

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet

Anamaria Đerek i Roko Gvozdenica Šipić

Utjecaj toplinskog i solnog stresa na diploidni i poliploidni uročnjak
(*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.)

Zagreb, 2021.

Ovaj rad izrađen je na Zavodu za molekularnu biologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta pod vodstvom doc. dr. sc. Dubravka Pavokovića i doc. dr. sc. Nenada Malenice i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2020./2021.

Popis kratica

AA/Bis – akrilamid/bisakrilamid

ABA – abscizinska kiselina

APS – amonijev persulfat

cDNA – komplementarna (eng. *complementary*) DNA

CHAPS – 3-[(3-kolamidopropil)dimetilamonio]-1-propansulfonat

DAPI – 4',6-diamidino-2-fenilindole

DTT – ditioneitol

EDTA – etilendiamintetraoctena kiselina

GSA – glutamat semialdehid

HSF – transkripcijski faktor toplinskog stresa (eng. *heat shock factor*)

HSP – protein toplinskog šoka (eng. *heat shock protein*)

IAA – jodacetamid

IEF – izoelektrično fokusiranje

JA – jasmonska kiselina

KS – kontrolne biljke u solnom stresu

KT – kontrolne biljke u toplinskom stresu

LHC – kompleks za sakupljanje svjetla (eng. *light harvesting complex*)

mRNA – glasnička (eng. *messenger*) RNA

OAT – ornitin- δ -aminotransferaze

OEC – kompleks za razlaganje vode (eng. *oxygen-evolving complex*)

P5C – pirolin-5-karboksilat

P5CR – pirolin-5-karboksilat reduktaza

P5CS – pirolin-5-karboksilat sintetaza

PMSF – fenilmetilsulfonil fluorid

PSM – podudaranje peptida i sekvence (eng. *peptide to sequence match*)

ROS – reaktivne kisikove vrste (eng. *reactive oxygen species*)

RUBISCO – ribuloza-1,5-bisfosfat karboksilaza/oksigenaza

SDS – natrijev dodecil sulfat (eng. *sodium dodecyl sulfate*)

SDS-PAGE – poliakrilamidna gel elektroforeza uz natrijev dodecil sulfat (eng. *sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis*)

SOS – put odgovora na solni stres (eng. *salt overly sensitive*)

SSP – protein solnog šoka (eng. *salt shock protein*)

T-DNA – transfer DNA

TEMED – tetrametiletilendiamin

WGD – udvostručenje cijeloga genoma (eng. *whole genome duplication*)

Sadržaj

1. Uvod	1
1.1. Uročnjak kao modelni organizam	1
1.2. Poliploidija i njen biološki značaj	2
1.3. Abiotički stres	4
1.4. Utjecaj stresa na fotosintezu.....	5
1.5. Utjecaj stresa na razinu aminiokiseline prolina.....	7
1.6. Utjecaj abiotičkog stresa na ekspresiju gena.....	8
1.7. Značaj istraživanja stresnog odgovora kod poliploidnih biljaka.....	9
2. Ciljevi rada	10
3. Materijali i metode.....	11
3.1. Biljni material.....	11
3.1.1. Proizvodnja biljnog materijala.....	11
3.1.2. Određivanje ploidnosti uročnjaka	12
3.2. Eksperimentalni stresni uvjeti i detekcija stresnog odgovora uročnjaka	13
3.2.1. Toplinski stres.....	13
3.2.2. Solni stres.....	13
3.3. Mjerenje fluorescencije klorofila	14
3.4. Mjerenje koncentracije prolina.....	15
3.5. Ekstrakcija ukupnih proteina iz listova	16
3.5.1. Fenolna ekstrakcija proteina	16
3.5.2. Mjerenje koncentracije proteina metodom po Bradfordu	18
3.6. Izoelektrično fokusiranje.....	18
3.7. 2D elektroforeza u poliakrilamidnom gelu	19
3.8. Pretraga baza podataka, komparativna analiza skeniranih gelova i masena spektrometrija.....	20

4.	Rezultati.....	21
4.1.	Potvrda stupnja ploidnosti biljnog materijala.....	21
4.2.	Fluorescencija klorofila kao pokazatelj stresa	22
4.3.	Koncentracija prolina kao pokazatelj stresa.....	30
4.4.	2D elektroforeza u poliakrilamidnom gelu i računalna analiza	33
4.5.	Identifikacija proteina masenom spektrometrijom.....	40
5.	Rasprava	42
6.	Zaključak	49
7.	Zahvale	50
8.	Popis literature	51
9.	Sažetak.....	58
10.	Summary.....	59
11.	Prilog.....	60

1. Uvod

1.1. Uročnjak kao modelni organizam

Uročnjak (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.) biljka je iz roda *Brassicaceae*, u koji spadaju i biljke poput kupusa (*Brassica oleracea*) i rotkvice (*Raphanus raphanistrum*). Iako se ne radi o ekonomski značajnoj biljci, vrlo je važna u područjima biljne genetike i molekularne biologije biljaka, dijelom i zato što je srodna spomenutim agronomski značajnim biljkama (baza podataka TAIR). Potencijal uročnjaka kao modelnog organizma za genetiku po prvi puta spomenuo je Friedrich Laibach već 1943. godine (Haughn i Kunst, 2010).

Životni ciklus uročnjaka od klijanja do stvaranja zrelog sjemena traje otprilike šest tjedana (Meinke i sur., 1998). Nakon klijanja, biljčica uročnjaka razvija lisnu rozetu s kratkim internodijima promjera od 2 do 10 centimetara, ovisno o uvjetima rasta (Meinke i sur., 1998). Cvjetanje počinje rastom cvjetne stablike dužine oko 30 do 40 cm (Haughn i Kunst, 2010), na kojoj nastaju cvjetovi veličine 2 mm (Meinke i sur., 1998). Plod komušćica nastaje samooplođnjom ili kontroliranim križanjem nanošenjem peludi s jedne jedinke na njušku tučka druge jedinke (Meinke i sur., 1998), a jedna biljka može stvoriti više tisuća sjemenki (Haughn i Kunst, 2010) veličine 0.5 mm (Meinke i sur., 1998). Mala veličina biljke uročnjaka omogućuje uzgoj u laboratorijskim prostorima, za razliku od drugih modelnih biljaka poput kukuruza (*Zea mays*) koji zahtijeva razmjerno veliku poljoprivrednu površinu (Haughn i Kunst, 2010). Nadalje, mogućnost samooplođnje olakšava održavanje genetički čistih linija i umnožavanje mutanata za svojstva od interesa s obzirom da se fiksira željeno svojstvo (Haughn i Kunst, 2010).

Diploidni genom uročnjaka relativno je malen u odnosu na druge modelne biljke i sadrži 125 Mbp ($2n = 10$) (Haughn i Kunst, 2010), a sekvenciran je 2000. godine (baza podataka TAIR). To omogućava lakše mapiranje i manipulaciju gena te smanjuje količinu vremena potrebnu da bi se proizvele željene linije (Haughn i Kunst, 2010). Također, danas postoji vrlo velik broj komercijalno dostupnih linija i insercijskih T-DNA mutanata, što izrazito ubrzava istraživanja. Čak i ako linija sa željenom mutacijom nije dostupna, istraživačka zajednica razvila je brojne efikasne metode kemijske i insercijske mutageneze te metode križanja i unosa novog genetskog materijala transformacijom (Meinke i sur., 1998).

1.2. Poliploidija i njen biološki značaj

Poliploidija je pojava karakteristična za biljni svijet, a podrazumijeva postojanje više od dvaju setova homolognih kromosoma. Razlikujemo dvije vrste poliploidnih biljaka: aloploidni i autoploidni. Spomenute kategorije imaju različito podrijetlo svojih kromosomskih setova. Aloploidni su nastali kombiniranjem genoma različitih vrsta, dok su autoploidni nastali udvostručenjem cijelog kromosomskog seta (WGD) jedne vrste. Nastanak poliploida događa se na različite načine, poput spajanja nereduciranih gameta ili somatskog udvostručenja (endoreduplikacije), a zajednički uzrok takvih pojava je nepravilna segregacija kromosoma tijekom mitoze ili mejoze (del Pozo i Ramirez-Parra, 2015).

Poliploidija je odigrala značajnu ulogu u domestikaciji brojnih komercijalnih vrsta poput kukuruza, pšenice i pamuka (del Pozo i Ramirez-Parra, 2015). Međutim, postoje i brojni primjeri poliploidije u prirodi, gdje se pretpostavlja kako je čak 70% svih vrsta kritosjemenjaka (*Angiospermae*) prošlo kroz barem jedan događaj poliploidizacije (Masterson, 1994). Takvi događaji koji su datirani prije više milijuna godina nazivaju se paleopoliploidizacije. Sekvenciranjem genoma uročnjaka otkriveno je kako je tijekom njegove evolucijske povijesti vjerojatno došlo do udvostručenja cijelog genoma barem dva puta (Bomblied i Malde, 2014).

Neke od odlika novonastalih poliploida su povećan stanični volumen, manji broj stanica po jedinici biljne površine, promijenjen omjer volumena jezgre i stanice itd. Također, broj kromosoma koji se moraju ispravno rasporediti i razdvojiti tijekom stanične diobe je udvostručen. Ovakvi događaji dovode do značajnih promjena u regulaciji ekspresije gena i samoj segregaciji kromosoma, organizaciji genoma općenito te izazivaju povećane zahtjeve za energijom koja je potrebna za svaku diobu stanice. Sve to rezultira izmijenjenom fertiilnošću i vijabilnošću biljke (Comai, 2005; te Beest i sur., 2012). Međutim, nakon što poliploidni prevladaju početne uvjete nestabilnosti genoma i smanjene vijabilnosti, oni postaju genetički stabilni (Comai, 2000; Wang i sur., 2006).

Kod *A. thaliana* autoploidija dovodi do značajnog povećanja stanica, ali veličina biljnih organa je tkivno ovisna (Henry i sur., 2005; Li i sur., 2012). Naime, u slučaju korijena, cvijeta i sjemenki dolazi do povećanja volumena organa uslijed povećanja staničnog volumena, dok je kod listova također primijećeno povećanje staničnog volumena, ali uz nepromijenjenu veličinu organa u odnosu na diploidnu jedinku (Li i sur., 2012; del Pozo i Ramirez-Parra, 2015).

To je vjerojatno posljedica mehanizama koji balansiraju staničnu diobu i elongaciju (del Pozo i sur., 2015). Također, zbog povećanih energetske potrebe za svaku staničnu diobu stanice su sklonije elongaciji nego diobi (Comai, 2005). Naime, udvostručenje genoma zahtjeva i dvostruko više nukleotida prilikom replikacije, a sinteza nukleotida je energetski zahtjevan stanični proces. Osim toga, autoploidni uročnjaka pokazuju promjene u ekspresiji gena za cirkadijani ritam, količini klorofila i škroba, duljini dormancije sjemenki te vremenu cvatnje (Miller i sur., 2012; del Pozo i Ramirez-Parra, 2015).

Duplikacije cijeloga genoma (WGD) raznih biljnih vrsta izrazito su učestale u vremenu od prije 319 i 192 milijuna godina, sugerirajući takav događaj u ancestralnoj liniji koji je rezultirao odvajanjem sjemenjača (*Spermatophyta*) i kritosjemenjača (*Angiospermae*). Također, WGD su rezultirali diverzifikacijom gena bitnih za razvoj cvijeta i sjemena, odnosno pojavom velikih evolucijskih inovacija koje su možda tako dovele do eventualne dominacije kritosjemenjača u biljnom svijetu (Jiao i sur. 2011). Moguće je da je poliploidizacija upravo jedan od faktora koji su pripomogli preživljavanju više biljnih taksona u velikom izumiranju na prijelazu krede u tercijar prije 65 mil. godina, a u kojemu je izumrlo oko 60% svih tada postojećih biljnih vrsta. Dokaz u korist te tvrdnje je da veliki broj neovisnih duplikacija genoma datira upravo iz vremena prirodne kataklizme (najvjerojatnije udara asteroida i/ili pojačane vulkanske aktivnosti) koja je prouzrokovala izumiranje (Fawcett i sur. 2009).

Prve poliploidne jedinke uročnjaka u prirodi se najvjerojatnije pojavljuju tijekom posljednjeg ledenog doba, sugerirajući kako bi poliploidija mogla davati selektivnu prednost biljkama u stresnim uvjetima poput oledbe. Primjer tako nastalog prirodnog tetraploidnog uročnjaka je ekotip Warschau (Wa-1) (Lee i sur., 2017). I danas su prirodni poliploidi različitih vrsta većinom nađeni na ekstremnijim staništima poput subarktičkih područja, visokim nadmorskim visinama i područjima male dostupnosti vode i/ili visokog saliniteta tla (Madlung, 2013). Laboratorijski stvoreni autoploidni *A. thaliana* mogu se efikasno proizvesti pomoću tretmana kolhicinom ili regeneracijom iz kulture tkiva (del Pozo i Ramirez-Parra, 2015).

1.3. Abiotički stres

Biljke zbog svoga sesilnog načina života često dolaze pod utjecaj raznih biotičkih i abiotičkih stresora. Neki od biotičkih stresora su biljojedi koji se njima hrane i patogeni koji ih inficiraju, a abiotičkih okolišni uvjeti poput nepovoljne temperature, suše, nedostatka ili viška nekog od nutrijenata u zemlji (solni stres) itd. (Zhu, 2016). I biotički i abiotički stres mogu prouzrokovati brojne negativne učinke na stanice, kao što je nakupljanje nesmotanih ili pogrešno smotanih proteina (Walter i Ron, 2011).

Solni stres djeluje na biljku na dva načina: ionski i osmotski. Osmotski efekt dovodi do smanjene apsorpcije vode u biljku, dok ionski efekt uzrokuje unutarstaničnu toksičnost i poremećaj homeostaze (Umezawa i sur., 2002). Također, postoje i sekundarni učinci na staničnoj razini poput oksidativnog stresa, oštećenja membranskih lipida, proteina i nukleinskih kiselina te razni poremećaji u metaboličkoj funkciji (Zhu, 2016). Jedan od efekata solnog stresa je i nakupljanje ABA, biljnoga hormona koji ima ulogu u poticanju odgovora na stres (Zhu, 2002; de Zelicourt i sur., 2016).

Toplinski stres nastaje kada biljka raste u uvjetima temperature više od optimalne. Glavna „žrtva“ toplinskog stresa najčešće je upravo stanična mašinerija odgovorna za proces fotosinteze, točnije fotosustav II, RUBISCO i ATP sintaza (Allakhverdiev i sur., 2008). Iako su promjene u funkcioniranju procesa fotosinteze, tj. njegova inhibicija, u slučaju umjerenog intenziteta stresa reverzibilne, kada se radi o temperaturi iznad 40°C dolazi do nastanka ireverzibilnih oštećenja odnosno trajne denaturacije proteina (Sharkey i Zhang, 2010).

Učestalija pojava prirodnih poliploida u za biljke generalno nepovoljnim klimatskim uvjetima dovelo je do pretpostavke kako abiotski stresori mogu povećati postotak aberantnih diploidnih gameta. Citološkim i genetičkim analizama pokazano je kako hladnoća može utjecati na raspored mikrotubula tijekom telofaze II mejoze, što dovodi do pojave postmejotičkih defekata pri citokinezi i formiranju stanične stijenke (de Storme i sur., 2012). Nadalje, smatra se kako nova funkcionalna svojstva dobivena udvostručenjem genoma pružaju selektivnu prednost poliploidnim jedinkama u uvjetima stresa (mogućnost daljnje diferencijacije jednoga od udvostručenih lokusa, bez gubitka svojstava), unatoč neposrednom gubitku fertilnosti i vijabilnosti (del Pozo i Ramirez-Parra, 2015).

Ovo vodi hipotezi prema kojoj bi prirodni poliploidni ekotipovi uročnjaka trebali imati selekcijsku prednost u odnosu na svoje diploidne rođake u uvjetima stresa. I zaista,

autotetraploidne varijante *A. thaliana* ekotipa Columbia zaista pokazuju, uz povećanu toleranciju na stres, povećanje i otpornosti na isušivanje te smanjenu stopu transpiracije. Ova pojava usko je povezana s promjenama u građi i razmještaju puči, regulacijskim promjenama u sustavima bitnima za signalizaciju pomoću ABA i homeostazu ROS (del Pozo i Ramirez-Parra, 2015). Eksperimenti provedeni na različitim ekotipovima uročnjaka također navode na sličan zaključak: prirodno tetraploidni ekotipovi Wa-1 (Warschau), Bla-5 (Blanes) i Ciste-2 (Cisterna di Latina), kao i umjetno proizvedeni autotetraploidi pokazali su veću mogućnost akumulacije kalija i otpornosti na solni stres u odnosu na diploidne ekotipove (Chao i sur., 2013).

1.4. Utjecaj stresa na fotosintezu

Fotosinteza podrazumijeva niz redoks reakcija na tilakoidnim membranama kloroplasta koje koriste energiju fotona primljenu od LHC-a, a koja se zatim prevodi u kemijsku energiju (Sudhir i Murthy, 2004). Pobuđeni elektroni prenose se preko četiri multiproteinska kompleksa u tilakoidnoj membrani – fotosustava II, citokroma b_6/f , fotosustava I i ATP sintaze te preko dva pokretna nosača elektrona – plastokinona i plastocijanina (Sudhir i Murthy, 2004). Pobuđeni elektroni iz reakcijskog centra fotosustava II prenose na plastokinon. Oni se nadomještaju redukcijom vode pri čemu se oslobađa molekularni kisik i nastaje protonski gradijent koji ATP sintaza iskorištava za dobivanje energije u obliku ATP-a. Elektroni se sa plastokinona zatim prenose na citokrom b_6/f i fotosustav I koji ih preko feredoksina prenosi na $NADP^+$ uzrokujući redukciju do NADPH. U stromi kloroplasta se pomoću nastalih NADPH i ATP uz enzim RUBISCO u nizu reakcija fiksira ugljikov dioksid i reducira do glukoze u procesu poznatom kao Calvinov ciklus .

Abiotski stres kojem su biljke izložene, poput suše, visokih temperatura, pojačane slanosti tla, utjecaja teških metala i jakog sunčevog zračenja, ima značajan utjecaj na proces fotosinteze kod biljaka. To se očituje prije svega u sintezi ROS kao što su peroksidni, superoksidni i hidroksilni ioni te *singlet* kisik. Oni uzrokuju oštećenja na fotosustavima I i II, dovode do poremećaja u reakcijama sinteze klorofila i redukcije ugljikovog dioksida te ometaju prijenos elektrona. Poremećaj u bilo kojem dijelu fotosintetske mašinerije uzrokuje zaustavljanje kompletnog procesa fotosinteze budući da fotosintetski aparat posjeduje senzore koji detektiraju stres u slučaju neravnotežne promjene redoks statusa i količine energije u stanici (Sharma i sur., 2019).

Toplinski stres glavna je prijetnja biljnoj homeostazi uslijed okolišnih promjena koje su dovele do globalnog zatopljenja (Sharma i sur., 2019). Povišenje temperature dovodi do poremećaja u integritetu i propusnosti tilakoidnih membrana što uzrokuje izlazak iona iz stanice i promjene u distribuciji energije između dva fotosustava.

Najosjetljivija komponenta fotosintetskog aparata je fotosustav II, osobito njegov OEC jer pri povišenim temperaturama dolazi do gubitka dva od četiri Mn^{2+} iona koji čine klaster i važni su kao kofaktori. Temperatura iznad optimalne vrijednosti također remeti strukturni i funkcionalni integritet fotosustava II, razarajući reakcijski centar. Čak i na blago povišenim temperaturama (35°C) uočena je zaustavljena migracija LHCII iz intergranalnog prostora prema fotosustavu I što značajno remeti apsorpciju svjetlosne energije i njenu ravnotežu (Allakhverdiev i sur., 2008).

Enzimi Calvinovog ciklusa temperaturno su labilni pa je asimilacija i redukcija ugljikova dioksida značajno smanjena i pri blagom povišenju temperature. S druge strane, enzim RUBISCO je termostabilan, ali pri povišenoj temperaturi pokazuje pad aktivnosti zbog toga što je RUBISCO aktivaza jako temperaturno osjetljiv enzim. Također, uočeno je da RUBISCO pri povišenim temperaturama kao nusprodukt oksigenaznih reakcija češće stvara vodikov peroksid koji, poput ostalih ROS, uzrokuje oksidacijski stres (Sharkey, 2005).

Solni stres glavni je problem u sušnim i polusušnim regijama i područjima navodnjavanja. Otprilike 7% svjetske kopnene površine, 20% obrađene zemlje i gotovo polovica navodnjavane zemlje zahvaćeno je visokim udjelom soli (Sudhir i Murthy, 2004).

Usljed solnog stresa dolazi do oštećenja kloroplastne ovojnice i nakupljanja plastoglobula u tilakoidnim membranama (Shu i sur., 2012). Također dolazi do inhibicije fotosustava II i smanjenja gustoće reakcijskih centara, vjerojatno zbog disocijacije polipeptida veličine 23 kDa pri čemu fotosustav II gubi svoju aktivnost (Sudhir i Murthy, 2004). Budući da zbog stresa biljka zatvara puči, fiksacija ugljikovog dioksida je onemogućena pa dolazi do inhibicije prijenosa elektrona preko fotosustava II i pojave cikličkog prijenosa elektrona koji uključuje samo fotosustav I (Stepien i Johnson, 2009).

1.5. Utjecaj stresa na razinu aminiokiseline prolina

Prolin je proteinogena aminokiselina specifične cikličke strukture koja proteinima daje svojstvo rigidnosti. U biljkama prolin može biti sintetiziran dvama metaboličkim putevima. Većinom se sintetizira iz glutamata koji se pomoću enzima P5CS prevodi u GSA koji se spontano pretvara u P5C. P5C se zatim prevodi u prolin djelovanjem enzima P5CR. Alternativno, prolin se može sintetizirati iz ornitina koji se djelovanjem OAT transaminacijom prevodi u GSA, dok je ostatak puta jednak kao i prethodno navedeni (Szabados i Savouré, 2009).

Prolin u biljkama sudjeluje u brojnim razvojnim procesima, a u uvjetima biotičkog i abiotičkog stresa dolazi do njegovog izraženog nakupljanja (Singh i sur., 2017). To se događa zbog njegovog svojstva da povećava toleranciju na stres djelujući kao osmolit, medijator u prijenosu signala biljnog odgovora, molekularni šaperon, kelator metalnih iona, sakupljač ROS-a, služi kao izvor dušika i ugljika za stanice pogođene stresom, ima pufersko djelovanje (Mansour i Salama, 2020) itd. Osim stresnih uvjeta, povećanje razine prolina može se izazvati tretmanom hormonom ABA (Yang i sur., 2000).

U stresnim uvjetima udio prolina u stanici iznosi do 80% svih aminokiselina, dok je u normalnim uvjetima oko 5%. To se postiže regulacijom metabolizma tako da se poveća njegova biosinteza ili smanji degradacija. Druga razina kontrole koncentracije prolina je regulacija njegovog transporta povećavajući unos prolina u stanicu ili smanjujući njegovo izbacivanje iz stanice. Mehanizmi povećanja razine prolina i njegov maksimalni udio ovise o biljnoj vrsti. Tako se u slučaju izlaganja *A. thaliana* solnom stresu udio prolina poveća na 20% (Singh i sur., 2017). Tretman prolinom u uvjetima bez stresa toksičan je za biljku i izaziva staničnu smrt, a akumulacija njegovih međuprodukata uzrokuje nakupljanje ROS-a i indukciju ekspresije gena stresnog odgovora (Verbruggen i Hermans, 2008). Neke biljke kao osmotski aktivnu tvar u uvjetima stresa nakupljaju saharozu umjesto prolina, vjerojatno kako bi izbjegle toksični efekt prolina i njegovih međuprodukata (Mittler, 2006).

1.6. Utjecaj abiotičkog stresa na ekspresiju gena

Promjene staničnog ekvilibrija uzrokovane stresom biljke detektiraju sensorima u membranama ili citoplazmi. Ti signali zatim potiču ekspresiju gena stresnog odgovora. Proteini kodirani genima stresnog odgovora dijele se u dvije grupe: oni koji imaju neposrednu ulogu u stresnom odgovoru i regulatore prijenosa signala. U prvu skupinu spadaju, između ostaloga, osmotin, šaperoni, RNA vezujući proteini, transporteri za prolin i šećere itd. Druga skupina sastoji se većinom od transkripcijskih faktora (Singh i sur., 2017).

Primjeri za signalne puteve koji igraju važnu ulogu u aktivaciji stresnog odgovora su put JA i put ABA. Njima se inducira ekspresija velikog broja gena povezanih s odgovorom na razne tipove abiotičkog stresa. To implicira kako geni zaduženi za pojedini tip abiotičkog stresa nisu nužno za njega specifični (Qazi i sur., 2019).

U uvjetima solnog stresa aktivira se put JA koji zatim dovodi do povećanja koncentracije citosolnog kalcija čime se aktiviraju signalni putevi među kojima se ističe SOS put. On dalje potiče transkripciju gena za održavanje ionske homeostaze. Također, dolazi do nakupljanja SSP čija je uloga regulacija tkivno ovisne enzimske aktivnosti. U 34 biljne vrste identificirano je otprilike 2171 protein iz skupine SSP (Qazi i sur., 2019).

U slučaju toplinskog stresa dolazi do aktivacije HSP i HSF, transkripcijskih faktora koji reguliraju njihovu ekspresiju. HSP su šaperoni koji pomažu smatanje proteina, sprječavaju njihovu agregaciju te reguliraju njihovu lokalizaciju. HSF1 i HSF3 imaju glavnu ulogu u regulaciji ekspresije HSP kod *A. thaliana*. Također, HSF služe kao senzori koji detektiraju prisutnost ROS koji nastaju kao posljedica stresnog djelovanja na biljku (Qazi i sur., 2019). Važno je naglasiti da proteini iz skupine HSP ne djeluju samo u slučaju toplinskog stresa, već se aktiviraju kod bilo kakve promjene homeostaze koja potencijalno može poremetiti stabilnost staničnih proteina i narušiti im trodimenzionalnu strukturu (Usman i sur., 2014).

1.7. Značaj istraživanja stresnog odgovora kod poliploidnih biljaka

Klimatske promjene i ubrzani rast ljudske populacije trendovi su koji će definirati 21. stoljeće. Iako danas ispod granice siromaštva živi manje ljudi nego ikad, još uvijek sve države nisu uspjele razriješiti problem prehrane vlastitog stanovništva na zadovoljavajući način. Iz tog razloga, naponi biologa cijeloga svijeta jednim dijelom su usmjereni na proizvodnju usjeva veće hranjive vrijednosti i veće tolerancije na nepovoljne klimatske uvjete. Poliploidizacija se nameće kao vijabilna alternativa za proizvodnju komercijalnih biljaka, primjerice čaja (Alam i sur., 2015), koje posjeduju veću biomasu i otpornost na nametnike. Utvrđivanje mehanizama stresnog odgovora i promjena u njihovom funkcioniranju uslijed poliploidizacije moglo bi biti jeftina, a obećavajuća metoda povećanja prinosa hrane proizvodnjom varijeteta otpornih na emergentne globalne stresore, te korak koji je potrebno napraviti prema što potpunijem razumijevanju dinamike biljnoga genoma. Proučavanjem proteoma umjesto transkriptoma u obzir se uzimaju i za stres bitni procesi poput posttranslacijske modifikacije, dajući bolji uvid u točne proteinske posttranslacijske varijante relevantne za pojedini stresni odgovor.

2. Ciljevi rada

Generalni cilj ovoga rada bio je utvrđivanje razlika u odgovoru triploidnog i tetraploidnog uročnjaka na abiotički stres u odnosu na njegovu standardnu diploidnu varijantu.

Specifični ciljevi bili su sljedeći:

1. Odrediti razliku u stopi fotosinteze nakon izlaganja toplinskom i solnom stresu između diploida i poliploida
2. Odrediti razliku u koncentraciji prolina nakon izlaganja toplinskom i solnom stresu između diploida i poliploida
3. Odrediti razliku u zastupljenosti proteina nakon izlaganja toplinskom i solnom stresu između diploida i poliploida
4. Identificirati proteine čija se zastupljenost najviše razlikuje između triju testiranih kariotipova uročnjaka ($2n$, $3n$ i $4n$).

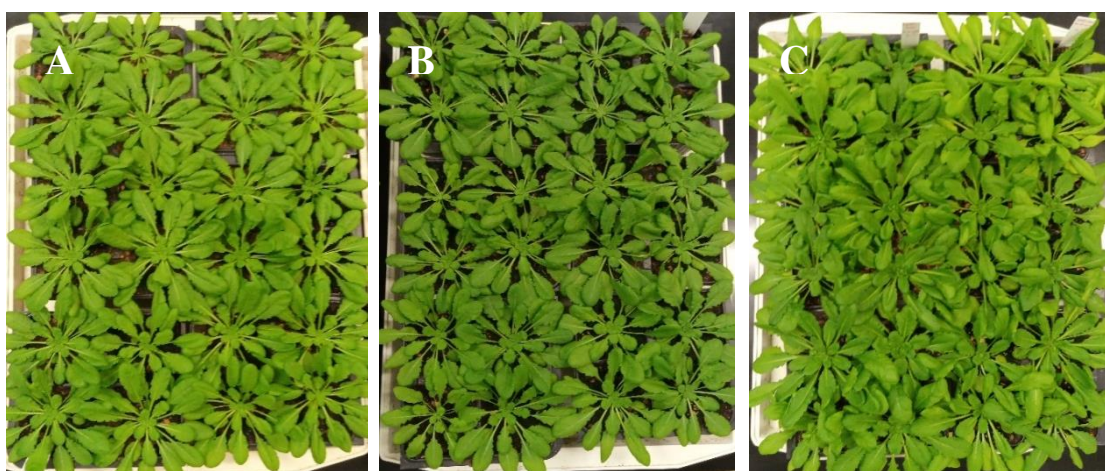
3. Materijali i metode

3.1. Biljni material

3.1.1. Proizvodnja biljnog materijala

U eksperimentu su korištene biljke uročnjaka (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.), ekotipa Columbia triju stupnjeva ploidnosti (2n, 3n i 4n). Uz postojeće diploidne jedinke, tetraploidne su dobivene tretmanom diploidnih biljaka citostatikom kolhicinom. Na apikalni meristem diploida nanoseno je 20 μ L otopine 0,25% (w/v) kolhicina i 0,2% neionskog surfaktanta *Silwet L-77*, a nakon samooplodnje skupljeno je tetraploidno sjeme (Bouharmont i van den Hende, 1968). Triploidne sjemenke dobivene su križanjem, pri čemu se pelud diploidne biljke nanosio na njušku tučka tetraploidne biljke.

Sjemenke triju stupnjeva ploidnosti (2n, 3n i 4n) sterilizirane su 50% natrijevim hipokloritom i nasadene na PN hranjive podloge (*Plant Nutrient medium*) uz dodatak 1% saharoze. Nakon prekonodne stratifikacije na 4°C prebačene su u klima komoru na uvjete kratkog dana (8 sati svjetla i 16 sati tame) pri temperaturi od 22°C i vlažnosti zraka 50%. Nakon dva tjedna, klijanci su prebačeni sa hranjive podloge na zemlju pri čemu smo uzgajali 48 biljaka svakog stupnja ploidnosti. Biljke su na zemlji uzgajane tijekom dva mjeseca u uvjetima kratkog dana do potpunog razvitka rozete. Uzgojem biljaka u navedenim uvjetima spriječeni su nodularni rast i cvjetanje. Na Slici 1. prikazan je biljni materijal neposredno prije izlaganja stresu.



Slika 1. Odrasle biljke uročnjaka korištene u eksperimentu. A označava diploidne, B triploidne, a C tetraploidne biljke.

3.1.2. Određivanje ploidnosti uročnjaka

Kako bismo potvrdili ploidnost dobivenog biljnog materijala provedeno je bojanje kromosoma matičnih stanica peluda u profazi prve mejotske diobe pomoću boje DAPI.

Uzeti su manje zreli pupovi veličine 0,5 mm i fiksirani u otopini 96% etanola i ledene octene kiseline u omjeru 3:1 tijekom dva sata, a potom su do izrade preparata čuvani u 70% etanolu. Pupovi su ispirani na predmetnom stakalcu sa sterilnom vodom i hladnim (oko 4°C) 0,1 M citratnim puferom (pH = 4,7) u dva navrata po pet minuta. Potom je provedena enzimatska razgradnja stanične stijenke s 10 µL enzimske otopine (0,42% pektolijaze, 0,42% celulaze, 0,42% driselaza) u vlažnoj kutiji tijekom 35 minuta na temperaturi od 37°C. Reakcija je zaustavljena uklanjanjem enzima filter papirom i dodavanjem 0,1 M citratnog pufera (pH = 4,7). Potom je dodano 5 µL 60% octene kiseline i tkivo je usitnjeno histološkom iglom. Stavljeno je pokrovno stakalce i laganim pritiskanjem palcem (*squash*) tkivo je raspršeno, a zatim dehidrirano zaleđivanjem pomoću ugljikova dioksida. Pokrovno stakalce je uklonjeno i preparat je ostavljen da se osuši. Nakon toga je preparat obojen nakapavanjem 200 µL boje DAPI (2 µg mL⁻¹), stavljena je pokrovnica i provedena je inkubacije na sobnoj temperaturi u mraku u trajanju od 20 minuta. Po uklanjanju pokrovnice, preparati su fiksirani pomoću otopine *Dako Fluorescence Mounting Medium* (*Dako North America Inc., USA*) i ostavljeni na 4°C preko noći. Mikroskopiranje je provedeno na fluorescentnom mikroskopu Olympus BX51 koristeći plavi filter i fotografirano pomoću CCD kamere (Olympus DP70). Preparati su promatrani imerzijskim objektivom, a ukupno povećanje iznosilo je 1000x.

3.2. Eksperimentalni stresni uvjeti i detekcija stresnog odgovora uročnjaka

3.2.1. Toplinski stres

Toplinskom stresu izložene su 24 biljke svakog ispitivanog stupnja ploidnosti (2n, 3n, 4n). Biljke su stavljene u biljnu komoru u mrak pri temperaturi od 45°C i vlažnosti zraka 50% u trajanju od 3 h. 24 biljke svakog ispitivanog stupnja ploidnosti služile su kao kontrolna skupina koja nije bila izložena stresu već je uzgajana u biljnoj komori na temperaturi od 22°C i vlažnosti zraka od 50%. Po jedan srednje razvijeni list rozete uzet je sa svake biljke neposredno nakon stresa i 72 h nakon stresa te je na tim uzorcima provedena analiza koncentracije prolina. 72 h nakon stresa uzeto je više srednje razvijenih listova rozete koji su korišteni u analizi proteoma.

3.2.2. Solni stres

Po 24 biljke svakog stupnja ploidnosti (2n, 3n, 4n) zalijevane su tijekom tri dana s 300 mM otopinom natrijevog klorida i uzgajane u biljnoj komori na temperaturi od 22°C i vlažnosti zraka od 50%. Kao kontrolna skupina korištene su 24 biljke svakog ispitivanog stupnja ploidnosti koje su bile zalijevane vodovodnom vodom i uzgajane u istim uvjetima temperature i vlažnosti kao i biljke izložene solnom stresu. Po jedan srednje razvijeni list rozete uzet je sa svake biljke 24 h i 48 h nakon izlaganja stresu te je na tim uzorcima provedena analiza koncentracije prolina. 48 h nakon stresa uzeto je više srednje razvijenih listova rozete koji su korišteni u analizi proteoma.

3.3. Mjerenje fluorescence klorofila

Mjerenje polifaznog rasta fluorescence klorofila a provedeno je testom OJIP pomoću uređaja *FluorPen FP100* (*Photon Systems Instruments*) na dva lista srednje starosti svake biljke. Za svaki ispitivani stupanj ploidnosti testirane su četiri biljke izložene bilo temperaturnom bilo solnom stresu i četiri kontrolne biljke. Prije samog mjerenja biljke su ostavljene u mraku 30 minuta kako bi se zaustavila fotosinteza i oksidirao plastokinon, pokretni nosač elektrona koji prenosi elektrone od fotosustava II do citokroma b_6/f . Fluorescencija klorofila mjerena je na odraslim listovima srednje starosti odmah i 72 h nakon izlaganja toplinskom stresu te 24 h i 48 h nakon primjene solnog stresa. OJIP model analizira indukciju fluorescence klorofila u uvjetima aklimatizacije biljke na mrak, nakon koje je izložena bljeskovima svjetla (Ripoll i sur., 2016). Kada je list na kojem je provedeno mjerenje prilagođen uvjetima mraka, fluorescencija klorofila tada je minimalna (F_0), međutim kada se na njega djeluje svjetlošću, fluorescencija raste do maksimalne vrijednosti (F_m) (Strasser i sur. 2004). Razlika između maksimalne i minimalne vrijednosti intenziteta fluorescence je varijabilna fluorescencija (F_v). Omjer F_v/F_m definiran je kao maksimalna fotokemijska efikasnost i može dati uvid u stupanj stresa koji je biljka doživjela. Drugi važan parametar koji je praćen u ovom eksperimentu je PI_{ABS} vrijednost (eng. *performance index*) koji kvantificira cjelokupnu funkcionalnost protoka elektrona kroz fotosustav II (Jedrowski i sur. 2015). Dobivene vrijednosti F_v/F_m i PI_{ABS} analizirane su i grafički prikazane u ovisnosti o stupnju ploidnosti i vremenu nakon izlaganja biljaka stresu. Ovo mjerenje je provedeno kako bismo potvrdili ulazak biljke u stres u korištenim stresnim uvjetima.

3.4. Mjerenje koncentracije prolina

Ekstrakcija i mjerenje koncentracije prolina napravljeno je prema protokolu Carillo i Gibon (2011). Za svaki ispitivani stupanj ploidnosti uzeti su uzorci iz četiriju biljaka izloženih bilo temperaturnom bilo solnom stresu i četiri kontrolne biljke. Uzeti su uzorci odmah i 72 h nakon primjene toplinskog stresa te 24 h i 48 h nakon primjene solnog stresa. Masa uzoraka (jedan list po uzorku) bila je oko 50 mg. Postupak je ponovljen za oba stresa. Tkivo je zatim usitnjeno u tarioniku uz dodatak tekućeg dušika. Nakon dobivanja finog praha dodan je 1 mL 70% etanola. Uzorci su zatim centrifugirani na 10 000 g koristeći *Eppendorf Centrifuge 5804R* u trajanju od 10 minuta i izdvojen je supernatant. Standardi koncentracija 0,05 mM, 0,1 mM, 0,25 mM, 0,5 mM i 1 mM dobiveni su otapanjem prolina u 70% etanolu. U 100 µL ekstrakta/standarda dodan je 1 mL reakcijske smjese (ninhidrin 1% (w/v), octena kiselina 60% (v/v), etanol 20% (v/v)), a smjesa je zatim inkubirana 20 minuta na 95°C.

Apsorbancija je mjerena spektrofotometrijski koristeći uređaj *Specord 50 PLUS* u kivetama duljine optičkog puta 1 cm pri valnoj duljini 520 nm, uz korištenje reakcijske smjese kao slijepe probe. Baždarni dijagram za određivanje koncentracije prolina dobiven je mjerenjem apsorbancije standarda. Dobivene su vrijednosti koncentracije prolina (mM) u alikvotu ekstrakta, a množine prolina u ovisnosti o masi uzetog tkiva (nmol/mg) izračunate su prema formuli:

$$\text{Prolin u nmol mg}^{-1} = \frac{c (\text{Prolin, mM}) \times 1,1 \text{ mL}}{m (\text{uzorak, mg})}$$

3.5. Ekstrakcija ukupnih proteina iz listova

3.5.1. Fenolna ekstrakcija proteina

Proteini su ekstrahirani iz biljnog materijala uzetog 72 h nakon toplinskog stresa i 48 h nakon primjene solnog stresa i smrznutog na -80°C . Korištena je po jedna biološka replika za svaki uzorak. Pripremljeni su ekstrakcijski i IEF pufer, čiji su sastavi prikazani u Tablicama 1. i 2. Pripremljena je i precipitacijska otopina otapanjem 0,77 g amonijeva acetata u 100 mL čistog metanola, koja je zatim spremljena u hladnjak na temperaturu od -20°C do sljedećeg korištenja. Biljno tkivo ($m = 0,5$ g) usitnjeno je u tarioniku prethodno ohlađenom tekućim dušikom. Kada je dobiven fini prah, dodani su polivinil pirolidon (PVP, proizvođača *Sigma-Aldrich*, USA) i 4 mL ekstrakcijskog pufera te je uzorak prebačen u Falcon epruvetu. Epruvete s uzorcima zatim su protresene na miješalici (engl. *vortex*) tijekom tridesetak sekundi i potom horizontalno položene u posudu s ledom, koja je ostavljena na tresilici 10 min. Po završetku inkubacije, u svaku epruvetu dodana su 4 mL fenola, nakon čega je ponovljen postupak miješanja i inkubacije. Potom su epruvete centrifugirane pri 4°C i 3900 g koristeći *Eppendorf Centrifuge 5804R*. Supernatant je otpipetiran u novu Falcon epruvetu, u koju je dodano još 4 mL ekstrakcijskog pufera. Cijeli postupak ponovljen je još jednom od početka. Supernatant je ponovno prebačen u novu Falcon epruvetu, u koju je zatim dodan otprilike četverostruki volumen ledeno hladne precipitacijske otopine. Smjesa je promiješana preokretanjem epruvete u ruci, nakon čega su epruvete ostavljene u hladnjaku na -20°C preko noći.

Tablica 1. Sastav ekstrakcijskog pufera.

	$M_r / \text{g mol}^{-1}$	$c / \text{mmol L}^{-1}$	$m / 100 \text{ mL}$
TrisHCl	121,14	500	6,057 g
EDTA	372,24	50	1,8612 g
Saharoza	342,30	700	23,961 g
KCl	74,56	100	0,7456 g
PMSF	174,19	1	0,0174 g
β-merkaptetanol	78,14	0,4	0,0313 g

Tablica 2. Sastav IEF pufera.

Urea	5,4 g
CHAPS	0,2 g
reH₂O	do 10 mL

Uzorci su idući dan izvađeni iz hladnjaka i centrifugirani 20 min na 4°C i 3900 g. Supernatant je izliven, a talog je resuspendiran u 3 mL ledene precipitacijske otopine te je centrifugirano kao u koraku prije. Cijeli postupak ispiranja ponovljen je ukupno tri puta. Četvrti put umjesto precipitacijske otopine dodano je 3 mL ledenog acetona. Tijekom zadnjeg centrifugiranja, u prethodno pripremljeni IEF pufer dodani su DTT ($\gamma = 2 \text{ mg mL}^{-1}$) i amfoliti ($c = 5,2 \text{ } \mu\text{l mL}^{-1}$). Supernatant je nakon ispiranja izliven, a talog ostavljen u digestoru da se osuši. Potom je u svaku epruvetu dodano 500 μL IEF pufera uz resuspenziju dok se talog ne otopi. Otopljeni talozi zatim su prebačeni u mikroeprevete od 1,5 mL i centrifugirani pri 20 817 g u trajanju od 5 min, a supernatant je izdvojen.

3.5.2. Mjerenje koncentracije proteina metodom po Bradfordu

Koncentracija proteina u uzorcima izmjerena je metodom po Bradfordu. Pripremljene su smjese uzoraka prema Tablici 3. Epruvete su potom promiješane na miješalici (eng. *vortex*) i stavljene u tamu na inkubaciju. Koncentracija proteina izmjerena je spektrofotometrom *Specord 50 PLUS* pri valnoj duljini od 595 nm u kivetama duljine optičkog puta 1 cm.

Tablica 3. Sastav uzoraka za mjerenje koncentracije spektrofotometrijom.

	Uzorci	Slijepa proba
HCl ($c = 0,1$ M)	10 μ L	10 μ L
Uzorak	20 μ L	-
reH ₂ O	70 μ L	70 μ L
IEF pufer	-	20 μ L
Bradford radna otopina (2,85% (v/v) etanola, 5,28% (v/v) H ₃ PO ₄ , 6% (v/v) Bradford matične otopine)	3,5 mL	3,5 mL

3.6. Izoelektrično fokusiranje

Nakon određivanja koncentracije proteina u uzorcima, svi uzorci su razrijeđeni do najniže izmjerene koncentracije. Također je u svaki uzorak dodano po 5 μ l bromfenol plave boje, nakon čega su promiješani na miješalici i centrifugirani 5 min pri 20 817 g. Zatim su uzorci izliveni u kanaliće posude za rehidraciju, u koju su potom postavljene trake za IEF *Immobiline DryStrip Gels* (proizvođača *Cytiva*, USA) od 13 cm (pH 3-10) za uzorke temperaturnog stresa odnosno trake od 18 cm (pH 4-7) za uzorke solnog stresa. Sve je preliveno tekućinom za prekrivanje i ostavljeno na rehidraciji do sljedećega dana, u trajanju od otprilike 15 h.

Po završetku rehidracije, obavljeno je izoelektrično fokusiranje u uređaju *Ettan IPGphor 3 IEF System GE Healthcare*, USA u trajanju od oko 8 h, dok se nije postigla struja od 30 kWh. Nakon izoelektričnog fokusiranja, trake su pohranjene u hladnjak na -80°C do daljnjeg korištenja.

3.7. 2D elektroforeza u poliakrilamidnom gelu

Pripremljeni su gelovi za SDS-PAGE debljine 0,75 cm čiji je sastav naveden u Tablici 4. Pripremljen je i pufer za ekvilibraciju, čiji je sastav u Tablici 5. Trakice za IEF izvađene su iz hladnjaka i odmrznute, nakon čega su ekvilibrirane. To je obavljeno prvo 15 min u 2,5 ml pufera za ekvilibraciju s dodatkom DTT (100 mg za trakice veličine 13 cm, 120 mg za trakice od 18 cm), a zatim 15 min u 2,5 ml pufera za ekvilibraciju s dodatkom IAA (125 mg za trakice od 13 cm, odnosno 150 mg za trakice od 18 cm).

Nakon ekvilibracije, provedena je SDS-PAGE, prvo 1 h pri naponu od 100 V, a zatim pri 220 V do kraja elektroforeze. Korišten je 1x elektrodni pufer za SDS-PAGE dobiven razrjeđenjem 10x pufera čiji se sastav nalazi u Tablici 6. Gelovi su po završetku izvađeni i obojani bojom *Coomassie Brilliant Blue* proizvođača *Thermo Fisher Scientific*, USA te odbojani otopinom za odbojavanje. Po odbojavanju, gelovi su skenirani pomoću uređaja *Epson Perfection V700 Photo* te pohranjeni u otopinu za odbojavanje i stavljeni u hladnjak na 4°C do daljnje analize.

Tablica 4. Sastav gelova za drugu dimenziju 2D elektroforeze.

	V / mL
reH₂O	24,8
TrisHCl (pH = 8,8)	14,8
AA/Bis	19,5
(29,2 g/0,8 g u 100 mL vode)	
10% SDS	0,590
10% APS	0,354
TEMED	0,035

Tablica 5. Sastav pufera za ekvibraciju.

Urea	9 g
TrisHCl (pH = 8,8)	0,83 mL
20% SDS	2,5 mL
reH₂O	do 25 mL

Tablica 6. Sastav 10x elektrodnog pufera za SDS-PAGE ukupnog volumena 1 L.

Tris	30 g
Glicin	144 g
SDS	10

3.8. Pretraga baza podataka, komparativna analiza skeniranih gelova i masena spektrometrija

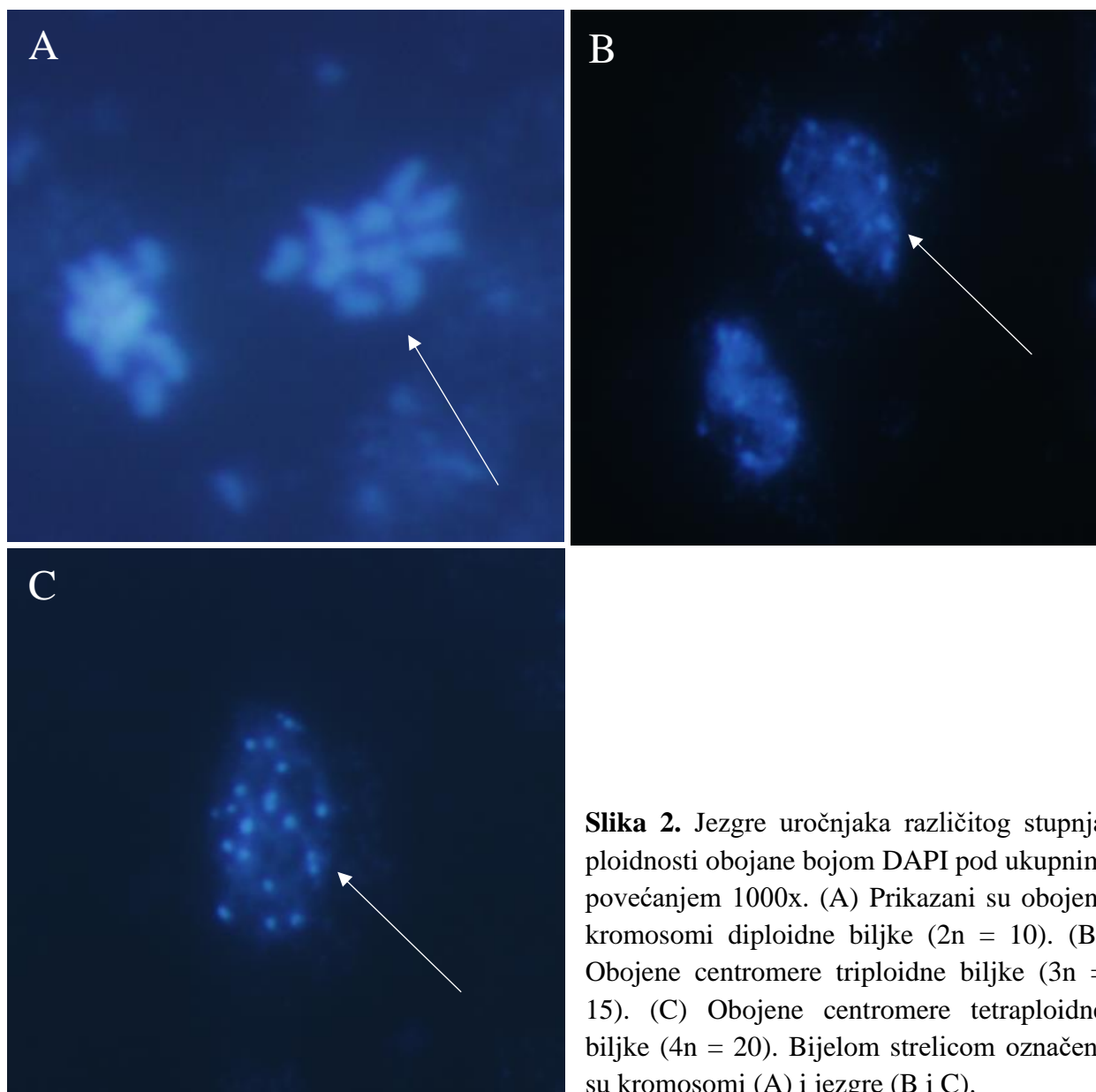
Pregledom interaktivne mape poliakrilamidnog gela nastalog 2D elektroforezom proteina zelenog tkiva *A. thaliana* na web-adresi <https://gelmap.de/49#> i baze podataka SWISS-2DPAGE servisa *Expasy*, nastojao se utvrditi približan položaj za stres bitnih proteina. Komparativnom analizom skeniranih gelova pomoću programa *ImageMaster 2D Platinum* potom su utvrđene proteinske mrlje s najvećom relativnom razlikom u intenzitetu između kontrolnih i tretiranih primjeraka, od čega je odabrano ukupno osam uzoraka za analizu uređajem za spektrometriju masa MALDI-TOF, po četiri za solni i toplinski stres. Unatoč tome što se radi o vrlo malenom broju uzoraka s obzirom na broj detektiranih proteinskih mrlja, veći opseg analize nije bio moguć uslijed financijskih ograničenja.

Izolacija uzoraka od interesa iz gela i digestija proteina provedena je prema protokolu *In-Gel Digest* uz spektrometar masa visoke rezolucije *Q Exactive Plus*, spregnut sa sustavom za visokoučinkovitu kromatografiju *EASY-nLC 1200* (*Thermo Scientific Inc.*, USA). Masena spektrometrija provedena je na Zavodu za biokemiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu.

4. Rezultati

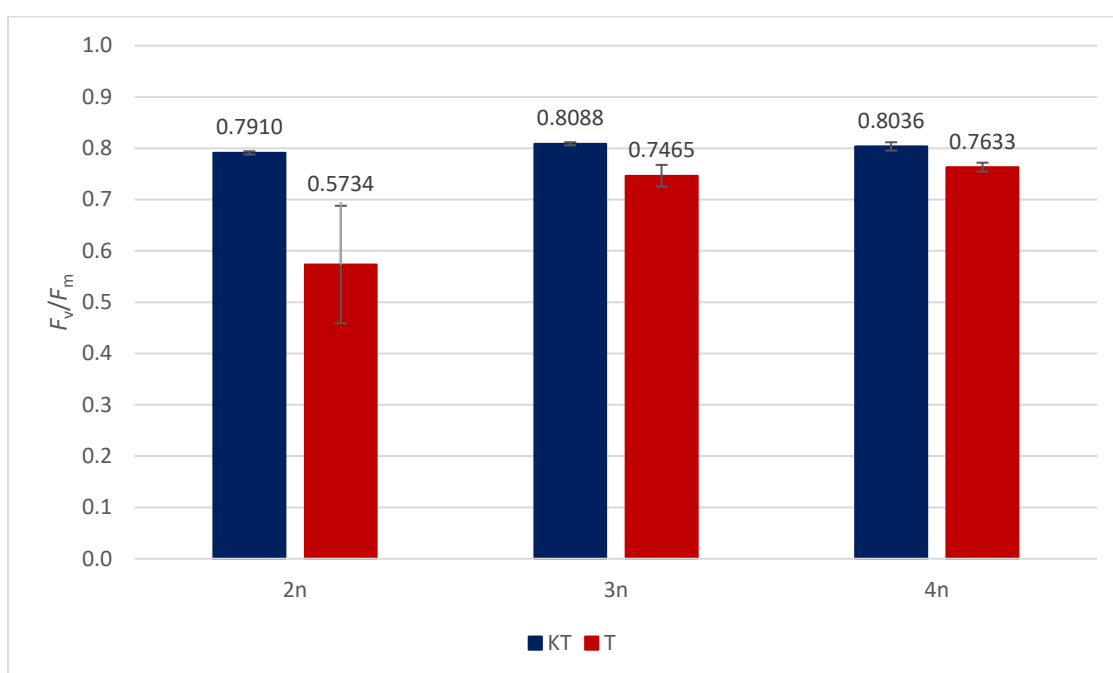
4.1. Potvrda stupnja ploidnosti biljnog materijala

Bojanjem kromosoma matičnih stanica peludi u profazi prve mejotske diobe pomoću boje DAPI potvrđen je stupanj ploidnosti korištenog biljnog materijala. Fluorescentnim mikroskopom Olympus BX51 pod ukupnim povećanjem 1000x fotografirani su kromosomi te je brojanjem potvrđen očekivani stupanj ploidnosti. Na Slici 2. prikazani su dobiveni rezultati.



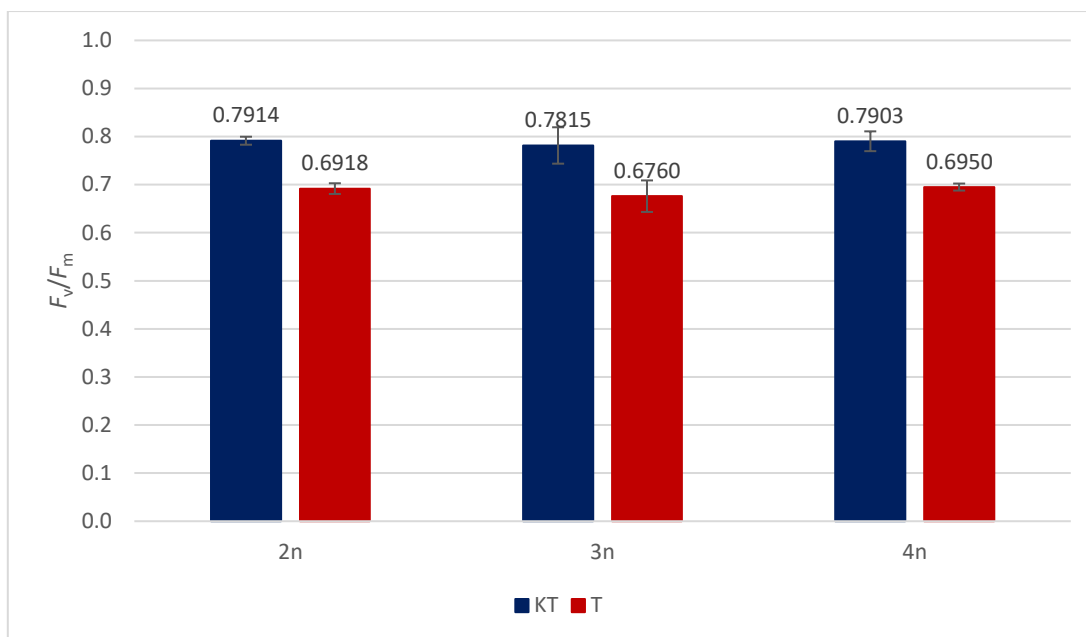
4.2. Fluorescencija klorofila kao pokazatelj stresa

Odmah po završetku izlaganja biljaka različitog stupnja ploidnosti temperaturnom stresu na 45°C u trajanju od 3 h, vrijednosti maksimalne fotokemijske efikasnosti (F_v/F_m) pokazale su statistički značajnu razliku između tretiranih i kontrolnih biljaka svih ispitivanih stupnjeva ploidnosti. Uspoređujući vrijednosti dobivene kod tretiranih triploida i tetraploida s onima dobivenima kod tretiranih diploida, također je uočena statistički značajna razlika. Statistička značajnost svih rezultata određena je t-testom ($P < 0,05$).



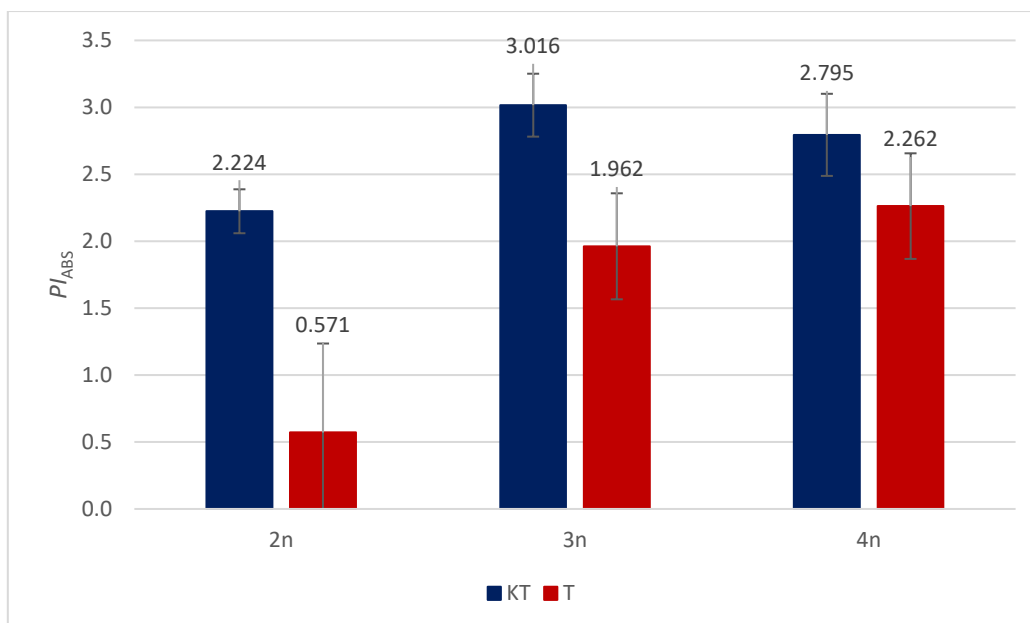
Slika 3. Vrijednosti maksimalne fotokemijske efikasnosti (F_v/F_m) uročnjaka kod biljaka različitog stupnja ploidnosti odmah nakon izlaganja temperaturnom stresu od 45°C u trajanju od 3 h i pripadajuće vrijednosti za kontrolne biljke. Svaki stupac označava srednju vrijednost osam bioloških replika. Na stupcima je označena standardna devijacija. KT – kontrolne biljke, T – tretirane biljke.

Izmjerenim vrijednostima F_v/F_m 72 h nakon izlaganja stresu nisu uočene statistički značajne razlike ni između kontrolnih i tretiranih biljaka pojedinog stupnja ploidnosti niti usporedbom vrijednosti dobivenih kod tretiranih poliploida s onima kod tretiranih diploida. Međutim, unatoč tome što rezultati nisu statistički značajni vidljiva je niža vrijednost F_v/F_m kod tretiranih biljaka svih stupnjeva ploidnosti u odnosu na njihove kontrolne biljke.



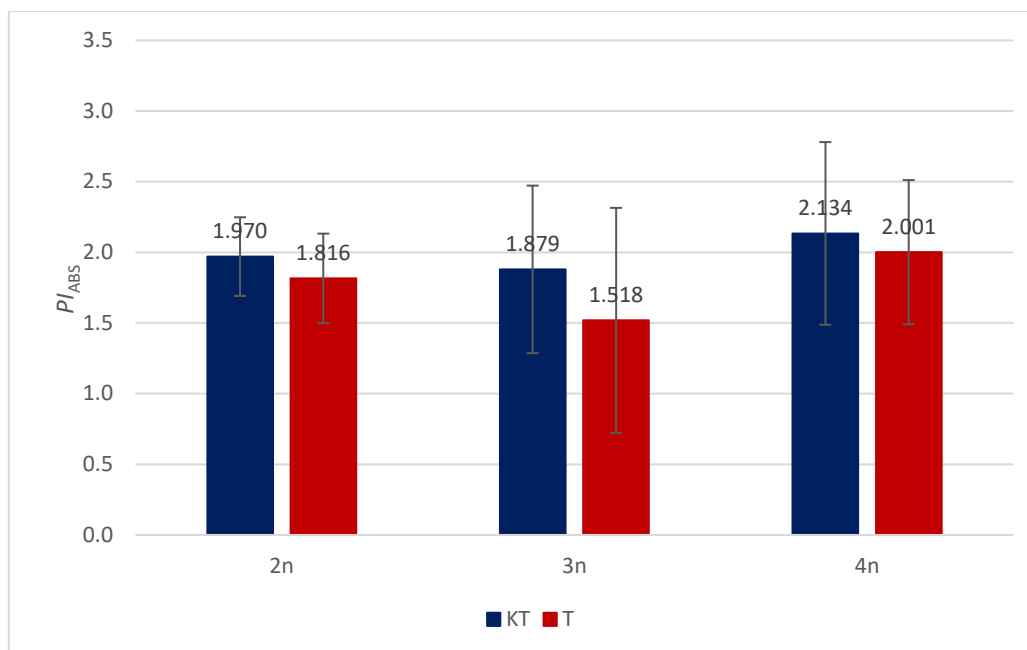
Slika 4. Vrijednosti maksimalne fotokemijske efikasnosti (F_v/F_m) vrste *Arabidopsis thaliana* kod biljaka različitog stupnja ploidnosti 72 h nakon izlaganja temperaturnom stresu od 45°C u trajanju od 3 h i pripadajuće vrijednosti za kontrolne biljke. Svaki stupac označava srednju vrijednost osam bioloških replika. Na stupcima je označena standardna devijacija. KT – kontrolne biljke, T – tretirane biljke.

Nadalje, mjerenjem apsolutnog indeksu performansa (PI_{ABS}) kod izlaganja biljaka različitog stupnja ploidnosti istom temperaturnom stresu uočena je razlika između tretiranih i kontrolnih biljaka kod svih ispitivanih stupnjeva ploidnosti, a koja je bila statistički značajna. Usporedbom vrijednosti dobivenih kod tretiranih tetraploida i triploida s onima dobivenima kod tretiranih diploida, također je uočena statistički značajna razlika.



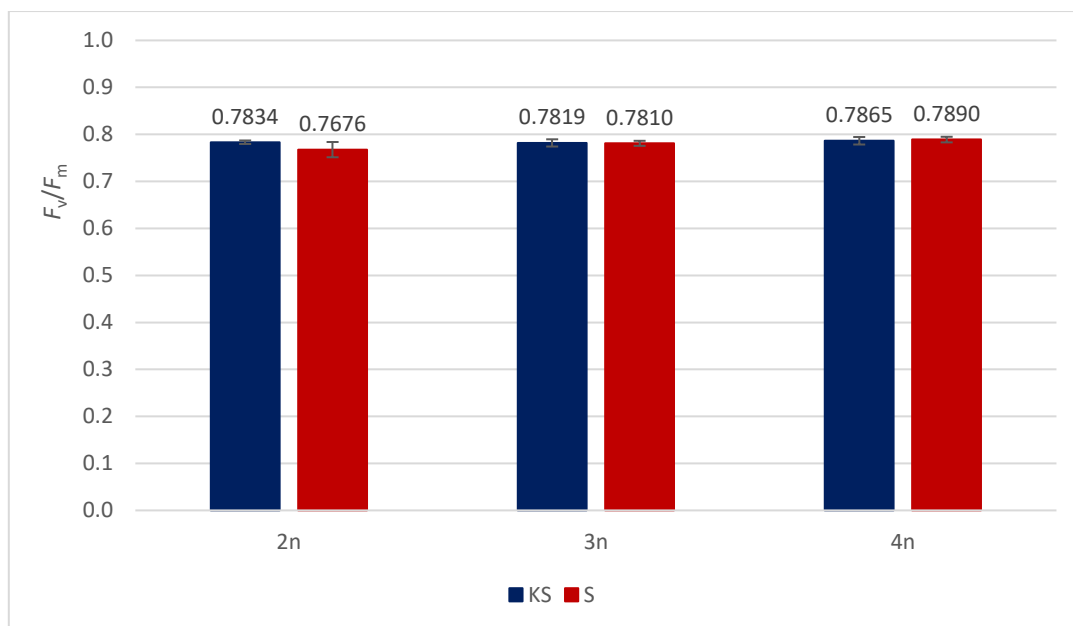
Slika 5. Vrijednosti apsolutnog indeksa performansa (PI_{ABS}) vrste *Arabidopsis thaliana* kod biljaka različitog stupnja ploidnosti odmah nakon izlaganja temperaturnom stresu od 45°C u trajanju od 3 h i pripadajuće vrijednosti za kontrolne biljke. Svaki stupac označava srednju vrijednost osam bioloških replika. Na stupcima je označena standardna devijacija. KT – kontrolne biljke, T – tretirane biljke.

Izmjerenim vrijednostima PI_{ABS} 72 h nakon izlaganja stresu nisu uočene statistički značajne razlike između kontrolnih i tretiranih biljaka pojedinog stupnja ploidnosti. Također, usporedbom vrijednosti dobivenih kod tretiranih poliploida s onima kod tretiranih diploida nisu uočene statistički značajne razlike..



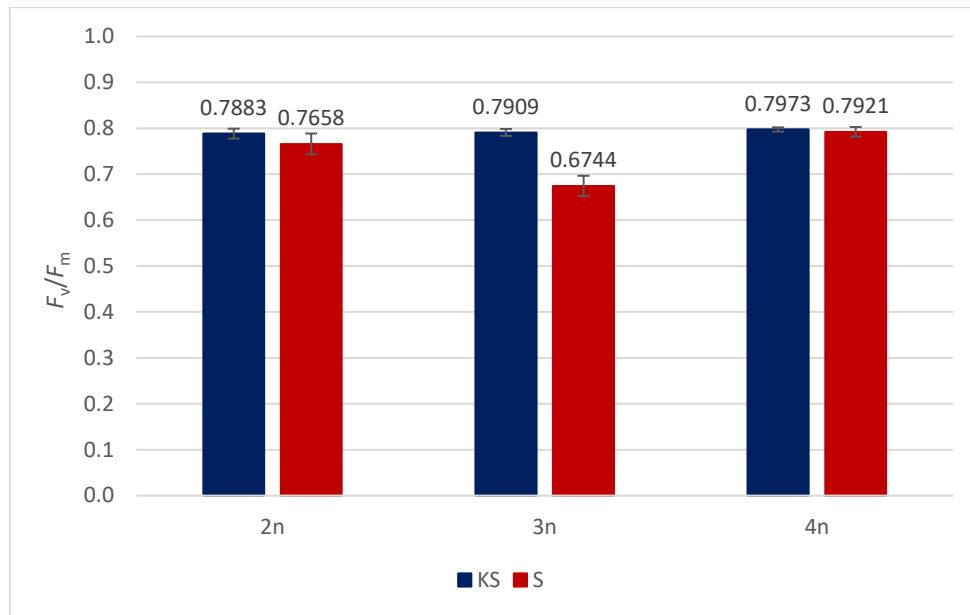
Slika 6. Vrijednosti apsolutnog indeksa performansa (PI_{ABS}) vrste *Arabidopsis thaliana* kod biljaka različitog stupnja ploidnosti 72 h nakon izlaganja temperaturnom stresu od 45°C u trajanju od 3 h i pripadajuće vrijednosti za kontrolne biljke. Svaki stupac označava srednju vrijednost osam bioloških replika. Na stupcima je označena standardna devijacija. KT – kontrolne biljke, T – tretirane biljke.

Biljke različitog stupnja ploidnosti izložene su solnom stresu zalijevanjem s 300 mM otopinom natrijevog klorida. Mjerenjem 24 h nakon izlaganja solnom stresu, vrijednosti maksimalne fotokemijske efikasnosti (F_v/F_m) kod diploidnih biljki pokazale su statistički značajnu razliku između tretiranih i kontrolnih biljaka. U slučaju triploida i tetraploida, usporedbom kontrolnih i tretiranih biljaka nije uočena razlika koja je bila statistički značajna. Uspoređujući vrijednosti dobivene kod tretiranih poliploida s onima dobivenima kod tretiranih diploida, uočena je statistički značajna razlika.



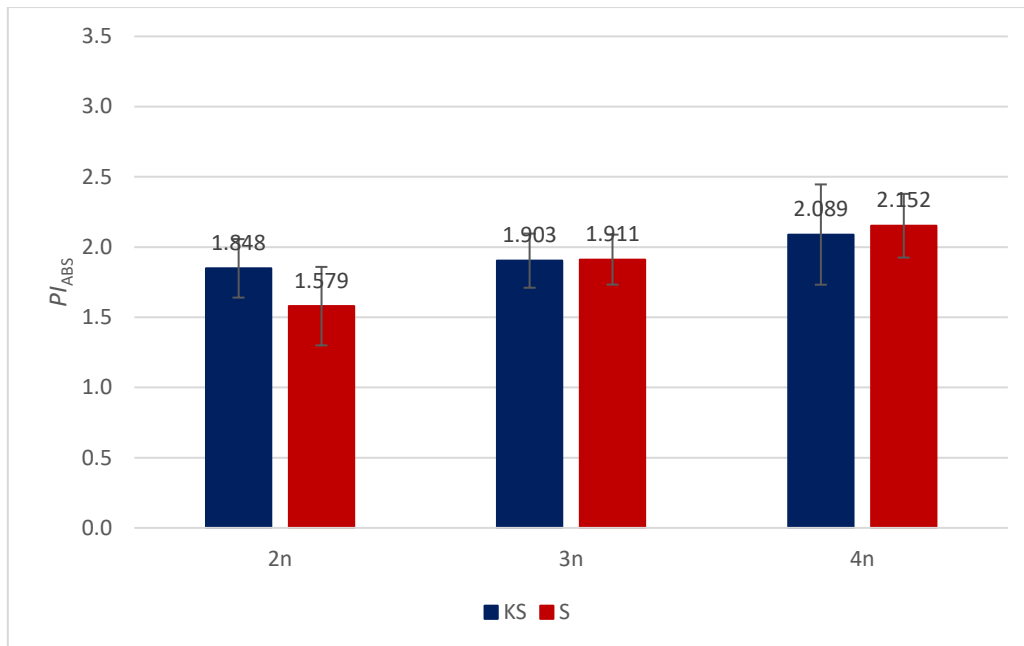
Slika 7. Vrijednosti maksimalne fotokemijske efikasnosti (F_v/F_m) vrste *Arabidopsis thaliana* kod biljaka različitog stupnja ploidnosti 24 h nakon izlaganja solnom stresu zalijevanjem s 300 mM otopinom natrijevog klorida i pripadajuće vrijednosti za kontrolne biljke. Svaki stupac označava srednju vrijednost osam bioloških replika. Na stupcima je označena standardna devijacija. KS – kontrolne biljke, S – tretirane biljke.

Izmjerenim vrijednostima F_v/F_m 48 h nakon izlaganja stresu uočena je statistički značajna razlika između kontrolnih i tretiranih diploidnih biljaka, dok u slučaju poliploida razlika između kontrolnih i tretiranih biljaka nije bila statistički značajna. Međutim, unatoč rezultatima koji nisu značajni, tretiranih triploidne biljke pokazuju manju vrijednost F_v/F_m u odnosu na kontrolne biljke. Usporedbom vrijednosti dobivenih kod tretiranih poliploida s onima dobivenima kod tretiranih diploida, statistički značajna razlika je uočena samo između tetraploida i diploida.



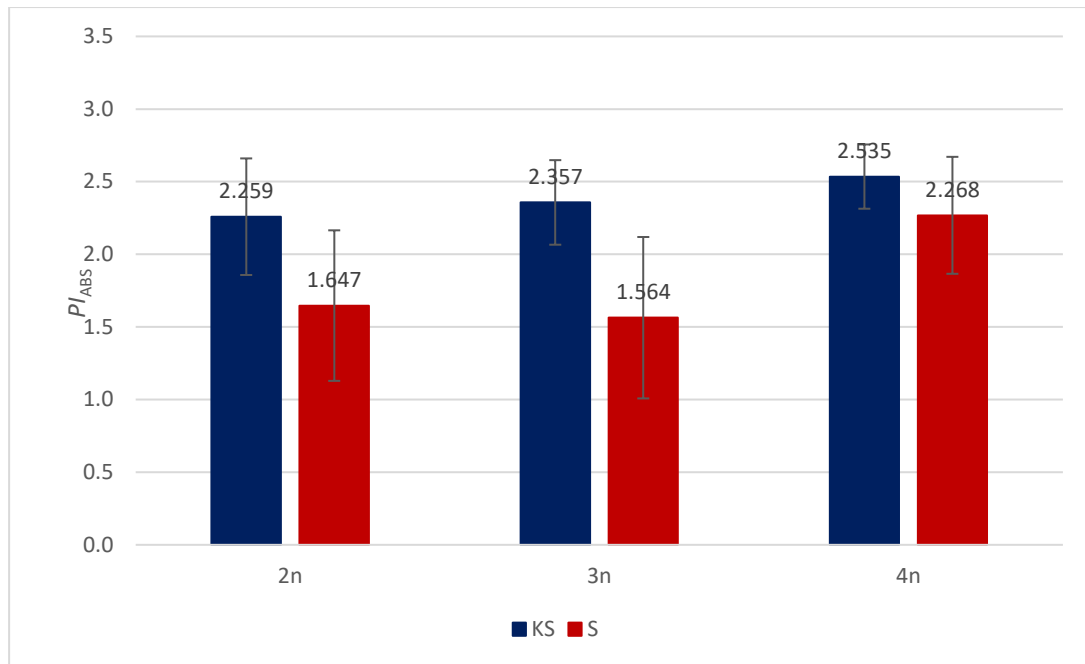
Slika 8. Vrijednosti maksimalne fotokemijske efikasnosti (F_v/F_m) vrste *Arabidopsis thaliana* kod biljaka različitog stupnja ploidnosti 48 h nakon izlaganja solnom stresu zalijevanjem s 300 mM otopinom natrijevog klorida i pripadajuće vrijednosti za kontrolne biljke. Svaki stupac označava srednju vrijednost osam bioloških replika. Na stupcima je označena standardna devijacija. KS – kontrolne biljke, S – tretirane biljke.

Mjerenjem apsolutnog indeksa performansa (PI_{ABS}) 24 h nakon izlaganja solnom stresu, dobivene vrijednosti kod diploidnih biljki pokazale su statistički značajnu razliku između tretiranih i kontrolnih biljaka. Usporedbom kontrolnih i tretiranih biljaka triploida i tetraploida nije uočena razlika koja je bila statistički značajna. Vrijednosti dobivene kod tretiranih triploida i tetraploida uspoređene su s onima dobivenima kod tretiranih diploida i među njima je uočena statistički značajna razlika.



Slika 9. Vrijednosti apsolutnog indeksa performansa (PI_{ABS}) vrste *Arabidopsis thaliana* kod biljaka različitog stupnja ploidnosti 24 h nakon izlaganja solnom stresu zalijevanjem s 300 mM otopinom natrijevog klorida i pripadajuće vrijednosti za kontrolne biljke. Svaki stupac označava srednju vrijednost osam bioloških replika. Na stupcima je označena standardna devijacija. KS – kontrolne biljke, S – tretirane biljke.

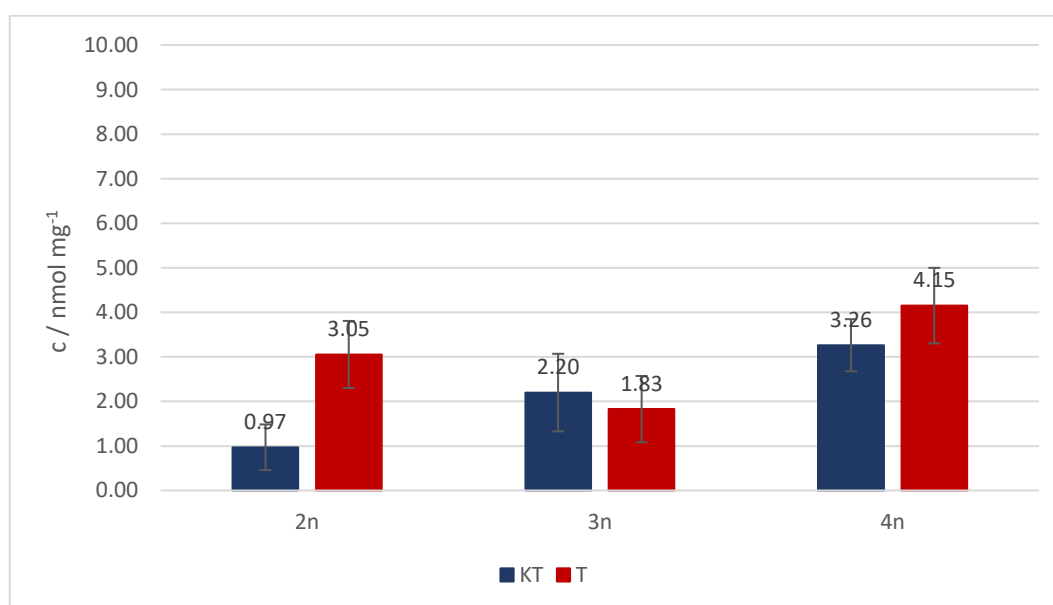
Izmjerene vrijednosti 48 h nakon izlaganja stresu pokazuju statistički značajnu razliku između kontrolnih i tretiranih diploidnih biljaka. Međutim, tretirane triploidne i tetraploidne biljke pokazuju manju vrijednost PI_{ABS} u odnosu na kontrolne biljke iako ta razlika nije statistički značajna. Usporedbom vrijednosti dobivenih kod tretiranih triploida odnosno tetraploida s onima dobivenima kod tretiranih diploida, statistički značajna razlika je uočena samo između diploida i tetraploida.



Slika 10. Vrijednosti apsolutnog indeksa performansa (PI_{ABS}) vrste *Arabidopsis thaliana* kod biljaka različitog stupnja ploidnosti 48 h nakon izlaganja solnom stresu zalijevanjem s 300 mM otopinom natrijevog klorida i pripadajuće vrijednosti za kontrolne biljke. Svaki stupac označava srednju vrijednost osam bioloških replika. Na stupcima je označena standardna devijacija. KS – kontrolne biljke, S – tretirane biljke.

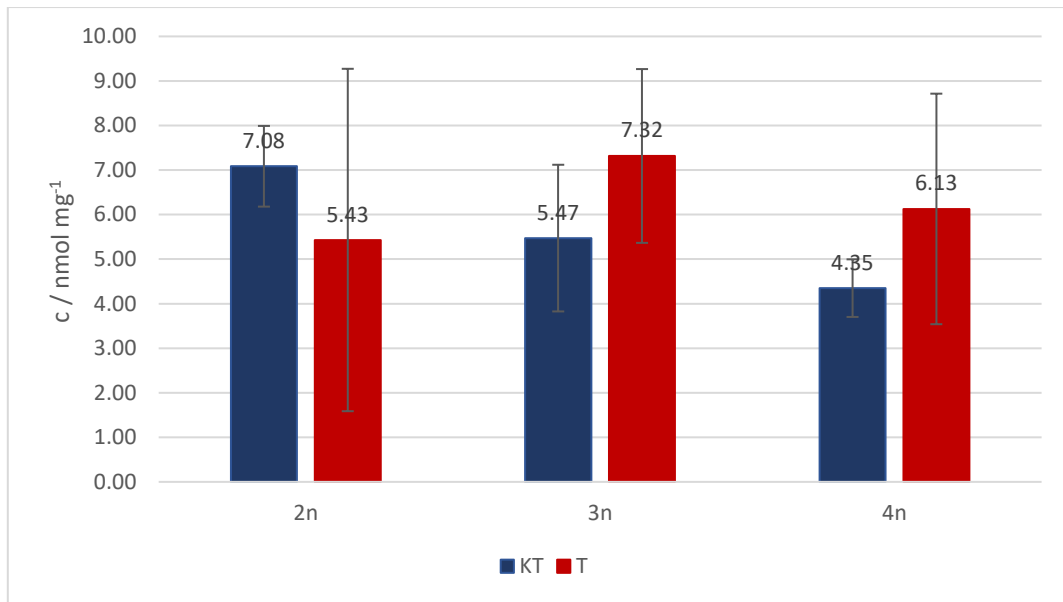
4.3. Koncentracija prolina kao pokazatelj stresa

Koncentracija prolina mjerena je iz uzoraka uzetih neposredno i 72 h nakon izlaganja toplinskom stresu na 45°C u trajanju od 3 h. Usporedbom koncentracije prolina, izmjerene neposredno nakon stresa, kod kontrolnih i tretiranih biljaka uočena je statistički značajna razlika samo u slučaju diploida. Triploidi i tetraploidi nisu pokazali statistički značajnu razliku između kontrolnih i tretiranih biljaka. Uspoređivanjem vrijednosti dobivenih kod tretiranih diploida s onima kod tretiranih poliploida također nije uočena razlika koja je statistički značajna. Vidljiv je veliki rasap izmjerenih vrijednosti. Statistička značajnost svih rezultata određena je t-testom ($P < 0,05$).



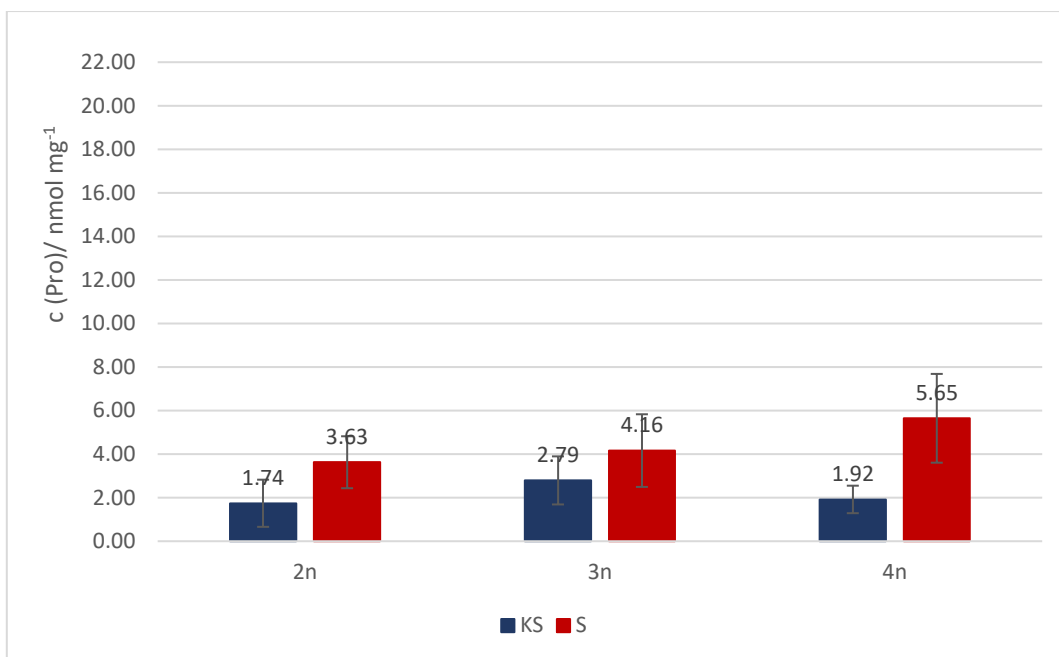
Slika 11. Koncentracija prolina kod biljaka različitog stupnja ploidnosti vrste *Arabidopsis thaliana* izmjerena neposredno nakon izlaganja temperaturnom stresu od 45°C u trajanju od 3 h i pripadajuće vrijednosti za kontrolne biljke. Svaki stupac označava srednju vrijednost četiri biološke replike. Na stupcima je označena standardna devijacija. KT – kontrolne biljke, T – tretirane biljke.

Koncentracija prolina 72 h nakon stresa između kontrolnih i tretiranih biljaka ispitivanih stupnjeva ploidnosti ne pokazuje statistički značajnu razliku. Usporedbom vrijednosti dobivenih kod tretiranih diploida sa tretiranim triploidima, odnosno tetraploidima također nije uočena statistički značajna razlika. Kao i u prethodnom slučaju vidljiv je veliki rasap rezultata.



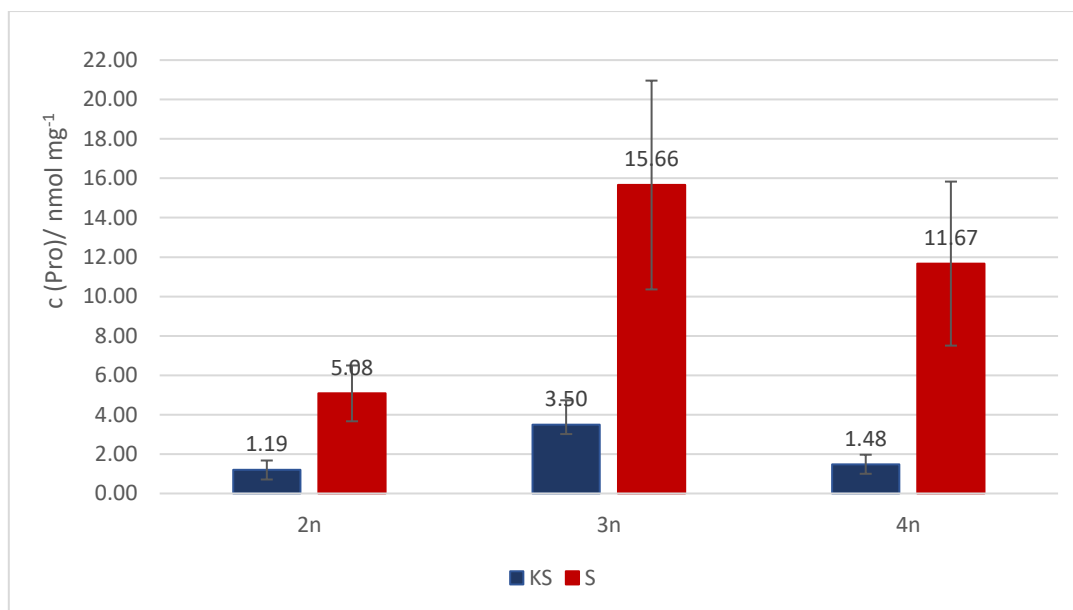
Slika 12. Koncentracija prolina kod biljaka različitog stupnja ploidnosti vrste *Arabidopsis thaliana* izmjerena 72 h nakon nakon izlaganja temperaturnom stresu od 45°C u trajanju od 3 h i pripadajuće vrijednosti za kontrolne biljke. Svaki stupac označava srednju vrijednost četiri biološke replike. Na stupcima je označena standardna devijacija. KT – kontrolne biljke, T – tretirane biljke.

Biljkama koje su bile izložene solnom stresu zalijevanjem s 300 mM otopinom natrijevog klorida, određena je koncentracija prolina 24 h i 48 h nakon izlaganja stresu. Razlika u koncentraciji prolina između kontrolnih i tretiranih biljaka 24 h nakon izlaganja stresu pokazala se statistički značajna kod diploidnih i tetraploidnih biljaka, dok kod triploida nije uočljiva statistička značajnost. Usporedbom koncentracije prolina kod tretiranih diploida i tretiranih poliploida 24 h nakon izlaganja stresu nije uočena razlika koja je statistički značajna. Međutim, uočen je trend porasta koncentracije prolina s porastom stupnja ploidnosti.



Slika 13. Koncentracija prolina kod biljaka različitog stupnja ploidnosti vrste *Arabidopsis thaliana* izmjerena 24 h nakon nakon izlaganja solnom stresu zalijevanjem s 300 mM otopinom natrijevog klorida i pripadajuće vrijednosti za kontrolne biljke. Svaki stupac označava srednju vrijednost četiri biološke replike. Na stupcima je označena standardna devijacija. KS – kontrolne biljke, S – tretirane biljke.

Mjerenjem 48 h nakon izlaganja stresu uočena je statistički značajna razlika u koncentraciji prolina između kontrolnih i tretiranih biljaka za svaki ispitivani stupanj ploidnosti. Također, usporedbom koncentracije prolina kod tretiranih diploidnih biljki i tretiranih triploida te tetraploida, uočena je razlika koja je statistički značajna.



Slika 14. Koncentracija prolina kod biljaka različitog stupnja ploidnosti vrste *Arabidopsis thaliana* izmjerena 48 h nakon izlaganja solnom stresu zalijevanjem s 300 mM otopinom natrijevog klorida i pripadajuće vrijednosti za kontrolne biljke. Svaki stupac označava srednju vrijednost četiri biološke replike. Na stupcima je označena standardna devijacija. KS – kontrolne biljke, S – tretirane biljke.

4.4. 2D elektroforeza u poliakrilamidnom gelu i računalna analiza

2D SDS-PAGE provedena je s po tri uzorka, jednim za svaku promatranu ploidnost (2n, 3n i 4n), za toplinski i solni stres, uz pripadajuće kontrole. Uzorci za toplinski stres uzorkovani su 72 h nakon izlaganja stresu, dok su uzorci za solni stres uzorkovani 48 h nakon izlaganja stresu. Proteinske su mrlje vizualizirane bojom *Coomassie Brilliant Blue* (Sigma Aldrich, USA).

Za analizu skeniranih gelova korišten je program *ImageMaster 2D Platinum* koji nam je poslužio za automatsku detekciju proteinskih mrlja i njihovo uparivanje (engl. *matching*) i usporedbu na različitim gelovima. Gelovi nastali elektroforezom uzoraka toplinski i solno tretiranih biljaka analizirani su odvojeno. Na temelju te analize odabrano je osam uzoraka proteinskih mrlja koji su identificirani masenom spektrometrijom uređajem MALDI-TOF, po četiri za svaki tip stresa. Veći broj uzoraka nije bilo moguće analizirati zbog financijskih ograničenja. Za daljnju analizu odabrane su proteinske mrlje koje su pokazale veliku razliku u intenzitetu, a koje su odgovarale literaturnim podacima o molarnoj masi i pI vrijednosti za stres

bitnih proteina. Kako bi se osigurala adekvatna preciznost u označavanju mrlja od interesa, za njih je provedena i ručna kontrola detekcije programa *ImageMaster*. Kvantifikacija proteina unutar jedne mrlje učinjena je programskim mjerenjem volumena, gdje je izmjerena površina mrlje u mm² pomnožena s postotnom vrijednosti intenziteta obojenja mrlje, koja ima funkciju treće dimenzije volumena. Sama veličina nema mjernu jedinicu.

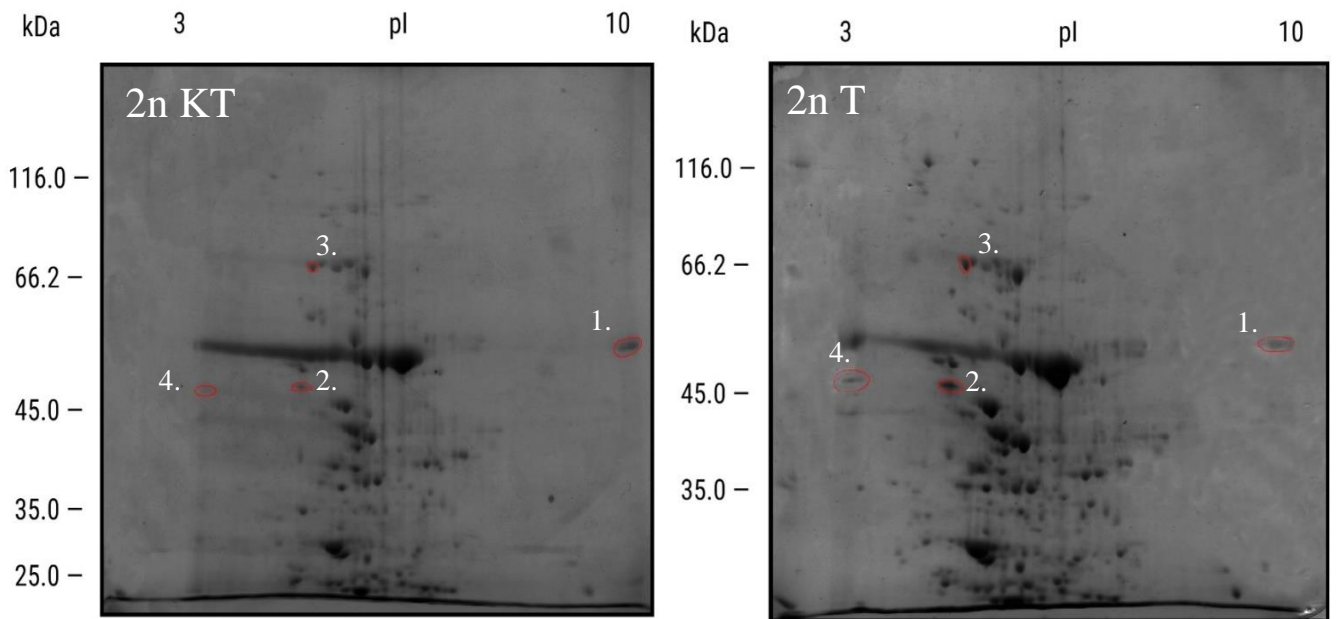
U Tablici 7. prikazani su omjeri izmjerenih volumena proteinskih mrlja uzoraka poliploidnih biljaka izloženih temperaturnom stresu od 45°C tijekom 3 h i pripadajućih kontrola. Omjer koji se znatno razlikuje od 1 svjedoči bitnoj razlici u ekspresiji među uspoređivanim mrljama. U ovom slučaju kao referenca uzete su vrijednosti kontrolnih skupina, pa omjer veći od 1 označava veću ekspresiju proteina u tretiranoj biljci u odnosu na kontrolnu, dok broj manji od 1 označava manju ekspresiju u tretiranoj biljci u usporedbi s kontrolnom.. U Tablici 8. prikazani su analogni podaci za biljke izložene solnom stresu i njihove kontrole.

Tablica 7. Omjer volumena mrlja identificiranih proteina uzoraka biljaka izloženih toplinskom stresu od 45°C tijekom 3 h i pripadajućih kontrola. Oznake 2n, 3n i 4n označavaju ploidnost biljke, KT označava kontrolnu biljku, a T označava biljku izloženu toplinskom stresu.

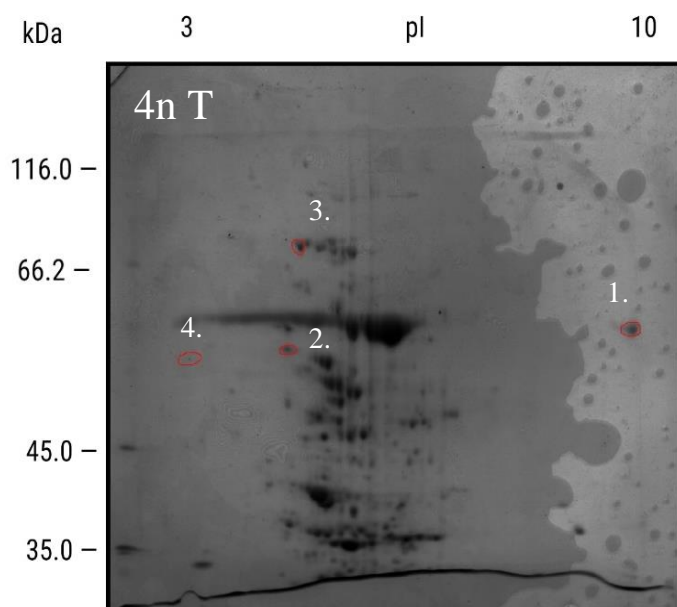
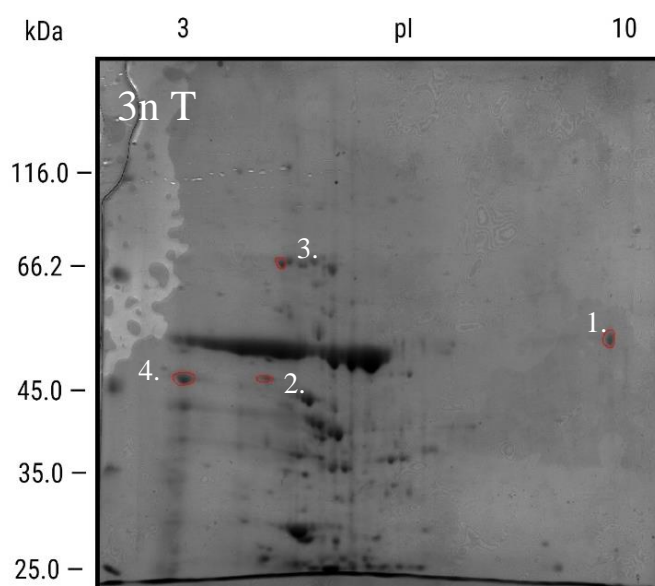
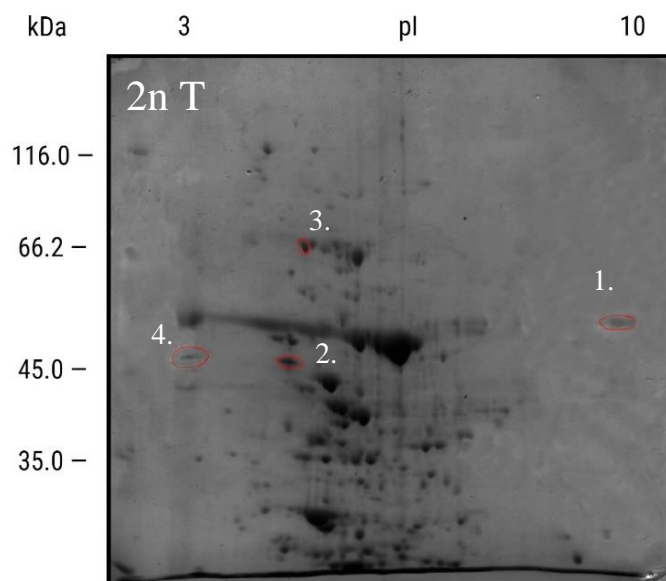
Broj uzorka	Omjer volumena 2nT/2nKT	Omjer volumena 3nT/3nKT	Omjer volumena 4nT/4nKT
1.	0,3945	0,3012	1,2671
2.	2,4662	4,4988	0,7704
3.	2,1009	1,7031	2,0966
4.	1,2581	4,8661	0,3335

Tablica 8. Omjer volumena mrlja identificiranih proteina uzoraka biljaka izloženih solnom stresu zalijevanjem otopinom 300 mM NaCl i pripadajućih kontrola. Oznake 2n, 3n i 4n označavaju ploidnost biljke, KS označava kontrolnu biljku, a S označava biljku izloženu solnom stresu.

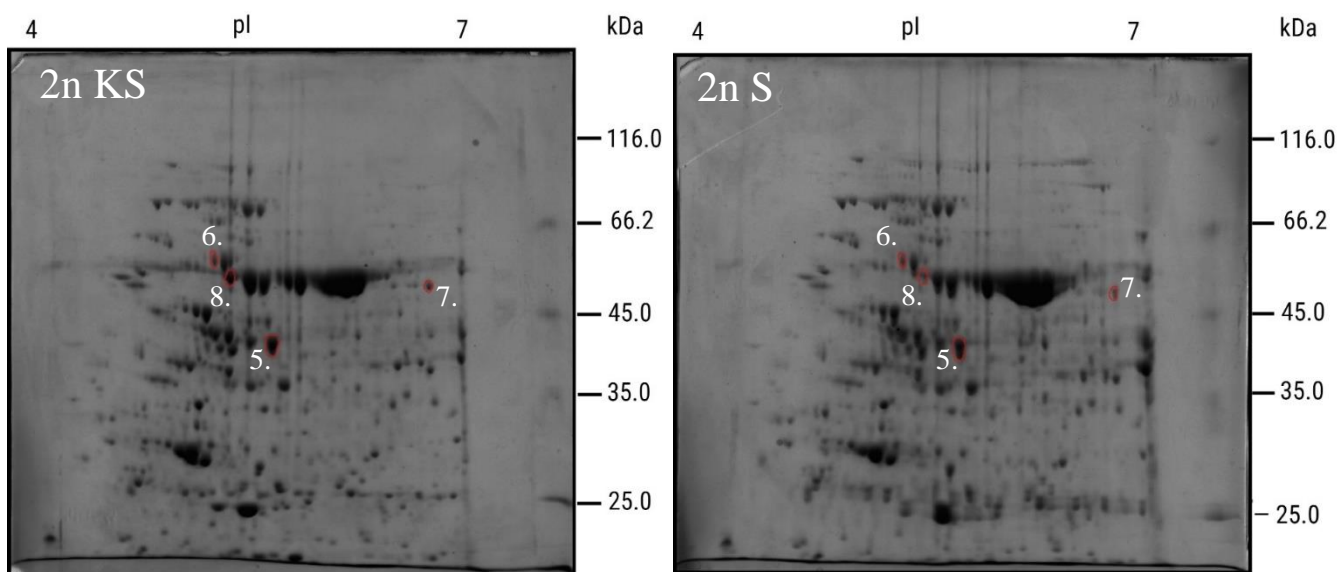
Broj uzorka	Omjer volumena 2nS/2nKS	Omjer volumena 3nS/3nKS	Omjer volumena 4nS/4nKS
5.	1,3085	0,7005	1,0339
6.	1,1160	2,3662	0,6982
7.	1,1034	0,7617	1,0819
8.	0,4082	1,8015	0,8859



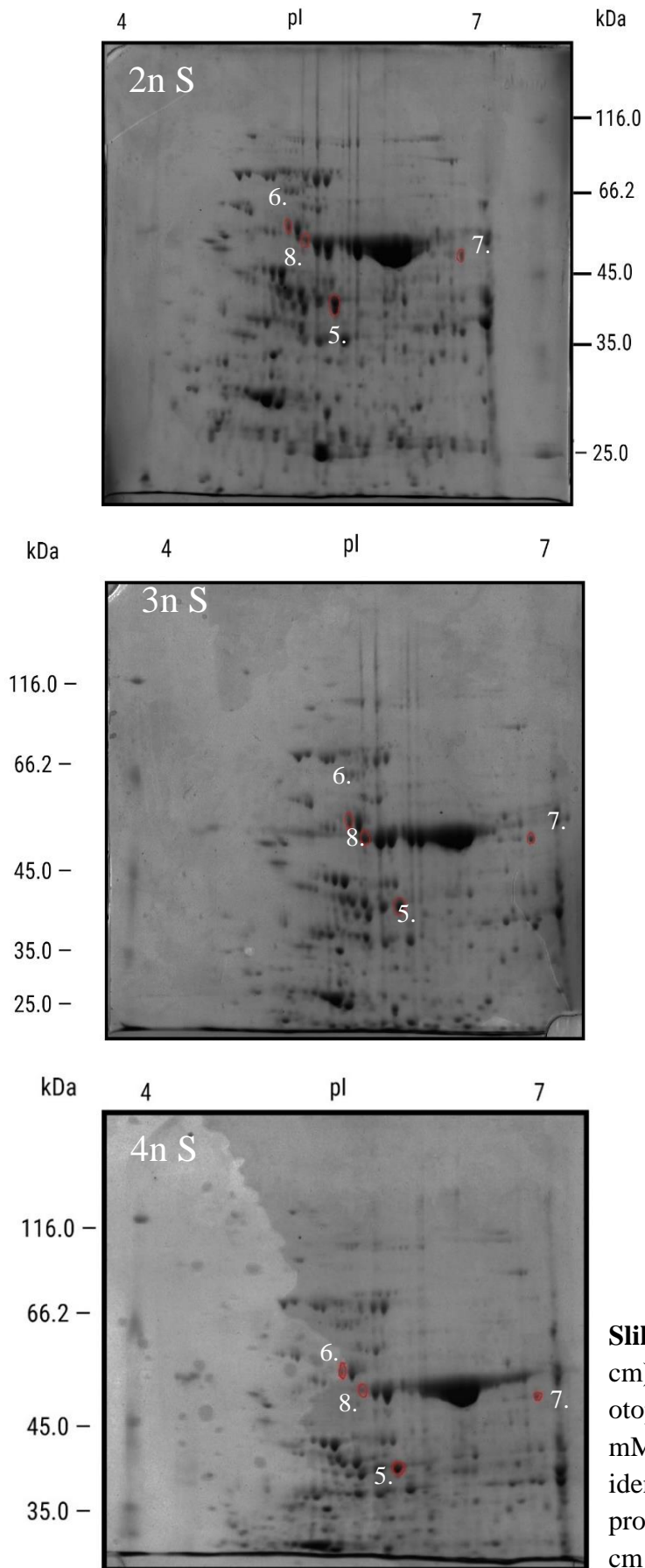
Slika 15. 2D PAGE gelovi uzorka diploidne biljke izložene temperaturnom stresu od 45°C u trajanju od 3 h uz pripadnu kontrolu. S lijeve strane je uzorak kontrolne, a s desne tretirane biljke. Brojevima 1. – 4. označeni su identificirani uzorci od interesa. IEF je provedeno na trakicama duljine 13 cm i pH raspona 3-10. Gel za SDS-PAGE debljine je 0,75 cm. KT – kontrolna biljka, T – tretirana biljka.



Slika 16. 2D PAGE gelovi uzoraka biljki izloženih temperaturnom stresu od 45°C u trajanju od 3h. Brojevima 1. – 4. označeni su identificirani uzorci od interesa. IEF je provedeno na trakicama duljine 13 cm i pH raspona 3-10. Gel za SDS-PAGE debljine je 0,75 cm. T – tretirana biljka.



Slika 17. 2D PAGE gelovi uzoraka diploidne biljke tretirane otopinom natrijeva klorida ($c = 300 \text{ mM}$) s pripadajućom kontrolom. Brojevima 5. – 8. označeni su identificirani uzorci od interesa. IEF provedeno je na trakicama duljine 18 cm i pH 4-7. Gel za SDS-PAGE debljine je 0,75 cm. KS – kontrolna biljka, S – tretirana biljka.



Slika 18. 2D SDS-PAGE gelovi (0,75 cm) uzoraka biljaka tretiranih otopinom natrijeva klorida ($c = 300$ mM). Brojevima 5. – 8. označeni su identificirani uzorci od interesa. IEF provedeno je na trakicama duljine 18 cm i pH 4-7.

U Tablici 9. prikazani su programski izračunati volumeni proteinskih mrlja za biljke tretirane toplinskim stresom. Uspoređena je ekspresija proteina od interesa u tretiranim poliploidnim biljkama s onom kod tretiranih diploida. Rezultati su usporedivi zato što je na svaki gel nanesena jednaka masa izoliranih ukupnih proteina. U Tablici 10. prikazani su analogni podaci za proteinske mrlje od interesa kod biljaka izloženih solnom stresu.

Tablica 9. Diferencijalna ekspresija četiriju identificiranih proteina kod biljaka tretiranih temperaturom od 45°C u trajanju od 3 sata. Strelica prema gore između poliploida i diploida označava nadekspimiranost proteina u odnosu na diploida, dok strelica uperena prema dolje znači manju ekspresiju u odnosu na diploida.

Broj uzorka	Volumen mrlje	Relativna ekspresija	Volumen mrlje	Relativna ekspresija	Volumen mrlje
	3n T		2n T		4n T
1.	21,1198	-	21,1871	↑	47,7674
2.	10,0316	↓	32,9035	↓	18,5064
3.	17,7087	↓	26,6486	↑	29,2735
4.	51,1399	↑	19,2608	↓	4,45263

Tablica 10. Diferencijalna ekspresija četiriju identificiranih proteina kod biljaka tretiranih s 300 mM otopinom natrijeva klorida. Strelica prema gore između poliploida i diploida označava nadekspimiranost proteina u odnosu na diploida, dok strelica uperena prema dolje znači manju ekspresiju u odnosu na diploida.

Broj uzorka	Volumen mrlje	Relativna ekspresija	Volumen mrlje	Relativna ekspresija	Volumen mrlje
	3n S		2n S		4n S
5.	51,2678	↓	65,2919	↓	60,6280
6.	12,3193	↑	10,8297	↑	14,9568
7.	11,7888	↑	9,51844	-	9,95286
8.	24,6241	↑	14,3599	-	14,4623

4.5. Identifikacija proteina masenom spektrometrijom

Iz gelova su izolirane proteinske mrlje od interesa, proteini iz mrlja su digerirani i potom identificirani metodom MALDI-TOF. Određivanje najzastupljenijeg proteina u uzorku učinjeno je usporedbom parametara *Abundance*, *PSM* i *Score Sequest* te odabirom značajno više zastupljenih peptida. Rezultati su prikazani u Tablici 11. Parametri *Abundance*, *PSM* i *Score Sequest* za svaki uzorak prikazani su tablicama u poglavlju Prilog.

Tablica 11. Proteini identificirani metodom MALDI-TOF izolirani iz poliakrilamidnih gelova dobivenih 2D elektroforezom.

Redni broj uzorka*	Ime proteina	Identifikacijski kod proteina (engl. <i>Accession</i>)	M_w / kDa	pI
1., 8.	<i>ribulose biphosphate carboxylase large chain</i>	O03042	52,9	6,29
4., 5.	<i>ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase activase, chloroplastic</i>	P10896	51,9	6,15
2.	<i>dehydrin COR47</i>	P31168	29,9	4,77
3.	<i>heat shock 70 kDa protein 6, chloroplastic</i>	Q9STW6	76,5	5,20
3.	<i>heat shock 70 kDa protein 4</i>	Q9LHA8	71,1	5,25
6.	<i>ATP synthase subunit alpha, chloroplastic</i>	P56757	55,3	5,25
4., 6.	<i>ATP synthase subunit beta, chloroplastic</i>	P19366	53,9	5,5
7.	<i>glutamate-glyoxylate aminotransferase 1</i>	Q9LR30	53,3	6,89
7.	<i>glutamate-glyoxylate aminotransferase 2</i>	Q9S7E9	53,4	6,58

* Više brojeva za jedan protein označavaju iste proteine identificirane u više od jednog uzorka

U uzorcima 1. i 8. detektirana je velika podjedinica RUBISCO-a. RUBISCO je enzim ključan za fotosintetsku aktivnost biljaka zbog svoje karboksilazne aktivnosti kojom fiksira ugljikov dioksid iz atmosfere u za biljku iskoristive šećere poput glukoze (Andersson i Backlund, 2008). U uzorku 2. identificiran je dehidrin COR47. On ima bitnu ulogu u aklimatizaciji biljke na

hladnoću i toplinu, te u odgovoru na sušni stres (Lim i sur., 2006). U uzorku 3. identificirani su proteini HSP70 6 i 4. Njihova uloga u biljnoj stanici je široka: održavanje strukture proteina i njihova lokalizacija, šaperonska aktivnost, sprječavanje agregacije proteina u nepovoljnim uvjetima itd (Rocco i sur. 2013; Kosová i sur. 2011; Lin i sur. 2001). Uzorci 4. i 6. sadržavali su β podjedinicu ATP sintaze, dok je u 6. uzorku identificirana i njena α podjedinica. To je enzim s ključnom ulogom u energetske metabolizmu gotovo svih živih bića. Njegova uloga sastoji se u proizvodnji ATP-a iz ADP-a korištenjem transmembranskog protonskog gradijenta (Neupane i sur., 2019). U 4. uzorku još je identificirana i RUBISCO aktivaza, koja je pronađena i u uzorku 5. Njena uloga sastoji se od šaperonske aktivnosti kojom omogućava normalnu katalitičku aktivnost RUBISCO-a (Portis, 2003). U uzorku 7. identificirane su glutamat-glioksilat aminotransferaze 1 i 2. Njihova uloga u biljnoj stanici sastoji se od kataliziranja reakcije pretvorbe glutamata i glioksilata u glicin i 2-oksoglutarat, što je proces za koji se vjeruje kako ima važnu ulogu u održavanju aminokiselinske homeostaze (Igarashi i sur., 2006).

5. Rasprava

Unatoč spomenutim problemima globalnog zatopljenja i zasoljavanja tla povezanog s navodnjavanjem, relativno je malo znanstvenih istraživanja koji se bave specifičnim razlikama stresnog odgovora poliploida uročnjaka u odnosu na diploide. Prema našem saznanju, ne postoje druga istraživanja koja se bave tematikom utjecaja poliploidije na stresni odgovor biljaka i na razini proteoma i mjerenjem fizioloških parametara povezanih sa stresom. Primjerice, Chao i sur. 2013. su godine istraživali toleranciju autotetraploida na solni stres, međutim ograničili su se na praćenje stope preživljenja i reproduktivnog uspjeha biljaka u stresnim uvjetima, ali ne i na ekspresiju proteina vezanih za stres.

Da bismo pratili utjecaj toplinskog i solnog stresa na fotosintezu, koristili smo OJIP test. Namjera je dijelom bila potvrditi stres biljaka već provjerenim metodama, a dijelom ispitati moguće razlike u toleranciji diploidnih i poliploidnih biljaka na stres. Poznato je da je fotosintetski aparat jedan od najosjetljivijih na stresne uvjete, pri kojima dolazi do oštećenja membrane kloroplasta, fotosustava II i RUBISCO aktivaze te cikličkog transporta elektrona (Allakhverdiev i sur., 2008; Sharkey, 2005; Shu i sur., 2012). Te promjene utječu na parametre OJIP krivulje, smanjujući maksimalni intenzitet fluorescencije (F_m) i povećavajući minimalni (F_0). Do povećanja F_0 moglo bi doći uslijed otpuštanja LHC II iz fotosustava II, inaktivacije samog fotosustava II ili ometanja transporta elektrona, dok bi do sniženja F_m moglo doći zbog denaturacije klorofil-vezanih proteina (Kalaji i sur., 2016).

Statistička značajnost razlike dobivenih vrijednosti maksimalne fotokemijske efikasnosti (F_v/F_m) i apsolutnog indeksa performansa (PI_{ABS}) određena je t-testom. Uspoređivani su rezultati dobiveni kod kontrolnih i tretiranih biljaka svake ploidnosti. Također, da bi se utvrdila razlika u vrijednostima pojedinih parametara u ovisnosti o stupnju ploidnosti, uspoređivani su rezultati dobiveni kod tretiranih diploidnih biljaka s rezultatima kod tretiranih poliploida. Vrijednosti F_v/F_m izmjerene odmah nakon izlaganja biljaka toplinskom stresu (45°C, 3 h) pokazale su statistički značajnu razliku između kontrolnih i tretiranih svih biljaka stupnjeva ploidnosti (2n, 3n i 4n), što ukazuje da su biljke u našim eksperimentalnim uvjetima zaista pretrpjele stres. Rezultati apsolutnog indeksa performansa PI_{ABS} također su pokazali statistički značajnu razliku između kontrolnih i tretiranih biljaka svakog stupnja ploidnosti, iz čega proizlazi činjenica da je i vitalnost biljke pogođena toplinskim stresom. Promatrajući razliku u vrijednosti F_v/F_m neposredno nakon stresa između tretiranih diploida i poliploida, a koja je statistički značajna, može se zaključiti da je fotosintetski aparat poliploida bio značajno manje

oštećen pod utjecajem toplinskog stresa. Značajno veće vrijednosti PI_{ABS} kod triploidnih i tetraploidnih biljaka u odnosu na diploidne ukazuju na veću vitalnost poliploida izloženih temperaturnom stresu u odnosu na diploide.

Sedamdeset i dva sata nakon izlaganja biljaka toplinskom stresu za parametre F_v/F_m i PI_{ABS} nije uočena statistički značajna razlika između kontrolnih i tretiranih biljaka za sve ispitivane stupnjeve ploidnosti. To ukazuje na relativno brz oporavak biljnog fotosintetskog aparata od toplinskog stresa kojem je bio izložen. Usporedbom vrijednosti parametara F_v/F_m i PI_{ABS} između tretiranih diploidnih i poliploidnih biljaka nakon 72 sata također nije uočena statistički značajna razlika, što je bilo za očekivati s obzirom na oporavak.

Fotosintetski parametri F_v/F_m i PI_{ABS} kod biljaka izloženih solnom stresu (zalijevanje 300 mM otopinom natrijevog klorida) tijekom 24 h pokazuju statistički značajnu razliku između kontrolnih i tretiranih biljaka samo u slučaju diploida. To sugerira da su fotosintetski aparat i vitalnost diploida bili značajno poremećeni solnim stresom, dok kod poliploida to nije slučaj. Usporedbom vrijednosti F_v/F_m i PI_{ABS} kod tretiranih diploida i poliploida također je dobivena statistički značajna razlika, što potvrđuje činjenicu da se poliploidi bolje nose sa solnim stresom u odnosu na diploide.

Nakon izlaganja biljaka solnom stresu tijekom 48 h vrijednosti F_v/F_m i PI_{ABS} pokazale su značajnu razliku između kontrolnih i tretiranih diploidnih biljaka, što svjedoči o tome da su diploidne biljke pretrpjele solni stres. Usporedba vrijednosti navedenih parametara kod tretiranih diploida i tretiranih tetraploida pokazala je statistički značajnu razliku, što sugerira veću toleranciju na solni stres kod tetraploida.

Povećana sinteza slobodnog prolina jedan je od fizioloških odgovora na stres, a njegova važnost ogleda se u činjenici da prolin tijekom stresnih uvjeta štiti stanicu djelujući kao osmolit, šaperon, regulator pH vrijednosti i neutralizirajući štetno djelovanje ROS (Verbruggen i Hermans, 2008). Zbog navedenih uloga, dolazi do njegove akumulacije tijekom odgovora na stres (Nanjo i sur., 1999). Praćenje razine prolina kao indikatora stresa raširena je praksa (Verbruggen i sur., 1993; Yoshida i sur., 1997; Yaish, 2015; Vives-Peris i sur., 2015), međutim dosadašnja istraživanja nisu se bavila korelacijom razine prolina tretiranih biljaka u ovisnosti o stupnju poliploidije.

Statistička značajnost razlika u koncentraciji prolina određena je t-testom. Uspoređivane su vrijednosti dobivene kod kontrolnih biljaka s onima kod tretiranih. Također, uspoređivana je vrijednost dobivena kod tretiranih diploida s onima kod tretiranih poliploida. Do značajne razlike u koncentraciji prolina između kontrolnih i tretiranih biljaka neposredno nakon

toplinskog stresa došlo je samo u slučaju diploida. Međutim, zbog velikog rasapa podataka dobivenih neposredno i 72 h nakon stresa, vrijednosti standardne devijacije iznimno su visoke pa prolin u ovom slučaju nije dobar indikator toplinskog stresa. Prema Hua i sur. (2001) prilikom toplinskog stresa dolazi do akumulacije transkripata koji kodiraju za enzim P5CR koji je važan u procesu nastanka prolina, ali ne dolazi do nakupljanja samog proteina niti prolina, što ukazuje na regulaciju na razini translacije.

Koncentracija prolina 24 h nakon izlaganja solnom stresu značajno se razlikovala između kontrolnih i tretiranih biljaka kod diploida i tetraploida. Kod triploidnih biljaka razlika u koncentraciji prolina između kontrolnih i tretiranih biljaka nije bila značajna. Iako nije bilo statističke značajnosti usporedbom rezultata tretiranih diploida s tretiranim poliploidima uočljiv je trend povećanja koncentracije prolina s povećanjem stupnja ploidnosti.

Koncentracije prolina 48 h nakon izlaganja solnom stresu kod tretiranih su biljaka bile značajno veće nego kod kontrolnih. Ovo opažanje pokazuje da su biljke zaista bile pod stresom jer u slučaju stresnih uvjeta dolazi do akumulacije prolina (Verbruggen i Hermans, 2008). Također, vidljiva je statistički značajna razlika u koncentraciji prolina između poliploida i diploida, pri čemu poliploidi pokazuju veće koncentracije u odnosu na diploide. To ukazuje na bolju toleranciju solnog stresa kod poliploida u odnosu na diploide budući da veće koncentracije prolina govore o boljoj sposobnosti obrane od stresa, kao što su pokazali Nanjo i sur. 1999. Oni su uzgojili transgenične biljke uročnjaka koje su sadržavale *antisense* cDNA komplementarnu mRNA za prolin-dehidrogenazu, enzima koji katalizira razgradnju proteina u stanici. Pokazano je da takve transgenične biljke akumuliraju više prolina u odnosu na divlji tip i imaju veću toleranciju na solni stres, što svjedoči o važnoj ulozi prolina u stresnom odgovoru biljke. Također, prema El Moukhtari i sur. (2020), egzogeni tretman prolinom u uvjetima stresa u mnogim biljnim vrstama blagotvorno utječe na rast stanica, povećanje biomase, fotosintetsku aktivnost i klijavost sjemenki. Na temelju ovih podataka može se zaključiti kako veća koncentracija prolina u triploidnim i tetraploidnim biljkama svjedoči o njihovoj boljoj toleranciji solnog stresa.

Proteini identificirani spektrometrijom masa iz gelova nastalih 2D SDS-PAGE uzoraka biljaka izloženih temperaturnom stresu već su relativno poznati znanstvenoj zajednici kao varijabilni u uvjetima temperaturnog stresa (Hemmati i sur., 2015; Rocco i sur., 2013; Kosová i sur., 2011). Razlike između opaženih i teorijskih vrijednosti M_w i pI vjerojatno se mogu pripisati posttranslacijskim modifikacijama i različitim posttranskripcijskim izrezivanjima (eng.

splicing) (Rocco i sur., 2013). U Tablici 7. prikazani su omjeri volumena proteinskih mrlja uzoraka biljaka izloženih temperaturnom stresu i pripadajućih kontrola za biljke svih ploidnosti. Vidljiva je znatna razlika u razini ekspresije u svim slučajevima, što svjedoči o tome kako ekspresija tih proteina zaista varira u ovisnosti o stresu. U Tablici 8. prikazani su isti podaci za biljke izložene solnom stresu i pripadajuće kontrole. U njoj je također evidentna razlika u ekspresiji identificiranih proteina.

U uzorku 1. identificiran je veliki lanac RUBISCO-a, ključnog enzima fotosinteze. RUBISCO u uvjetima toplinskog stresa prema Rocco i sur. (2013) biva znatno manje eksprimiran u odnosu na kontrolu, što je u skladu s našim rezultatima (Tablica 7.) kod diploida i triploida, dok je kod tetraploida nadeksprimiran. Također, usporedbom tretiranih diploida s tretiranim poliploidima (Tablica 9.) može se primijetiti znatna nadekspresija RUBISCO-a kod tetraploida u odnosu na diploida, što svjedoči o manjoj stresiranosti biljke. Kod tretiranog triploida razina ekspresije približno je jednaka onoj kod diploida.

U uzorku 2. identificiran je protein dehidrin COR47. On ima ulogu u mehanizmima odgovora na sušni, temperaturni (i hladni i toplinski) te osmotski stres (Lim i sur., 2006). Također, dehidrini općenito imaju ulogu u prevenciji dehidracijskog i oksidacijskog oštećenja, te kao šaperoni pomažu u sprječavanju degradacije staničnih proteina pod utjecajem stresa (Hemmati i sur. 2015). Kod tretiranih diploida i triploida može se primijetiti očekivano veća ekspresija dehidrina COR47 u stresnim uvjetima u odnosu na kontrolne biljke, dok je kod tretiranog tetraploida smanjena u odnosu na kontrolnu biljku (Tablica 7.). Međutim, usporedbom tretiranih poliploida s tretiranim diploidom (Tablica 9.) vidljiva je niža ekspresija COR47 kod poliploidnih biljaka. Moguće da je do toga rezultata došlo uslijed manje stresiranosti poliploidnih biljaka, što je i u skladu s rezultatima OJIP testa.

U uzorku 3. identificirani su HSP70 4 i 6. Njihova uloga u biljnom odgovoru na stres već je opširno opisana. Neke od njihovih funkcija su djelovanje kao šaperoni, sprječavanje agregacije proteina i posredovanje u njihovoj ispravnoj lokalizaciji unutar stanice (Rocco i sur., 2013; Kosová i sur., 2011; Lin i sur., 2001). Nisu bitni samo za odgovor na stres, već zbog svoje šaperonske uloge obavljaju važan posao u biljnom odgovoru na bilo kakvu promjenu homeostaze (Qazi i sur., 2019). Kod svih tretiranih biljaka došlo je do očekivane pojačane ekspresije u uvjetima toplinskog stresa u odnosu na kontrolne biljke (Tablica 7.). Usporedbom ekspresije kod tretiranih poliploida u odnosu na tretiranog diploida (Tablica 9.), uočava se da je došlo do smanjene ekspresije u slučaju triploida, a do nešto jače ekspresije u slučaju

tetraploida. Takav rezultat mogao bi svjedočiti o različitoj razini percepcije stresa ili o inherentnim promjenama vezanima uz poliploidizaciju genoma, pri kojima bi njihova šaperonska uloga mogla biti od velike važnosti s obzirom na promjene u regulaciji ekspresije gena.

U 4. uzorku identificirani su β -podjedinica ATP sintaze i RUBISCO aktivaza. Prema preglednom radu Sharkey i sur. (2005) RUBISCO aktivaza veoma je temperaturno osjetljiv enzim koji degradira već pri umjerenom toplinskom stresu (35°C). Njegova ekspresija usko je povezana s ispravnim funkcioniranjem fotosintetskog aparata, s obzirom da funkcionira kao šaperon neophodan za funkciju RUBISCO-a (Barta i sur., 2010). Prema Qu i sur. (2021) pojačanom ekspresijom RUBISCO aktivaze u riži (*Oryza sativa*) dolazi do poboljšane tolerancije toplinskog stresa. Također, transgenične biljke uročnjaka s temperaturno rezistentnom RUBISCO aktivazom pokazuju bolju otpornost na toplinski stres (Salvucci, 2008). β -podjedinica ATP sintaze prema Rocco i sur. (2013) konstitutivno je eksprimirana i ne varira u ovisnosti o toplinskom stresu, tako da se bilo kakve varijacije u intenzitetu mrlje vrlo vjerojatno mogu pripisati RUBISCO aktivazi. Tretirane diploidne i triploidne biljke pokazuju veću ekspresiju ATP sintaze u odnosu na kontrolne biljke, dok je kod tetraploida došlo do suprotne pojave (Tablica 7.). Međutim, tretirana triploidna biljka pokazuje znatno veću ekspresiju u odnosu na diploidnu, dok je kod tetraploidne došlo do znatnog smanjenja ekspresije (Tablica 9.). Ovaj bi rezultat mogao ukazivati na različitu percepciju stresa triploidnih i tetraploidnih biljaka te promjene u regulaciji ekspresije gena koji kodiraju za podjedinice RUBISCO aktivaze povezane sa samim događajem poliploidizacije, iako zbog nedovoljno istražene uloge povećanja odnosno smanjenja ekspresije RUBISCO aktivaze u uvjetima temperaturnog stresa u *A. thaliana* nije moguće sasvim precizno odrediti značenje ovih rezultata.

U 5. uzorku, kod biljaka izloženih solnom stresu, identificirana je RUBISCO aktivaza. Prema Pang i sur. (2010) u prilikama solnog stresa njena ekspresija je smanjena kako bi se smanjila aktivnost RUBISCO-a i posljedično cijelog Calvinovog ciklusa. Usporedbom tretiranih i kontrolnih biljaka (Tablica 8.) kod diploida je vidljiva povećana, kod triploida smanjena, a kod tetraploida nepromijenjena razina ekspresije. Nadalje, oba tretirana poliploida imaju nešto manju ekspresiju RUBISCO aktivaze u odnosu na tretiranog diploida (Tablica 10.), što svjedoči o većem efektu izloženosti solnom stresu. Taj podatak u suprotnosti je s analizom fotosintetske aktivnosti i prolinskim testom, te se vjerojatno može pripisati statističkoj pogrešci uslijed malog broja tehničkih replika s obzirom na to da se radi o relativno maloj razlici.

U uzorku 6. identificirane su α i β podjedinice ATP sintaze. S obzirom na njihovu ključnu ulogu u metabolizmu biljke i proizvodnji energije, njihova je ekspresija povećana u biljkama tolerantnijima na solni stres zbog povećanih energetske potrebe u uvjetima stresa (Kosová i sur., 2011). U slučaju diploida detektirana je blago povećana razina ekspresije podjedinica ATP sintaze uspoređujući tretiranu i kontrolnu biljku, dok je na istoj relaciji taj protein kod triploida jako nadeksprimiran, a kod tetraploida nešto manje eksprimiran (Tablica 8.). Usporedbom tretiranih poliploida s tretiranim diploidom (Tablica 10.) vidljiva je veća razina ekspresije u oba poliploida, što upućuje na njihovu veću toleranciju na solni stres u usporedbi s diploidom.

U uzorku 7. identificirane su glutamat-glioksilat aminotransferaze 1 i 2. Mutanti uročnjaka u genu koji kodira za glutamat-glioksilat aminotransferazu 1 pokazuju povećano nakupljanje vodikova peroksida, što svjedoči o povećanom oksidacijskom stresu biljaka (Verslues i sur. 2007) te uložiti glutamat-glioksilat aminotransferaze u nošenju biljke sa stresnim odgovorom. Usporedbom tretiranih biljaka s kontrolama vidljiva je blago povećana razina ekspresije u slučaju diploida, smanjena kod triploida, a gotovo nepromijenjena u slučaju tetraploida (Tablica 8.). Triploidna tretirana biljka pokazuje povećanu, dok tetraploidna pokazuje podjednaku razinu ekspresije u odnosu na diploidnu biljku (Tablicu 10.). To ukazuje na potencijalno bolje nošenje sa stresom triploidne biljke, dok je neobično snižena ekspresija tih proteina kod tretiranog triploida u odnosu na pripadajuću kontrolu vjerojatno posljedica pogreške uslijed ograničenog broja tehničkih replika. Mogući razlog niže ekspresije tih enzima kod tetraploida različita je percepcija stresa ili regulatorne promjene izazvane poliploidizacijom.

U posljednjem, 8. uzorku ponovno je identificirana velika podjedinica RUBISCO-a. Za očekivati je da RUBISCO u uvjetima solnoga stresa kod glikofita poput uročnjaka bude manje eksprimiran u odnosu na kontrolu (Kosová i sur. 2011). U diploidu je zaista i primijećeno znatno smanjenje u razini ekspresije RUBISCO-a u odnosu na kontrolu, dok je na istoj relaciji primijećena povećana ekspresija kod triploida i blago smanjena ekspresija kod tetraploida (Tablica 8.). Međutim, primijećeno je i povećanje razine ekspresije u slučaju tretiranog triploida, kao i podjednaka razina ekspresije kod tretiranog tetraploida u odnosu na tretiranog diploida (Tablica 10.). Takvi rezultati sugeriraju veću otpornost poliploidnih biljaka na solni stres, što je u skladu s rezultatima mjerenja fotosinteze i prolinskim testom.

Zbog intrigantnih opažanja unutar ovog jednoga seta podataka, bilo bi svrsishodno ponoviti eksperiment s većim brojem tehničkih replika kako bi se preciznije utvrdile razlike u ekspresiji

proteina između pojedinih ploidnosti *A. thaliana* u uvjetima toplinskog i solnog stresa. Ponavljanjem elektroforeze i računalne analize u barem tri tehničke replike mogla bi se i kvantificirati razlika u ekspresiji pojedinih proteina za koju bi se mogla odrediti statistička značajnost. Također, povećanjem broja identificiranih proteinskih mrlja povećala bi se mogućnost pronalaska i identifikacije za stres bitnih proteina.

Naši rezultati potvrđuju pretpostavku kako su poliploidne varijante uročnjaka otpornije na toplinski i solni stres od diploidne. Ti podaci u skladu su s nekim literaturnim navodima o tome kako je poliploidija važan evolucijski mehanizam prilagodbe biljaka na nepovoljne uvjete (Fawcett i sur., 2009) te upućuju da istraživanja koja će ispitati mehanizme ovog fenomena vrijedi nastaviti. Na općenitijoj razini, možemo konstatirati kako bi ciljana poliploidizacija nekih komercijalno i prehrambeno važnih vrsta mogla biti jedna od potencijalno značajnih metoda u borbi protiv emergentnih abiotskih stresora današnjice.

6. Zaključak

- Fotosintetski aparat poliploidnih biljaka bolje tolerira izlaganje solnom i toplinskom stresu od diploidnih biljaka uročnjaka.
- Prolinski test nije pouzdan način kvantifikacije učinka toplinskog stresa na biljke uročnjaka zbog velike varijance dobivenih mjerenja.
- Prema prolinskom testu, poliploidne biljke uročnjaka bolje toleriraju solni stres od diploidnih.
- Postoje razlike u ekspresiji brojnih proteina između poliploidnih i diploidnih biljaka uročnjaka u uvjetima stresa od kojih je većina uključena u procese fotosinteze i odgovora na stres. Buduća istraživanja sa većim brojem tehničkih replika omogućit će pouzdanju identifikaciju relevantnih proteina u ispitivanim stresnim uvjetima.

7. Zahvale

Od srca se zahvaljujemo našim mentorima doc. dr. sc. Nenadu Malenici i doc. dr. sc. Dubravku Pavokoviću na stručnom vodstvu, udijeljenom znanju i savjetima te stoičkom podnošenju naših beskonačnih pitanja.

Također, veliko hvala izv. prof. dr. sc. Mirti Tkalec, dr. sc. Jeleni Mlinarec Novosel i doc. dr. sc. Marku Močibobu na pruženoj pomoći i tehničkoj opremi koji su donijeli velik doprinos ovom istraživanju.

Posebno zahvaljujemo mag. educ. biol. et chem. Renati Bibi na bezgraničnom strpljenju i svim korisnim savjetima koje nam je pružila tijekom izrade ovoga rada.

8. Popis literature

Alam, H., Razaq, M. i Salahuddin (2015). Induced Polyploidy as a Tool for Increasing Tea (*Camellia sinensis* L.) Production. *Journal of Northeast Agricultural University (English Edition)*, 22(3), pp.43–47.

Allakhverdiev, S.I., Kreslavski, V.D., Klimov, V.V., Los, D.A., Carpentier, R. i Mohanty, P. (2008). Heat stress: an overview of molecular responses in photosynthesis. *Photosynthesis Research*, 98(1-3), pp.541–550.

Andersson, I. i Backlund, A., (2008). Structure and function of Rubisco. *Plant Physiol Biochem.*, 46(3), 275-91.

Barta, C., Dunkle, A.M., Wachter, R.M. i Salvucci, M.E. (2010). Structural changes associated with the acute thermal instability of Rubisco activase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 499(1-2), pp.17–25.

Baza podataka TAIR: <https://www.arabidopsis.org/portals/education/aboutarabidopsis.jsp> (Pristupljeno 3.6.2021.)

Bomblies, K. i Madlung, A. (2014). Polyploidy in the Arabidopsis genus. *Chromosome Research: An International Journal on the Molecular, Supramolecular and Evolutionary Aspects of Chromosome Biology*, 22(2), pp.117–134.

Bouharmont J. i Hende J. V. D. (1968). Inheritance of lethal chlorophyll mutants in tetraploid Arabidopsis thaliana. *The Arabidopsis Information Service*, pp.25–26.

Carillo, P. i Gibon, Y. (2017). *PROTOCOL: Extraction and determination of proline Molecular fingerprinting of crop plants View project Post harvest physiology View project.*

Chao, D.-Y., Dilkes, B., Luo, H., Douglas, A., Yakubova, E., Lahner, B. i Salt, D.E. (2013). Polyploids Exhibit Higher Potassium Uptake and Salinity Tolerance in Arabidopsis. *Science*, 341(6146), pp.658–659.

Comai, L. (2000). Genetic and epigenetic interactions in allopolyploid plants. *Plant Molecular Biology*, 43(2/3), pp.387–399.

Comai, L. (2005). The advantages and disadvantages of being polyploid. *Nature Reviews*

Genetics, 6(11), pp.836–846.

De Storme, N., Copenhaver, G.P. i Geelen, D. (2012). Production of Diploid Male Gametes in *Arabidopsis* by Cold-Induced Destabilization of Postmeiotic Radial Microtubule Arrays. *Plant Physiology*, 160(4), pp.1808–1826.

de Zelicourt, A., Colcombet, J. i Hirt, H. (2016). The Role of MAPK Modules and ABA during Abiotic Stress Signaling. *Trends in Plant Science*, 21(8), pp.677–685.

del Pozo, J.C. i Ramirez-Parra, E. (2015). Whole genome duplications in plants: an overview from *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany*, 66(22), pp.6991–7003.

El Moukhtari, A., Cabassa-Hourton, C., Farissi, M. i Saviouré, A. (2020). How Does Proline Treatment Promote Salt Stress Tolerance During Crop Plant Development? *Frontiers in Plant Science*, 11.

Fawcett, J.A., Maere, S. i Van de Peer, Y. (2009). Plants with double genomes might have had a better chance to survive the Cretaceous–Tertiary extinction event. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(14), pp.5737–5742.

Haughn i Kunst (2010). *Arabidopsis thaliana*, a Model Organism for Molecular Genetic Studies in Plants: How and Why Was *Arabidopsis* Chosen Over Other Plants?

Hemmati, H., Gupta, D. i Basu, C. (2015). Molecular Physiology of Heat Stress Responses in Plants. *Elucidation of Abiotic Stress Signaling in Plants*, pp.109–142.

Henry, I.M., Dilkes, B.P., Young, K., Watson, B., Wu, H. i Comai, L. (2005). Aneuploidy and genetic variation in the *Arabidopsis thaliana* triploid response. *Genetics*, 170(4), pp.1979–1988.

<https://gelmap.de/49#> (Pristupljeno 5.6.2021.)

<https://world-2dpage.expsy.org/swiss-2dpage/> (Pristupljeno 5.6.2021.)

Hua, X.J., Van de Cotte, B., Van Montagu, M. i Verbruggen, N. (2001). The 5' untranslated region of the *At-P5R* gene is involved in both transcriptional and post-transcriptional regulation. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, 26(2), pp.157–169.

Igarashi, D., Tsuchida, H., Miyao, M. i Ohsumi, C. (2006). Glutamate:Glyoxylate

Aminotransferase Modulates Amino Acid Content during Photorespiration. *Plant Physiology*, 142(3), pp.901–910.

Jedrowski, C., Ashoub, A., Momtaz, O. and Brüggemann, W. (2015). Impact of Drought, Heat, and Their Combination on Chlorophyll Fluorescence and Yield of Wild Barley (*Hordeum spontaneum*). *Journal of botany*.

Jiao, Y., Wickett, N.J., Ayyampalayam, S., Chanderbali, A.S., Landherr, L., Ralph, P.E., Tomsho, L.P., Hu, Y., Liang, H., Soltis, P.S., Soltis, D.E., Clifton, S.W., Schlarbaum, S.E., Schuster, S.C., Ma, H., Leebens-Mack, J. i de Pamphilis, C.W. (2011). Ancestral polyploidy in seed plants and angiosperms. *Nature*, 473(7345), pp.97–100.

Kalaji, H.M., Jajoo, A., Oukarroum, A., Brestic, M., Zivcak, M., Samborska, I.A., Cetner, M.D., Łukasik, I., Goltsev, V. i Ladle, R.J. (2016). Chlorophyll a fluorescence as a tool to monitor physiological status of plants under abiotic stress conditions. *Acta Physiologiae Plantarum*, 38(4).

Kosová, K., Vítámvás, P., Prášil, I.T. i Renaut, J. (2011). Plant proteome changes under abiotic stress — Contribution of proteomics studies to understanding plant stress response. *Journal of Proteomics*, 74(8), pp.1301–1322.

Lee, C.-R., Svardal, H., Farlow, A., Exposito-Alonso, M., Ding, W., Novikova, P., Alonso-Blanco, C., Weigel, D. i Nordborg, M. (2017). On the post-glacial spread of human commensal *Arabidopsis thaliana*. *Nature Communications*, 8, p.14458.

Li, X., Yu, E., Fan, C., Zhang, C., Fu, T. i Zhou, Y. (2012). Developmental, cytological and transcriptional analysis of autotetraploid *Arabidopsis*. *Planta*, 236(2), pp.579–596.

Lim, C.J., Yang, K.A., Hong, J.K., Choi, J.S., Yun, D.J., Hong, J.C., Chung, W.S., Lee, S.Y., Cho, M.J. i Lim, C.O. (2006) Gene expression profiles during heat acclimation in *Arabidopsis thaliana* suspension-culture cells. *J Plant Res.*, 119(4), pp.373-83.

Lin, B.-L., Wang, J.-S., Liu, H.-C., Chen, R.-W., Meyer, Y., Barakat, A. i Delseny, M. (2001). Genomic analysis of the Hsp70 superfamily in *Arabidopsis thaliana*. *Cell Stress & Chaperones*, 6(3), pp.201–208.

Madlung, A. (2013). Polyploidy and its effect on evolutionary success: old questions revisited

with new tools. *Heredity*, 110(2), 99–104.

Mansour M.M.F. i Salama K.H.A. (2020) 'Proline and Abiotic Stresses: Responses and Adaptation'. In Hasanuzzaman M. (ed.) *Plant Ecophysiology and Adaptation under Climate Change: Mechanisms and Perspectives II*. Singapore: Springer.

Mansour, M.M.F. i Salama, K.H.A. (2020). Proline and Abiotic Stresses: Responses and Adaptation. *Plant Ecophysiology and Adaptation under Climate Change: Mechanisms and Perspectives II*, pp.357–397.

Masterson, J. (1994). Stomatal Size in Fossil Plants: Evidence for Polyploidy in Majority of Angiosperms. *Science*, 264(5157), pp.421–424.

Meinke, D.W., Cherry, J.M., Dean, C., Rounsley, S.D. i Koornneef, M. (1998). *Arabidopsis thaliana*: A Model Plant for Genome Analysis. *Science*, 282(5389), pp.662–682.

Miller, M., Zhang, C. i Chen, Z.J. (2012). Ploidy and Hybridity Effects on Growth Vigor and Gene Expression in *Arabidopsis thaliana* Hybrids and Their Parents. *G3* (Bethesda, Md.). 2(4), pp.505-513.

Mittler, R. (2006). Abiotic stress, the field environment and stress combination. *Trends in Plant Science*, 11(1), pp.15–19.

Nanjo, T., Kobayashi, M., Yoshiba, Y., Kakubari, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K. i Shinozaki, K. (1999). Antisense suppression of proline degradation improves tolerance to freezing and salinity in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters*, 461(3), pp.205–210.

Neupane, P., Bhujju, S., Thapa, N. i Bhattarai, H.K., (2019). ATP Synthase: Structure, Function and Inhibition. *Biomolecular Concepts*, 10(1), pp.1-10.

Pang, Q., Chen, S., Dai, S., Chen, Y., Wang, Y. i Yan, X. (2010). Comparative Proteomics of Salt Tolerance in *Arabidopsis thaliana* and *Thellungiella halophila*. *Journal of Proteome Research*, 9(5), pp.2584–2599.

Portis, A.R., (2003). Rubisco activase – Rubisco's catalytic chaperone. *Photosynthesis Research* 75, pp.11–27

Qazi, H.A., Jan, N., Ramazan, S. i John, R. (2019). Protein Modification in Plants in Response

to Abiotic Stress. *Protein Modificomics*, pp.171–201.

Qu, Y., Sakoda, K., Fukayama, H., Kondo, E., Suzuki, Y., Makino, A., Terashima, I. i Yamori, W. (2021). Overexpression of both Rubisco and Rubisco activase rescues rice photosynthesis and biomass under heat stress. *Plant, Cell & Environment*.

Rocco, M., Arena, S., Renzone, G., Scippa, G.S., Lomaglio, T., Verrillo, F., Scaloni, A. i Marra, M. (2013). Proteomic analysis of temperature stress-responsive proteins in *Arabidopsis thaliana* rosette leaves. *Molecular BioSystems*, 9(6), pp.1257–1267.

Salvucci, M.E. (2007). Association of Rubisco activase with chaperonin-60 : a possible mechanism for protecting photosynthesis during heat stress. *Journal of Experimental Botany*, 59(7), pp.1923–1933.

Sharkey, T.D. (2005). Effects of moderate heat stress on photosynthesis: importance of thylakoid reactions, rubisco deactivation, reactive oxygen species, and thermotolerance provided by isoprene. *Plant, Cell and Environment*, 28(3), pp.269–277.

Sharkey, T.D. and Zhang, R. (2010). High Temperature Effects on Electron and Proton Circuits of Photosynthesis. *Journal of Integrative Plant Biology*, 52(8), pp.712–722.

Sharma, A., Kumar, V., Shahzad, B., Ramakrishnan, M., Singh Sidhu, G.P., Bali, A.S., Handa, N., Kapoor, D., Yadav, P., Khanna, K., Bakshi, P., Rehman, A., Kohli, S.K., Khan, E.A., Parihar, R.D., Yuan, H., Thukral, A.K., Bhardwaj, R. i Zheng, B. (2019). Photosynthetic Response of Plants Under Different Abiotic Stresses: A Review. *Journal of Plant Growth Regulation*, 39(2), pp.509–531.

Shu, S., Guo, S.-R., Sun, J. i Yuan, L.-Y. (2012). Effects of salt stress on the structure and function of the photosynthetic apparatus in *Cucumis sativus* and its protection by exogenous putrescine. *Physiologia Plantarum*, 146(3), pp.285–296.

Singh, A., Sharma, M.K. i Sengar, R.S. (2017). Osmolytes: Proline metabolism in plants as sensors of abiotic stress. *Journal of Applied and Natural Science*, 9(4), pp.2079–2092.

Stepien, P. i Johnson, G.N. (2009). Contrasting Responses of Photosynthesis to Salt Stress in the Glycophyte *Arabidopsis* and the Halophyte *Thellungiella*: Role of the Plastid Terminal Oxidase as an Alternative Electron Sink. *Plant Physiology*, 149(2), pp.1154–1165.

Sudhir, P. i Murthy, S.D.S. (2004). Effects of salt stress on basic processes of photosynthesis. *Photosynthetica*, 42(4), pp.481–486.

Szabados, L. i Saviouré, A. (2010). Proline: a multifunctional amino acid. *Trends in Plant Science*, 15(2), pp.89–97.

te Beest, M., Le Roux, J.J., Richardson, D.M., Brysting, A.K., Suda, J., Kubesova, M. i Pysek, P. (2011). The more the better? The role of polyploidy in facilitating plant invasions. *Annals of Botany*, 109(1), pp.19–45.

Umezawa, T., Mizuno, K. and Fujimura, T. (2002). Discrimination of genes expressed in response to the ionic or osmotic effect of salt stress in soybean with cDNA-AFLP. *Plant, Cell and Environment*, 25(12), pp.1617–1625.

Usman, M., Rafii, M., Ismail, M., Malek, M., Latif, M. i Oladosu, Y. (2014). Heat Shock Proteins: Functions And Response Against Heat Stress In Plants. *International journal of scientific & technology research*. 3(11).

Verbruggen, N. i Hermans, C. (2008). Proline accumulation in plants: a review. *Amino Acids*, 35(4), pp.753–759.

Verbruggen, N., Villarroel, R. i Van Montagu, M. (1993). Osmoregulation of a Pyrroline-5-Carboxylate Reductase Gene in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology*, 103(3), pp.771–781.

Verslues, P.E., Kim, Y.-S. i Zhu, J.-K. (2007). Altered ABA, proline and hydrogen peroxide in an *Arabidopsis* glutamate:glyoxylate aminotransferase mutant. *Plant Molecular Biology*, 64(1-2), pp.205–217.

Vives-Peris, V., Gómez-Cadenas, A. i Pérez-Clemente, R.M. (2017). Citrus plants exude proline and phytohormones under abiotic stress conditions. *Plant Cell Reports*, 36(12), pp.1971–1984.

Walter, P. i Ron, D. (2011). The Unfolded Protein Response: From Stress Pathway to Homeostatic Regulation. *Science*, 334(6059), pp.1081–1086.

Wang, J., Tian, L., Lee, H.-S., Wei, N.E., Jiang, H., Watson, B., Madlung, A., Osborn, T.C., Doerge, R.W., Comai, L. i Chen, Z.J. (2006). Genomewide Nonadditive Gene Regulation in

Arabidopsis Allotetraploids. *Genetics*, 172(1), pp.507–517.

Yaish, M.W. (2015). Proline accumulation is a general response to abiotic stress in the date palm tree (*Phoenix dactylifera* L.). *Genetics and Molecular Research*.

Yang, C.-W., Wang, J.W. i Kao, C.H. (2000). The Relation between Accumulation of Abscisic Acid and Proline in Detached Rice Leaves. *Biologia Plantarum*, 43(2), pp.301–304.

Yoshida, Y., Kiyosue, T., Nakashima, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. i Shinozaki, K. (1997). Regulation of Levels of Proline as an Osmolyte in Plants under Water Stress. *Plant and Cell Physiology*, 38(10), pp.1095–1102.

Zhu, J.-K. (2002). Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 53(1), pp.247–273.

Zhu, J.-K. (2016). Abiotic Stress Signaling and Responses in Plants. *Cell*, 167(2), pp.313–324.

9. Sažetak

Anamaria Đerek i Roko Gvozdenica Šipić

Utjecaj toplinskog i solnog stresa na diploidni i poliploidni uročnjak (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.)

Globalno zatopljenje i zasoljavanje tala među najvećim su izazovima današnje poljoprivrede. Poliploidizacija, proces umnožavanja cijelog kromosomskog seta, poznat je evolucijski fenomen koji omogućuje prilagodbu biljaka na nove stresne uvjete. Također, poznato je da su mnoge kultivirane biljke poliploidi. Međutim, točni mehanizmi kako poliploidizacija djeluje u stresnim uvjetima tek se počinju detaljnije ispitivati. U našem istraživanju nastojali smo odrediti utjecaj toplinskoga i solnog stresa na poliploidne varijante uročnjaka (*A. thaliana*) u usporedbi s diploidnima. Toplinski stres postignut je izlaganjem biljki temperaturi od 45°C u trajanju od 3h, dok je solni stres postignut izlaganjem biljaka 300 mM otopini natrijeva klorida. Utjecaj stresa na biljke kvantificiran je mjerenjem maksimalne fotosintetske efikasnosti (F_v/F_m) i indeksa performansa (PI_{ABS}) te ukupne koncentracije aminokiseline prolina. Također, utjecaj stresa pratili smo računalnom diferencijalnom analizom proteinskih mrlja na gelovima dobivenima metodom 2D SDS-PAGE, te kasnijom identifikacijom proteina od interesa spektrometrijom masa. Naši rezultati pokazali su značajno veću otpornost fotosintetskog aparata poliploidnih varijanti uročnjaka na toplinski i solni stres od diploidnih. Prolinski test nije se pokazao dovoljno informativnim za kvantifikaciju stresa kod biljaka izloženih toplinskom stresu, dok su kod biljaka izloženih solnom stresu poliploidne varijante pokazale akumulaciju veće koncentracije prolina u odnosu na diploide, sugerirajući bolju otpornost na solni stres. Analizom diferencijalne ekspresije proteina bitnih za stres uočene su znatne razlike u ekspresiji proteina bitnih za proces fotosinteze i mehanizme biljnog odgovora na stres. Budućim istraživanjima s većim brojem tehničkih replika i identificiranih proteina omogućit će se pouzdanija identifikacija i kvantifikacija razlika za stres bitnih proteina s različitom razinom ekspresije u poliploidnim varijantama uročnjaka.

Ključne riječi: uročnjak, poliploidija, abiotički stres, fotosinteza, proteom

10. Summary

Anamaria Đerek i Roko Gvozdenica Šipić

The effect of heat and salt stress on diploid and polyploid mouse-ear cress

(*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.)

Global warming and soil salinization are among the greatest challenges of today's agriculture. Polyploidization, the process of multiplying an entire chromosome set, is a well-known evolutionary phenomenon that allows plants to adapt to new stressful conditions. Also, many cultivated plants are known to be polyploids. However, the exact mechanisms of how polyploidization works under stressful conditions are only beginning to be examined in more detail. In our study, we sought to determine the effect of heat and salt stress on polyploid variants of mouse-ear cress (*A. thaliana*) compared to diploid ones. Heat stress was achieved by exposing the plants to 45 ° C for 3 h, while salt stress was achieved by exposing the plants to 300 mM sodium chloride solution. The effect of stress on plants was quantified by measuring maximum photosynthetic efficiency (F_v/F_m) and performance index (PI_{ABS}) and total amino acid concentration of proline. Also, the influence of stress was monitored by computer differential analysis of protein spots on gels obtained by the 2D SDS-PAGE method, and subsequent identification of proteins of interest by mass spectrometry. Our results have shown a significantly higher resistance of the photosynthetic apparatus to heat and salt stress in polyploid variants of mouse-ear cress than in diploid ones. The proline test did not prove informative enough to quantify stress in plants exposed to heat stress, whereas in plants exposed to salt stress polyploid variants showed accumulation of higher concentrations of proline compared to diploids, suggesting better resistance to salt stress. Analysis of the differential expression of proteins that are important for stress has shown significant differences in the expression of proteins essential for the process of photosynthesis and the mechanisms of plant stress response. Future research with more technical replicas and identified proteins will allow for more reliable identification and quantification of stress differences of essential proteins with different levels of expression in polyploid variants of mouse-ear cress.

Key words: mouse-ear cress, polyploidy, abiotic stress, photosynthesis, proteome

11. Prilog

Prilog 1. Tablica proteina detektiranih metodom MALDI-TOF u uzorku 1.

Accession	Contaminant	# PSMs	Score Sequest HT: A2 Sequest HT	Abundance: F1: Sample
O03042	FALSE	334	953.8	5279012290
P19366	FALSE	96	269.76	506508848.2
P93292	FALSE	98	282.92	416578946.1
P00761	TRUE	17	60.38	159401837.5
F4INE2	FALSE	52	122.4	93848124.07
P04264	TRUE	17	47.48	32611316.11
B9DG18	FALSE	16	46.55	28820686.64
A0A1P8AWT7	FALSE	17	49.23	28820686.64
Q42547	FALSE	17	49.23	28820686.64
F4HUL6	FALSE	15	44.17	22738088.14

Prilog 2. Tablica proteina detektiranih metodom MALDI-TOF u uzorku 2.

Accession	Contaminant	# PSMs	Score Sequest HT: A2 Sequest HT	Abundance: F3: Sample
P00761	TRUE	5	12.73	284535717
P31168	FALSE	24	75.64	157381695
Q84L30	FALSE	4	9.66	29598404
A8MR76	FALSE	4	9.66	29598404
P10896	FALSE	79	233.08	22763461.34
F4IVZ7	FALSE	79	233.08	22763461.34
Q84L31	FALSE	2	4.82	16417278
F4JD57	FALSE	2	4.82	16417278
Q9FKA5	FALSE	5	15.45	5207178.797
P13645	TRUE	5	10.86	2957284.461

Prilog 3. Tablica proteina detektiranih metodom MALDI-TOF u uzorku 3.

Accession	Contaminant	# PSMs	Score Sequest HT: A2 Sequest HT	Abundance: F4: Sample
Q9STW6	FALSE	127	346.89	1498232903
P00761	TRUE	10	30.78	328056274.6
P04264	TRUE	12	34.79	21703536.98
Q9LHA8	FALSE	13	31.6	16877373.63
P13645	TRUE	8	20.04	8953882.875
Q9LTX9	FALSE	96	257.47	7922013.625
Q9LVG7	FALSE	1	1.84	5633993.5
Q9LQP7	FALSE	1	1.84	5633993.5
P35527	TRUE	3	9.24	5023352
O65719	FALSE	13	32.59	4585131.281

Prilog 4. Tablica proteina detektiranih metodom MALDI-TOF u uzorku 4.

Accession	Contaminant	# PSMs	Score Sequest HT: A2 Sequest HT	Abundance: F8: Sample
P10896	FALSE	305	943.1	2097570851
F4IVZ7	FALSE	298	917.72	2046722541
P00761	TRUE	11	41.59	106348645.8
P04264	TRUE	10	25.71	19785394.78
O03042	FALSE	13	34.48	19735730.2
P35527	TRUE	5	13.73	8837718.516
Q9XFS7	FALSE	1	1.29	8760762
Q9SRZ6	FALSE	10	24.69	8531039.102
P13645	TRUE	7	17.49	5223521.141
P35908	TRUE	8	21.9	4448758.094

Prilog 5. Tablica proteina detektiranih metodom MALDI-TOF u uzorku 5.

Accession	Contaminant	# PSMs	Score Sequest HT: A2 Sequest HT	Abundance: F2: Sample
P10896	FALSE	800	2404.36	7048210971
F4IVZ7	FALSE	800	2404.36	7048210971
P00761	TRUE	15	50.91	122331859.6
Q9M8M7	FALSE	29	94.35	89057796.78
A0A178UML4	FALSE	1	2.9	27071950
Q940U9	FALSE	1	2.9	27071950
O65581	FALSE	18	55.43	22303401.09
O82662	FALSE	17	50.73	22074140.18
Q9M0E5	FALSE	1	0	21355474
A0A1P8B6X9	FALSE	1	0	21355474

Prilog 6. Tablica proteina detektiranih metodom MALDI-TOF u uzorku 6.

Accession	Contaminant	# PSMs	Score Sequest HT: A2 Sequest HT	Abundance: F5: Sample
P56757	FALSE	147	390.81	3233886600
P00761	TRUE	10	35.01	113695472.4
P04264	TRUE	18	46.41	89443253.47
P19366	FALSE	38	103.31	74261989.73
P13645	TRUE	21	53.62	71184295.75
O03042	FALSE	16	41.35	63421101.47
Q6IFZ6	TRUE	2	4.76	25603758.5
Q7Z794	TRUE	1	2.3	21283690
Q9R0H5	TRUE	1	2.3	21283690
Q6NXH9	TRUE	1	2.3	21283690

Prilog 7. Tablica proteina detektiranih metodom MALDI-TOF u uzorku 7.

Accession	Contaminant	# PSMs	Score Sequest HT: A2 Sequest HT	Abundance: F6: Sample
Q9LR30	FALSE	194	550.69	2030228587
Q9S7E9	FALSE	134	398.96	814054112.9
P00761	TRUE	9	27.8	358012400.8
F4KDS0	FALSE	1	1.39	20168350
P35527	TRUE	4	10.75	2659250.531
O04373	FALSE	2	4.76	2308705.875
O03042	FALSE	2	4.29	2032188.125
P56757	FALSE	4	11.07	2001854.617
P13645	TRUE	5	12.13	1407833.805
Q94CE5	FALSE	4	10.39	1259721.109

Prilog 8. Tablica proteina detektiranih metodom MALDI-TOF u uzorku 8.

Accession	Contaminant	# PSMs	Score Sequest HT: A2 Sequest HT	Abundance: F7: Sample
O03042	FALSE	338	976.31	6379383955
P19366	FALSE	158	464.39	1632352085
P00761	TRUE	17	60.78	491562503.6
P93292	FALSE	102	304.37	465663051.9
F4I7I0	FALSE	51	142.32	464759044.1
P56757	FALSE	34	91.91	163295918.4
F4INE2	FALSE	52	119.96	87424294.88
Q9C5A9	FALSE	33	92.15	69630603.06
P83483	FALSE	33	92.15	69630603.06
P83484	FALSE	33	92.15	69630603.06