjerena na mikroorganizme, alge i životinje. Radi doprinosa novih znanstvenih spoznaja o utjecaju nanočestica srebra na biljke te na njihove mehanizme ispitao sam učinak nanočestica srebra stabiliziranih omotačem od polivinilpirolidona (PVP-AgNP) i utjecaj ionskog srebra (AgNO_3) na samu morfologiju biljke te na nakupljanje i transport auksina, jednog od najzastupljenijih biljnih hormona.

5.1. Stabilnost PVP-AgNP i ionskog srebra (AgNO_3)

Dobro je poznato da nanočestice srebra nisu stabilne molekule. U vodenim otopinama, pogotovo u otopinama koje sadrže veću količinu dvovalentnih kationa (Ca^{2+} i Mg^{2+}), AgNP agregiraju čime im se bitno mijenjaju svojstva (Zhang i sur., 2012). U sustavu *in vivo*, AgNP, zbog velikog omjera površine i volumena, dovode do bržeg i većeg otpuštanja iona srebra nego samo srebro, ali i do povećane formacije reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) (Reidy i sur., 2013; Flores-Lopez i sur., 2018).

Kako bih odredio njihovo ponašanje u korištenoj hranjivoj podlozi, nanočesticama srebra, ali i ionskom srebru (AgNO_3) unutar hranjive podloge odredio sam stabilnost. Može se vidjeti kako je pri nižim koncentracijama, koncentracija PVP-AgNP u hranjivoj podlozi stabilna već od prvog dana, dok je kod hranjive podloge s konačnom koncentracijom od 100 μM PVP-AgNP, koncentracija nanočestica rasla do sedmog dana, nakon koje je ostala stabilna. Pokazano je da kruta hranjiva podloga koja sadrži agar ima slabiju optičku čistoću od alternativa poput fitagela (Jaeger i sur., 2015). Objašnjenje za povećanje koncentracije PVP-AgNP u hranjivoj podlozi možemo pronaći u interakciji sa sastojcima hranjive podloge. Naime, hranjiva podloga sadrži mnogo raznolikih spojeva zaslužnih za rast klijanaca, no ti isti spojevi mogu reagirati s nanočesticama srebra. Povećanje apsorpcije PVP-AgNP u hranjivoj podlozi vjerojatno proizlazi iz interakcija sa spojevima unutar hranjive podloge. Naime, prilikom miješanja hranjive podloge i matične otopine PVP-AgNP, hranjiva podloga se sterilizira i otapa autoklaviranjem što joj značajno povisuje temperaturu. Povećana temperatura u početku utječe, vjerojatno, na povećanje reakcijske kinetike (Jiang i sur., 2010). Povećana reakcijska kinetika zatim potiče disocijaciju PVP-AgNP te asocijaciju s drugim spojevima u hranjivoj podlozi. Kako se apsorpcija mijenja drastično do trećeg dana, nakon kojeg se blago povećava, moguće je da disocirani spojevi PVP-AgNP unutar tri dana jako

reagiraju s drugim spojevima nakon kojih se njihova interakcija smanjuje čime se postiže sve stabilniji „peak“.

Suprotno tome, novonastale nanočestice srebra nakon dodavanja matične otopine ionskog srebra (AgNO_3) u hranjivu podlogu pokazuju veću početnu stabilnost. Naime, novonastale nanočestice su već nakon prvog dana dosegnule svoj maksimum te su zadržale stabilnost do sedmog dana tretmana nakon kojeg se koncentracija novonastalih čestica smanjuje u svim promatranim tretmanima. Navedena pojava se može ponovno objasniti interakcijom s hranjivom podlogom. Kako ionsko srebro nije stabilizirano, Ag^+ ioni mogu reagirati s raznim spojevima unutar hranjive podloge te, vjerojatno, unutar 24 sata izreagiraju tvoreći novonastale AgNP. Nakon sedmog dana vjerojatno ponovno dolazi do disocijacije novonastalih AgNP u Ag^+ ione te se apsorbancija novonastalih AgNP smanjuje.

Vizualizacija novonastalih nanočestica srebra u hranjivoj podlozi dodatna je potvrda kako slobodni Ag^+ ioni reagiraju sa spojevima iz hranjive podloge tvoreći nanočestice srebra. Kako bi se detaljnije okarakteriziralo navedeno povećanje apsorbancije PVP-AgNP u $\frac{1}{2}$ MS krutoj hranjivoj podlozi, moguće je ponoviti spektrofotometrijsko mjerenje s istim konačnim koncentracijama PVP-AgNP, ali u krutoj hranjivoj podlozi koja bi umjesto MS sadržavala krutu hranjivu podlogu pripremljenu u MiliQ vodi. Dakle, agar bi se pomiješao s MiliQ vodom umjesto s makro i mikroelementima MS hranjive podloge. Time bi se eliminirali spojevi inače prisutni u hranjivoj podlozi. Također, moglo bi se ponoviti spektrofotometrijsko mjerenje s istim koncentracijama PVP-AgNP, ali koristeći fitagel umjesto agara jer je pokazano da fitagel ima bolju optičku čistoću (Jaeger i sur., 2015).

5.2. Utjecaj PVP-AgNP i ionskog srebra (AgNO_3) na morfologiju

Istraživanje utjecaja nanočestica srebra na promatrani organizam povlači sa sobom temeljno pitanje mogu li nanočestice ući u organizam ili se zadržati na površini gdje mogu prouzročiti određeno oštećenje. Poznato je da je veličina jedna od glavnih ograničavajućih obilježja nanočestica za ulazak u organizam (Pérez-de-Luque, 2017). Naime, određeni organizmi, poput biljaka, bakterija i gljiva sadrže staničnu stijenku koja je selektivno propusna. Male molekule mogu proći kroz nju putem pora dok veće ne mogu (Fabrega i sur., 2011). Nekoliko radova je pokazalo da se nanočestice veličine 40-50 nm kreću stanicom te se u njoj i nakupljaju (González-Melendi i sur., 2008; Sabo-Attwood i sur., 2012; Taylor i sur., 2014). Lee i sur. (2007) pokazali su da nanočestice mogu proći kroz selektivno propusne

membrane. AgNP stabilizirane citratom prolaze kroz pore koriona embrija zebrice (*Danio rerio*), a u bakterije također ulaze lakoćom, kroz selektivno propusnu membranu (Fabrega et al., 2009).

Drugi način ulaska nanočestica unutar stanice je pomoću endocitoze gdje su nanočestice do 100 nm invaginacijom plazma membrane ubačene u stanice u obliku vezikula (Moore, 2006).

Također, razni stabilizirajući omotači utječu i mijenjaju svojstva adsorpcije i nakupljanja nanočestica u biljci (Judy i sur., 2012). Naime, nanočestice interagiraju s drugim spojevima u okolišu čime se bitno mijenjaju njihova svojstva za ulazak i nakupljanje unutar biljke (Pérez-de-Luque, 2017). Navarro i sur. (2008) su pokazali da organske tvari pronađene u tlu mogu povećati stabilnost nanočestica, ali i njihov unos u organizam, dok ioni soli mogu dovesti do precipitacije nanočestica te njihovo izbacivanje iz organizma. Zbog činjenice da je korijen biljke specijaliziran za apsorpciju hranjivih tvari i vode, vjerojatniji je i unos nanočestica u biljke kroz korijen u odnosu na druge dijelove biljke (Pérez-de-Luque, 2017).

Jednom kad nanočestice uđu u biljku one se mogu kretati apoplastom ili simplastom (Pérez-de-Luque, 2017). Ukoliko se kreću apoplastom, nanočestice prolaze kroz međustanični prostor, stanične stijenke te ksilem (Sattelmacher, 2001) dok simplastom prolaze kroz susjedne stanice putem plazmodezmija (Roberts i Oparka, 2003). Različitom načinom transporta, nanočestice mogu doprijeti do različitih biljnih dijelova. Poznavanjem načina kretanja nanočestica kroz biljku moguće je odrediti na koje biljne dijelove mogu imati određeni utjecaj. Doduše, Pate (1975) je pokazao da se nanočestice mogu lateralno kretati između ksilema i floema. Ukoliko nanočestice ne mogu prijeći staničnu stijenkicu te ući u stanicu one i dalje mogu djelovati na sam organizam (Fabrega i sur., 2011). Naime, nanočestice se mogu zadržati na površini stanice gdje može doći do otpuštanja Ag^+ iona što nadalje može dovesti do njihovog brzog unosa u stanicu (Liu i Hurt, 2010).

Ja sam u svome radu pokazao da PVP-AgNP ulaze u vršak korijena klijanaca već nakon prvog dana tretmana te se kreću međustaničnim prostorom te se nalaze i u staničnoj stijenci. Duljim tretiranjem biljke pokazao sam da se količina PVP-AgNP povećava u vršku korijena, ali se nalaze i u stanicama korijenove kape. Povećanje količine vizualiziranih čestica slično je rezultatu nakupljanja AgNP u drugim biljnim vrstama (Lee i sur, 2012; Zuverzamen i sur., 2016). TEM-om nisam uspio pokazati da nanočestice ulaze u stanice, no ni Lee i sur. (2007) nisu uspjeli vizualizirati AgNP unutar stanice, iako su vizualizirali ulazak

nanočestica kroz pore koriona zebrice te su nanočestice pronađene unutar razvijajućih organa embrija. Pokazao sam da ionsko srebro (AgNO_3) u hranjivoj podlozi stvara nanočestice srebra u velikom broju. Isto kao i PVP-AgNP, novonastale nanočestice srebra ulaze u stanice vršaka korijena. Novonastale AgNP se najvjerojatnije kreću apoplastom te ih nisam uspio vizualizirati i lokalizirati unutar samih stanica. Povećanjem broja dana tretmana količina vizualiziranih novonastalih AgNP je manja na vršku korijena u odnosu na tretman s PVP-AgNP što je vjerojatno posljedica toga što novonastale nanočestice nisu toliko stabilne kao nanočestice stabilizirane PVP-om. Nadalje, isto kao i kod tretmana s PVP-AgNP, nakon trećeg dana tretmana s AgNO_3 vizualizirao sam novonastale AgNP i u korijenovoj kapi. PVP-AgNP i novonastale AgNP primijećene su u korijenovoj kapi tek nakon trećeg dana tretmana vjerojatno jer stanice korijenove kape nisu specijalizirane kao epidermalne za apsorpciju hranjivih tvari.

Kako sam pokazao da AgNP ulaze u korijen potrebno je analizirati i njihov utjecaj na strukturu te ultrastrukturu. Mnogo radova je pokazalo da se nakon tretmana s nanočesticama srebra bitno mijenja morfologija tretiranih biljaka. Yiang i sur. (2012) su pokazali da AgNP smanjuje biomasu biljke, inhibira rast te dovodi do odumiranja i odvajanja korijena kod barske leće (*Spirodela polyrhiza*). Slično tome, pokazano je da AgNP inhibiraju klijanje sjemenki te također smanjuju biomasu tikvice (*Cucurbita pepo*) (Stampoulis i sur., 2009). Također, Vishwakarma i sur. (2017) su pokazali da AgNP dovode do oksidativnog stresa te smanjuju rast klijanaca gorušice (*Brassica* sp.). Ja sam u svome radu pokazao da se djelovanjem PVP-AgNP, ali i s ionskim srebrom (AgNO_3) duljina korijena smanjuje u odnosu na kontrolni korijen klijanca ovisno o koncentraciji tretmana. Pri svim tretmanima, duljina korijena klijanaca uročnjaka se smanjila. Slično su Nair i Chung (2014) pokazali da AgNP značajno smanjuju elongaciju korijena u riži (*Oryza sativa*). Kaveh i sur. (2013) su u svojem istraživanju pokazali da AgNP u većim koncentracijama (5 do 20 mg/L) smanjuje biomasu uročnjaka. Analizom duljine korijena uročnjaka nakon tretmana s PVP-AgNP i ionskim srebrom (AgNO_3) konačnih koncentracija 25, 50 i 100 μM , pokazao sam da smanjenje rasta ovisi o koncentraciji nanočestica u hranjivoj podlozi. Naime, duljina korijena klijanaca se značajno smanjila pri svim testiranim koncentracijama PVP-AgNP i ionskog srebra pri čemu je najznačajnije smanjenje duljine korijena bilo kod klijanaca tretiranih s 50 μM PVP-AgNP i ionskim srebrom (AgNO_3). Naime, pri koncentraciji od 50 μM PVP-AgNP i ionskog srebra (AgNO_3) korijeni klijanaca su značajno kraći u odnosu na korijene klijanaca na ostalim tretmanima, ali i u odnosu na kontrolne klijance. Analizom prirasta, odnosno brzine rasta

korijena, također sam pokazao da je brzina rasta korijena svih tretiranih klijanca manja u odnosu na kontrolu pri čemu je najznačajnije smanjenje brzine rasta korijena vidljivo kod klijanca tretiranih s 50 μM PVP-AgNP i ionskim srebrom (AgNO_3). Ovisnost smanjenja duljine korijena o koncentraciji AgNP su pokazali i Dimkpa i sur. (2013) na pšenici (*Triticum aestivum* L.) te Qian i sur. (2013) na klijancima uročnjaka (*Arabidopsis thaliana*).

S druge strane, Cvjetko i sur. (2017) su pokazali da na tretmanu s PVP-AgNP nije došlo do značajnog smanjenja korijena luka (*Allium cepa*) u odnosu na kontrolu pri svim promatranim koncentracijama (25, 50, 75 i 100 μM). Suprotno, pokazali su da je na tretmanu s CTAB-AgNP, ali i na tretmanu s ionskim srebrom (AgNO_3) došlo do značajnog smanjenja korijena klijanaca pri većim koncentracijama (75 i 100 μM) u odnosu na kontrolne klijance. Također, pokazano je da je odgovor biljke na AgNP drugačiji ukoliko su AgNP u hranjivoj podlozi ili zemlji (Lee i sur., 2012). Prema svim rezultatima može se vidjeti kako AgNP i ionsko srebro (AgNO_3) imaju drugačiji utjecaj na duljine korijena biljke ovisno o vrsti biljke, koncentraciji samog tretmana, ali i vrsti podloge u kojemu se vrši tretman biljke.

Jedan od načina analize fitotoksičnosti AgNP na biljke na fiziološkoj razini je promatranjem struktura i ultrastruktura stanica. Naime, kako AgNP mogu ući u stanice, potrebno je bilo i pogledati utječu li na samu strukturu i ultrastrukturu stanica. Yin i sur. (2011) su pokazali da AgNP i ionsko srebro negativno djeluju na stanice ljulja (*Lolium multiflorum*) oštećenjem stanica korijenove kape i epiderme. Također je pokazano da AgNP mogu smanjiti turgor, a time i volumen vakuole, pa iz tog razloga i veličinu stanica kukuruza (*Zea mays* L.) i kupusa (*Brassica oleracea*) (Pokhrel i Dubey, 2013; Tripathi i sur., 2017a). Nadalje, AgNP i ionsko srebro dovode do stanične smrti stanica kore korijena čime dolazi i do promijenjenog gravitropizma. Pokazano je da AgNP mogu utjecati na fluidnost i propusnost staničnih membrana, čime se smanjuje unos vode i hranjivih tvari u biljku (Yan i Schen 2019; Zuverza-mena i sur., 2016).

Ja u svome radu nisam pronašao nikakve značajne promjene u strukturi i ultrastrukturi vrška korijena uročnjaka nakon tretmana sa svim promatranim koncentracija PVP-AgNP ili AgNO_3 . To je vjerojatno rezultat nedovoljno velikih koncentracija tretmana, ali i samog oblika čestica. Naime, Syu i sur. (2014) su pokazali da nanočestice srebra različitih veličina, ali i oblika uzrokuju drugačiji morfološki odgovor uročnjaka.

Kako su kloroplasti veoma značajni za rast i razvoj biljke bilo je potrebno analizirati i njihovu strukturu i ultrastrukuru. Tripathi i sur. (2017b) su pokazali da nanočestice srebra

moгу poremetiti sintezu klorofila u listovima te tako utjecati na samu fotosintezu biljke. Drugo istraživanje je pokazalo da se AgNP nakupljaju u listovima uročnjaka te narušavaju strukturu tilakoidne membrane te smanjuju sadržaj klorofila što vodi usporavanju rasta biljke (Qian i sur., 2013).

Analizom strukture i ultrastrukture kloroplasta kotiledona nisam pronašao razlike u strukturi kloroplasta nakon prvog dana tretmana sa 100 μM PVP-AgNP ili AgNO_3 u odnosu na kontrolu. Nakon jedanaestog dana može se vidjeti kako tretman sa 100 μM AgNO_3 utječe na strukturu tilakoidnog sustava kloroplasta gdje se mogu vidjeti i brojni te veći plastoglobuli u odnosu na plastoglobule kloroplasta kotiledona kontrolnih klijanaca i kloroplasta kotiledona klijanaca tretiranih sa 100 μM PVP-AgNP. Navedeno narušavanje tilakoidnog sustava je u skladu s rezultatima koje su objavili Liang i sur. (2018) gdje su primijećene promjene u tilakoidnom sustavu nakon djelovanja AgNP. Razlike u tilakoidnom sustavu su vjerojatno primijećene samo nakon tretmana s AgNO_3 zbog toga što novonastale AgNP iz ionskog srebra (AgNO_3) nemaju stabilizirajući omotač te vjerojatno imaju veći negativni efekt na kloroplaste.

5.3. Analiza transporta i nakupljanja auksina nakon tretmana s PVP-AgNP te ionskim srebrom (AgNO_3)

Analiza promjene biljnih hormona je još jedan način pomoću kojeg se može istražiti fitotoksični utjecaj AgNP (Yan i Chen, 2019). Vinković i sur. (2017) su pokazali da nakupljanje AgNP u tkivu paprike (*Capsicum annuum* L.) dovodi do značajnog porasta razine citokinina. Time su pokazali da citokinini imaju ulogu u odgovoru biljke na stres uzrokovan AgNP (Yan i Chen, 2019). Wang i sur. (2017) su pokazali kako AgNP, točnije $\text{Ag}_2\text{S-NP}$ može djelovati na rast biljke putem utjecaja na signalni put etilena. Naime, utvrdili su da je nakon djelovanja AgNP, ekspresija šest gena uključenih u signalni put etilena bila smanjena u krastavcu (*Cucumis sativus*) i u pšenici (*Triticum aestivum* L.). Sun i sur. (2017) su pokazali da je gravitropizam korijena narušen djelovanjem AgNP te da je to narušavanje ovisno o primijenjenoj koncentraciji nanočestica srebra. Također, pokazali su da je tretman s AgNP smanjio nakupljanje auksina u biljci uročnjaka, čime je i smanjena ekspresija gena ovisnih o auksinu.

Naime, kako je auksin jedan od važnijih biljnih hormona koji preko gena ovisnih o auksinu indirektno utječe na brojne važne metaboličke procese pa samim time na rast i razvoj

biljke, bilo je potrebno analizirati i njegovu akumulaciju i transport unutar vrha korijena nakon tretmana s PVP-AgNP i ionskim srebrom (AgNO_3).

U mome radu sam pokazao kako se ekspresija reporter gena *PIN1::GUS* i *PIN7::GUS* mijenja tokom promatranog vremena u odnosu na kontrolni, netretirani klijanac. Naime, pratio sam transport auksina obilježenog s GUS reporter genom u vršku korijena uročnjaka. Nakon prvog dana nisam primijetio nikakvu razliku, no ekspresija reporter gena se povećala na tretmanima sa 100 μM koncentracijama PVP-AgNP i AgNO_3 već nakon trećeg dana. Time se može reći kako se i transport auksina povećao nakon trećeg dana na navedenim tretmanima u odnosu na kontrolni klijanac u vršku korijena. Nakon devetog dana može se vidjeti kako je do povećanog transporta auksina došlo samo kod tretmana s ionskim srebrom (AgNO_3) te s najvećom koncentracijom PVP-AgNP. Slično tome, pokazao sam da se ekspresija reporter gena *PIN7::GUS*, odnosno transport auksina ne mijenja, ili se smanjuje do sedmog dana kod svih tretmana. Tek nakon sedmog dana moguće je vidjeti kako se ekspresija *PIN7::GUS* reporter gena, odnosno transport auksina povećao u odnosu na kontrolu kod svih tretmana, izuzev 100 μM koncentracije AgNO_3 . Slično povećanje transporta auksina primijetio sam i nakon devetog dana tretmana gdje se povećala ekspresija *PIN7::GUS* gena samo kod tretmana s ionskim srebrom (AgNO_3) te s najvećom promatranom koncentracijom PVP-AgNP (100 μM) što je jednako kao pri praćenju transporta auksina pomoću *PIN1::GUS* reporter gena.

Razlika u povećanju ekspresije nakon trećeg dana kod praćenja *PIN1::GUS* te nakon sedmog dana kod praćenja *PIN7::GUS* reporter gena može se objasniti time što PIN1 i PIN7 imaju drugačiju lokalizaciju unutar vrška korijena. Naime, PIN1 protein vodi auksin kroz koru korijena do mirujućeg centra dok PIN7 ima glavnu ulogu u gravitropizmu u stanicama korijenove kape. Iako postoje razlike u ekspresiji navedenih reporter gena u početku tretmana, nakon jedanaestog dana tretmana pokazao sam da se ekspresija oba reporter gena povećava, odnosno da se auksin akumulira u klijancima tretiranim najvećim koncentracijama PVP-AgNP i AgNO_3 .

Praćenjem ekspresije *PIN1::GFP* reporter gena pokazao sam ponovno promjene u transportu auksina. Time sam pokazao da se transport do devetog dana tretmana mijenja samo nakon prvog dana na najnižoj promatranj koncentraciji PVP-AgNP (25 μM) te nakon petog dana na najvećoj promatranj koncentraciji ionskog srebra (AgNO_3) (100 μM). Tek nakon jedanaestog dana tretmana, ekspresija reporter gena *PIN1::GFP* se statistički značajno blago povećava na tretmanu s 25 μM AgNO_3 što upućuje da se transport blago pojačao. Praćenjem promjene transporta auksina pomoću promjene *PIN7::GFP* reporter gena pokazao sam da se

transport auksina povećao u odnosu na kontrolu nakon prvog i trećeg dana tretmana s 25 μM PVP-AgNP te nakon trećeg dana tretmana s 25 μM AgNO_3 . Jedino statistički značajno povećanje u odnosu na kontrolu je još bilo vidljivo nakon sedmog dana tretmana s 50 μM AgNO_3 . Svi ostali tretmani pokazali su ili jednaki ili smanjeni transport auksina u odnosu na kontrolu. Praćenjem promjene transporta auksina pomoću promjene *PIN7:GFP* reporter gena pokazao sam kako se transport auksina kod tretiranih klijanaca značajno smanjio u odnosu na kontrolu nakon jedanaestog dana tretmana.

Praćenjem *DR5::GFP* ekspresije pratio sam nakupljanje auksina u vršku korijena. Time sam pokazao da se akumulacija auksina povećala u odnosu na kontrolu nakon prvog dana na tretmanu s 50 μM PVP-AgNP. Blago povećanje u odnosu na kontrolu vidljivo je i nakon petog dana na najvećoj koncentraciji ionskog srebra (AgNO_3). Najveća povećanja akumulacije auksina u odnosu na kontrolu vidljiva su nakon jedanaestog dana na tretmanima s 50 i 100 μM PVP-AgNP.

Uočene promjene u transportu auksina, ali i u nakupljanju mogu se objasniti kao mehanizam obrane od prisutnosti srebra kao stresnog uvjeta. Naime, navedeno povećanje transporta auksina praćenjem proteina PIN1 i PIN7 može se objasniti zbog velikog stresa prouzročenog velikim koncentracijama PVP-AgNP i ionskog srebra (AgNO_3). Pokazano je da je prekomjernom ekspresijom PIN1 proteina, koji dovodi auksin do korijena, porasla i količina auksina u korijenu čime se povećala i otpornost biljke na razne okolišne stresne uvjete (Li i sur., 2018). Naime, pokazano je da je jedan od mehanizama povećanja otpornosti na sušu te na oksidativni stres kod uročnjaka upravo povećanje količine auksina, a samim time i povećana ekspresija gena ovisnih o auksinu (Cha i sur., 2015; Ke i sur., 2015).

U zadnjih nekoliko godina sve se više istražuje utjecaj pojedinih nanočestica na različite fitohormone. Kako bi se detaljnije okarakterizirao utjecaj nanočestica srebra na biljku, a samim time i na mehanizme kojim se biljka brani od stresa prouzrokovanog AgNP, trebali bi se analizirati geni, odnosno proteini ovisni o raznim, metabolički važnim biljnim hormonima, poput auksina, citokinina, giberelina i sl. Uz to trebala bi se analizirati i možebitna promjena lokalizacije, interakcije i funkcije određenih proteina i hormona unutar same biljke.

6. ZAKLJUČAK

- Ionsko srebro (AgNO_3) u krutoj MS hranjivoj podlozi stvara nanočestice srebra koje se stabiliziraju već nakon trećeg dana tretmana, nakon kojega intenzitet apsorbancije novonastalih AgNP polako pada.
- PVP-AgNP se u krutoj MS hranjivoj podlozi stabiliziraju tek nakon osmog dana, nakon kojeg nema promjene u intenzitetu apsorbancije sve do jedanaestog dana
- Duljina korijena se smanjila na tretmanu s PVP-AgNP i novonastalim AgNP pri čemu je najznačajnije smanjenje uočeno na tretmanu s $50 \mu\text{M}$ PVP-AgNP svih dana tijekom tretmana, a na tretmanu s $50 \mu\text{M}$ AgNO_3 nakon jedanaestog dana tretmana.
- PVP-AgNP i novonastale AgNP lokalizirane su u korijenovoj kapi, međustaničnom prostoru i staničnoj stijenci vrška korijena uročnjaka.
- Nisu zamijećene promjene u strukturi i ultrastrukturi korijena i kotiledona.
- Uočena je narušena struktura tilakoidnih membrana te veći plastoglobuli u kloroplastima klijanaca nakon jedanaest dana tretmana sa $100 \mu\text{M}$ AgNO_3 u odnosu na kontrolu i $100 \mu\text{M}$ PVP-AgNP.
- Kod svih tretmana uočena je promjena u akumulaciji i transportu auksina ovisna o koncentraciji i trajanju tretmana što upućuje da se biljka prilagođavala na stres uzrokovan AgNP.

7. LITERATURA

- Ahlberg, S., Antonopoulos, A., Diendorf, J., Dringen, R., Epple, M., Flöck, R., Goedecke, W., Graf, C., Haberl, N., Helmlinger, J., Herzog, F., Heuer, F., Hirn, S., Johannes, C., Kittler, S., Köller, M., Korn, K., Kreyling, W., Krombach, F., Lademann, J., Loza, K., Luther, E., Malissek, M., Meinke, M., Nordmeyer, D., Pailliart, A., Raabe, J., Rancan, F., Rothen-Rutishauser, B., Rühl, E., Schleh, C., Seibel, A., Sengstock, C., Treuel, L., Vogt, A., Weber, K. i Zellner, R. (2014). PVP-coated, negatively charged silver nanoparticles: a multi-center study of their physicochemical characteristics, cell culture and in vivo experiments. *Beilstein Journal of Nanotechnology*, 5, pp.1944-1965.
- Buer, C. i Muday, G. (2004). The transparent testa4 mutation prevents flavonoid synthesis and alters auxin transport and the response of Arabidopsis roots to gravity and light. *The Plant Cell*, 16(5), pp.1191-1205.
- Cha, J., Kim, W., Kang, S., Kim, J., Baek, D., Jung, I., Kim, M., Li, N., Kim, H., Nakajima, M., Asami, T., Sabir, J., Park, H., Lee, S., Bohnert, H., Bressan, R., Pardo, J. i Yun, D. (2015). A novel thiol-reductase activity of Arabidopsis YUC6 confers drought tolerance independently of auxin biosynthesis. *Nature Communications*, 6(1).
- Chen, C., Wang, F., Wen, S., Su, Q., Wu, M., Liu, Y., Wang, B., Li, D., Shan, X., Kianinia, M., Aharonovich, I., Toth, M., Jackson, S., Xi, P. i Jin, D. (2018). Multi-photon near-infrared emission saturation nanoscopy using upconversion nanoparticles. *Nature Communications*, 9(1).
- Chen, Y., Yordanov, Y., Ma, C., Strauss, S. i Busov, V. (2013). DR5 as a reporter system to study auxin response in Populus. *Plant Cell Reports*, 32(3), pp.453-463.
- Cvjetko, P., Milošić, A., Domijan, A., Vinković Vrček, I., Tolić, S., Peharec Štefanić, P., Letofsky-Papst, I., Tkalec, M. i Balen, B. (2017). Toxicity of silver ions and differently coated silver nanoparticles in *Allium cepa* roots. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 137, pp.18-28.
- Dimkpa, C., McLean, J., Martineau, N., Britt, D., Haverkamp, R. i Anderson, A. (2013). Silver nanoparticles disrupt wheat (*Triticum aestivum* L.) growth in a sand matrix. *Environmental Science & Technology*, 47(2), pp.1082-1090.
- Ding, Y., Lv, J., Shi, Y., Gao, J., Hua, J., Song, C., Gong, Z. i Yang, S. (2018). EGR 2 phosphatase regulates OST 1 kinase activity and freezing tolerance in Arabidopsis. *The EMBO Journal*, 38(1).

- Enstone, D., Peterson, C. i Ma, F. (2002). Root endodermis and exodermis: structure, function, and responses to the environment. *Journal of Plant Growth Regulation*, 21(4), pp.335-351.
- Fabrega, J., Luoma, S., Tyler, C., Galloway, T. i Lead, J. (2011). Silver nanoparticles: behaviour and effects in the aquatic environment. *Environment International*, 37(2), pp.517-531.
- Fabrega, J., Renshaw, J. i Lead, J. (2009). Interactions of silver nanoparticles with *Pseudomonas putida* biofilms. *Environmental Science & Technology*, 43(23), pp.9004-9009.
- Feraru, E. i Friml, J. (2008). PIN polar targeting. *Plant Physiology*, 147(4), pp.1553-1559.
- Fleger, Y. i Rosenbluh, M. (2009). Surface plasmons and surface enhanced raman spectra of aggregated and alloyed gold-silver nanoparticles. *Research Letters in Optics*, 2009, pp.1-5.
- Flores-López, L., Espinoza-Gómez, H. i Somanathan, R. (2018). Silver nanoparticles: electron transfer, reactive oxygen species, oxidative stress, beneficial and toxicological effects. Mini review. *Journal of Applied Toxicology*, 39(1), pp.16-26.
- Fredrich, J. (1999). 3D imaging of porous media using laser scanning confocal microscopy with application to microscale transport processes. *Physics and Chemistry Of The Earth, Part A: Solid Earth And Geodesy*, 24(7), pp.551-561.
- González-Melendi, P., Fernández-Pacheco, R., Coronado, M., Corredor, E., Testillano, P., Risueño, M., Marquina, C., Ibarra, M., Rubiales, D. i Pérez-de-Luque, A. (2007). Nanoparticles as smart treatment-delivery systems in plants: assessment of different techniques of microscopy for their visualization in plant tissues. *Annals of Botany*, 101(1), pp.187-195.
- Jaeger, P., McElfresh, C., Wong, L. i Ideker, T. (2015). Beyond agar: gel substrates with improved optical clarity and drug efficiency and reduced autofluorescence for microbial growth experiments. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(16), pp.5639-5649.

- Yiang, H., Li, M., Chang, F., Li, W. i Yin, L. (2012). Physiological analysis of silver nanoparticles and AgNO₃ toxicity to *Spirodela polyrhiza*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 31(8), pp.1880-1886.
- Jiang, X., Chen, W., Chen, C., Xiong, S. i Yu, A. (2010). Role of temperature in the growth of silver nanoparticles through a synergetic reduction approach. *Nanoscale Research Letters*.
- Judy, J., Unrine, J., Rao, W., Wirick, S. i Bertsch, P. (2012). bioavailability of gold nanomaterials to plants: importance of particle size and surface coating. *Environmental Science & Technology*, 46(15), pp.8467-8474.
- Kaveh, R., Li, Y., Ranjbar, S., Tehrani, R., Brueck, C. i Van Aken, B. (2013). Changes in *Arabidopsis thaliana* gene expression in response to silver nanoparticles and silver ions. *Environmental Science & Technology*, 47(18), pp.10637-10644.
- Ke, Q., Wang, Z., Ji, C., Jeong, J., Lee, H., Li, H., Xu, B., Deng, X. i Kwak, S. (2015). Transgenic poplar expressing Arabidopsis YUCCA6 exhibits auxin-overproduction phenotypes and increased tolerance to abiotic stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, 94, pp.19-27.
- Keogh, C. (2007). Fluorescence lifetime imaging (FLIM) on a spectral confocal microscope. *Imaging & Microscopy*, 9(2), pp.70-71.
- Kim, J., Kuk, E., Yu, K., Kim, J., Park, S., Lee, H., Kim, S., Park, Y., Park, Y., Hwang, C., Kim, Y., Lee, Y., Jeong, D. i Cho, M. (2007). Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 3(1), pp.95-101.
- Lee, K., Nallathamby, P., Browning, L., Osgood, C. i Xu, X. (2007). In vivo imaging of transport and biocompatibility of single silver nanoparticles in early development of zebrafish embryos. *ACS Nano*, 1(2), pp.133-143.
- Lee, W., Kwak, J. i An, Y. (2012). Effect of silver nanoparticles in crop plants *Phaseolus radiatus* and *Sorghum bicolor*: media effect on phytotoxicity. *Chemosphere*, 86(5), pp.491-499.

- Levard, C., Hotze, E., Lowry, G. i Brown, G. (2012). Environmental transformations of silver nanoparticles: impact on stability and toxicity. *Environmental Science & Technology*, 46(13), pp.6900-6914.
- Li, Z., Zhang, X., Zhao, Y., Li, Y., Zhang, G., Peng, Z. i Zhang, J. (2017). Enhancing auxin accumulation in maize root tips improves root growth and dwarfs plant height. *Plant Biotechnology Journal*, 16(1), pp.86-99.
- Liang, L., Tang, H., Deng, Z., Liu, Y., Chen, X. i Wang, H. (2018). Ag nanoparticles inhibit the growth of the bryophyte, *Physcomitrella patens*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 164, pp.739-748.
- Liu, J. i Hurt, R. (2010). Ion release kinetics and particle persistence in aqueous nano-silver colloids. *Environmental Science & Technology*, 44(6), pp.2169-2175.
- Lodish, H., Berk, A., Lawrence Zipursky, S., Matsudaira, P., Baltimore, D. i Darnell, J. (2000). *Molecular cell biology*. 4th ed. New York: W.H. Freeman, Section 5.1, Microscopy and Cell Architecture.
- Moore, M. (2006). Do nanoparticles present ecotoxicological risks for the health of the aquatic environment?. *Environment International*, 32(8), pp.967-976.
- Nair, P. i Chung, I. (2014). Assessment of silver nanoparticle-induced physiological and molecular changes in *Arabidopsis thaliana*. *Environmental Science and Pollution Research*, 21(14), pp.8858-8869.
- Navarro, E., Baun, A., Behra, R., Hartmann, N., Filser, J., Miao, A., Quigg, A., Santschi, P. i Sigg, L. (2008). Environmental behavior and ecotoxicity of engineered nanoparticles to algae, plants, and fungi. *Ecotoxicology*, 17(5), pp.372-386.
- Nilapwar, S., Nardelli, M., Westerhoff, H. i Verma, M. (2011). Absorption spectroscopy. *Methods in Enzymology*, pp.59-75.
- Pate, J.S. (1975). Exchange of solutes between phloem and xylem and circulation in the whole plant. U *Encyclopedia of Plant Physiology Vol. 1, Transport In Plants, Phloem Transport*, eds., M.H. Zimmerman i J.A. Milburn. Springer-Verlag, Berlin, pp.451-473.

- Peharec Štefanić, P., Koffler, T., Adler, G. i Bar-Zvi, D. (2013). Chloroplasts of salt-grown arabidopsis seedlings are impaired in structure, genome copy number and transcript levels. *PLoS ONE*, 8(12), p.e82548.
- Pérez-de-Luque, A. (2017). Interaction of nanomaterials with plants: what do we need for real applications in agriculture? *Frontiers in Environmental Science*, 5.
- Pokhrel, L. i Dubey, B. (2013). Evaluation of developmental responses of two crop plants exposed to silver and zinc oxide nanoparticles. *Science of the Total Environment*, 452-453, pp.321-332.
- Qian, H., Peng, X., Han, X., Ren, J., Sun, L. i Fu, Z. (2013). Comparison of the toxicity of silver nanoparticles and silver ions on the growth of terrestrial plant model *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Environmental Sciences*, 25(9), pp.1947-1956.
- Qian, H., Peng, X., Han, X., Ren, J., Sun, L. i Fu, Z. (2013). Comparison of the toxicity of silver nanoparticles and silver ions on the growth of terrestrial plant model *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Environmental Sciences*, 25(9), pp.1947-1956.
- Rapała, M., Pluciński, B. i Jedynek, P. (2017). The effect of bisphenol A on growth, pigment composition and photosystem II activity of *Arabidopsis thaliana*. *Acta Biochimica Polonica*, 64(3), pp.407-413.
- Reidy, B., Haase, A., Luch, A., Dawson, K. i Lynch, I. (2013). Mechanisms of silver nanoparticle release, transformation and toxicity: a critical review of current knowledge and recommendations for future studies and applications. *Materials*, 6(6), pp.2295-2350.
- Reynolds, E. (1963). The use of lead citrate at high ph as an electron-opaque stain in electron microscopy. *The Journal of Cell Biology*, 17(1), pp.208-212.
- Roberts, A. i Oparka, K. (2003). Plasmodesmata and the control of symplastic transport. *Plant, Cell and Environment*, 26(1), pp.103-124.
- Sabo-Attwood, T., Unrine, J., Stone, J., Murphy, C., Ghoshroy, S., Blom, D., Bertsch, P. i Newman, L. (2011). Uptake, distribution and toxicity of gold nanoparticles in tobacco (*Nicotiana xanthi*) seedlings. *Nanotoxicology*, 6(4), pp.353-360.
- Saqib, N. i Rahim, M. (2015). Toxicity of silver nanoparticles. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 29(1), pp.2154-2160.

- Sattelmacher, B. (2001). The apoplast and its significance for plant mineral nutrition. *New Phytologist*, 149(2), pp.167-192.
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J., White, D., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P. i Cardona, A. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*, 9(7), pp.676-682.
- Scimeca, M., Bischetti, S., Lamsira, H., Bonfiglio, R. i Bonanno, E. (2018). Energy Dispersive X-ray (EDX) microanalysis: a powerful tool in biomedical research and diagnosis. *European Journal of Histochemistry*.
- Scimeca, M., Feola, M., Romano, L., Rao, C., Gasbarra, E., Bonanno, E., Brandi, M. i Tarantino, U. (2016). Heavy metals accumulation affects bone microarchitecture in osteoporotic patients. *Environmental Toxicology*, 32(4), pp.1333-1342.
- Scimeca, M., Orlandi, A., Terrenato, I., Bischetti, S. i Bonanno, E. (2014). Assessment of metal contaminants in non-small cell lung cancer by EDX microanalysis. *European Journal of Histochemistry*, 58(3).
- Sharon, Madhuri & Choudhary, A.K. & Kumar, R.. (2010). Nanotechnology in agricultural diseases and food safety. *Journal of Phytology*, 2, pp.83-92.
- Stampoulis, D., Sinha, S. i White, J. (2009). Assay-dependent phytotoxicity of nanoparticles to plants. *Environmental Science & Technology*, 43(24), pp.9473-9479.
- Sun, J., Wang, L., Li, S., Yin, L., Huang, J. i Chen, C. (2017). Toxicity of silver nanoparticles to *Arabidopsis*: inhibition of root gravitropism by interfering with auxin pathway. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 36(10), pp.2773-2780.
- Syu, Y., Hung, J., Chen, J. i Chuang, H. (2014). Impacts of size and shape of silver nanoparticles on *Arabidopsis* plant growth and gene expression. *Plant Physiology and Biochemistry*, 83, pp.57-64.
- Taylor, A., Rylott, E., Anderson, C. i Bruce, N. (2014). Investigating the toxicity, uptake, nanoparticle formation and genetic response of plants to gold. *PLoS ONE*, 9(4), p.e93793.

- Tejamaya, M., Römer, I., Merrifield, R. i Lead, J. (2012). Stability of citrate, PVP, and PEG coated silver nanoparticles in ecotoxicology media. *Environmental Science & Technology*, 46(13), pp.7011-7017.
- Thorn, K. (2016). A quick guide to light microscopy in cell biology. *Molecular Biology of the Cell*, 27(2), pp.219-222.
- Tripathi, D., Singh, S., Singh, S., Pandey, R., Singh, V., Sharma, N., Prasad, S., Dubey, N. i Chauhan, D. (2017a). An overview on manufactured nanoparticles in plants: uptake, translocation, accumulation and phytotoxicity. *Plant Physiology and Biochemistry*, 110, pp.2-12.
- Tripathi, D., Tripathi, A., Singh, S., Singh, Y., Vishwakarma, K., Yadav, G., Sharma, S., Singh, V., Mishra, R., Upadhyay, R., Dubey, N., Lee, Y. i Chauhan, D. (2017b). Uptake, accumulation and toxicity of silver nanoparticle in autotrophic plants, and heterotrophic microbes: a concentric review. *Frontiers in Microbiology*, 08.
- Ulmasov, T., Hagen, G. i Guilfoyle, T. (1997). ARF1, a transcription factor that binds to auxin response elements. *Science*, 276(5320), pp.1865-1868.
- Vinković, T., Novák, O., Strnad, M., Goessler, W., Jurašin, D., Paradiković, N. i Vrček, I. (2017). Cytokinin response in pepper plants (*Capsicum annuum* L.) exposed to silver nanoparticles. *Environmental Research*, 156, pp.10-18.
- Vishwakarma, K., Shweta, Upadhyay, N., Singh, J., Liu, S., Singh, V., Prasad, S., Chauhan, D., Tripathi, D. i Sharma, S. (2017). Differential phytotoxic impact of plant mediated silver nanoparticles (AgNPs) and silver nitrate (AgNO₃) on *Brassica sp.* *Frontiers in Plant Science*, 8.
- Wang, P., Lombi, E., Sun, S., Scheckel, K., Malysheva, A., McKenna, B., Menzies, N., Zhao, F. i Kopittke, P. (2017). Characterizing the uptake, accumulation and toxicity of silver sulfide nanoparticles in plants. *Environmental Science: Nano*, 4(2), pp.448-460.
- Wei, L., Lu, J., Xu, H., Patel, A., Chen, Z. i Chen, G. (2015). Silver nanoparticles: synthesis, properties, and therapeutic applications. *Drug Discovery Today*, 20(5), pp.595-601.
- Wixon, J. (2001). Featured organism: *Arabidopsis thaliana*. *Comparative and Functional Genomics*, 2(2), pp.91-98.

- Yan, A. i Chen, Z. (2019). Impacts of silver nanoparticles on plants: a focus on the phytotoxicity and underlying mechanism. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(5), p.1003.
- Yin, L., Cheng, Y., Espinasse, B., Colman, B., Auffan, M., Wiesner, M., Rose, J., Liu, J. i Bernhardt, E. (2011). More than the ions: the effects of silver nanoparticles on *Lolium multiflorum*. *Environmental Science & Technology*, 45(6), pp.2360-2367.
- Yu, M., Wu, J., Shi, J. i Farokhzad, O. (2016). Nanotechnology for protein delivery: overview and perspectives. *Journal of Controlled Release*, 240, pp.24-37.
- Zhang, C., Hu, Z. i Deng, B. (2016). Silver nanoparticles in aquatic environments: physiochemical behavior and antimicrobial mechanisms. *Water Research*, 88, pp.403-427.
- Zhang, H., Smith, J. i Oyanedel-Craver, V. (2012). The effect of natural water conditions on the anti-bacterial performance and stability of silver nanoparticles capped with different polymers. *Water Research*, 46(3), pp.691-699.
- Zheng L., Hong F., Lu S. i Liu C. (2005). Effect of nano-TiO₂ on strength of naturally aged seeds and growth of spinach. *Biological Trace Element Research*. 104, pp.83–91.
- Zuverza-Mena, N., Armendariz, R., Peralta-Videa, J. i Gardea-Torresdey, J. (2016). Effects of silver nanoparticles on radish sprouts: root growth reduction and modifications in the nutritional value. *Frontiers in Plant Science*, 7.

www.arabidopsis.org pristupljeno 12.01.2020.

www.uniprot.org pristupljeno 12.01.2020.

<https://eels.info/about/techniques/eftem> pristupljeno 13.01.2020.

Životopis

Osnovne informacije

Ime i prezime Bruno Komazec Mjesto rođenja Zagreb

Obrazovanje

2010. – 2014. XV gimnazija, Zagreb
2014. – 2017. Preddiplomski sveučilišni studij molekularne biologije, Prirodoslovno – matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu
Završni rad: Uloga porodice gena *asr* u odgovoru na stres kod biljaka
Mentor: doc. dr. sc. Petra Peharec Štefanić
2017. – 2020 Diplomski sveučilišni studij molekularne biologije, Prirodoslovno – matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu

Laboratorijska stručna praksa

- ožujak 2017. – svibanj 2017. Stručna praksa u području proteomike
Zavod za molekularnu biologiju, PMF, Zagreb
Mentor: doc. dr. sc. Petra Peharec Štefanić
- ožujak 2018. – svibanj 2018. Stručna praksa u području proteomike
Zavod za molekularnu biologiju, PMF, Zagreb
Mentor: izv. prof. dr. sc. Biljana Balen

Ostala postignuća

- ožujak 2014 Osvojeno drugo mjesto na državnom natjecanju iz biologije u kategoriji istraživačkih projekata s projektom: "Utjecaj feromona na ponašanje čovjeka"
- rujan 2016. – prosinac 2016.
studen 2016 Demonstrator na praktikumu iz Bakteriologije i virologije
Sudjelovanje na Četvrtom kongresu Hrvatskog društva za istraživanje raka s međunarodnim sudjelovanjem
- travanj 2019. – lipanj 2019. Demonstrator na praktikumu Uvoda u proteomiku
- lipanj 2018 Sudjelovanje na Simpoziju studenata bioloških usmjerenja – SiSB s posterom: "Utjecaj cisteina na oksidacijski stres uzrokovan nanočesticama srebra u klijancima duhana (*Nicotiana tabacum* L.)"
- lipanj 2018 Sudjelovanje na Simpoziju studenata farmacije i medicinske biokemije - FARMEBS s posterom: "Parametri

oksidacijskog stresa u duhanu (*Nicotiana tabacum* L.) nakon tretmana nanočesticama srebra u kombinaciji s cisteinom"

siječanj 2019

Sudjelovanje na simpoziju pod nazivom "*The 3rd International Symposium on Frontiers in Molecular Science - RNA Regulatory Networks*" u Lisabonu, Portugal, 2019. s posterom: "*Histone H3F3A is encoded by different transcripts with distinct 5'-UTRs in both human and zebrafish*"

studeni 2019

Usavršavanje na multifotonskom konfokalnom mikroskopu na Institutu za Fiziologiju Češke akademije znanosti, Prag u sklopu Sveučilišne potpore „*Molecular basis of abiotic stress in plants*“ voditeljice P. Peharec Štefanić te potpore *Czech-Bioimaging* i *Euro Bioumaging facility*

prosinac 2020

Usavršavanje na transmisijskom elektronskom mikroskopu s EDX detektorom na Institutu za Elektronsku mikroskopiju i nanoanalizu TU Graz (FELMI) i Graz Centar za elektronsku mikroskopiju (ZFE Graz), u sklopu projekta na kojem sam sudjelovao „*Impact of silver nanoparticles on model plants-Focus on AgNP localization and ultrastructural changes of cells and organelles*” AgNANO-LUCCO voditeljice P. Peharec Štefanić koji je financiran od strane EU Horizon 2020 i inovativnog programa “*Enabling Science and Technology through European Electron Microscopy*” No823717- ESTEEM3

2014. – 2018

Sudjelovanje na Noći biologije