

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet

Matea Đaković i Marin Kutnjak

Umjereno povećana temperatura modificira fiziološki odgovor na toplinski stres u uročnjaka (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.) s povećanom ekspresijom gena *BPM1*

Zagreb, 2021.

Ovaj rad izrađen je u Botaničkom zavodu Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Željke Vidaković-Cifrek i predan je na Natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2020./2021.

POPIS KRATICA

ABA	apscizinska kiselina (engl. <i>abscisic acid</i>)
APX	askorbat peroksidaza (engl. <i>ascorbate peroxidase</i>)
BCIP	5-bromo-4-kloro-3-indolilfosfat (engl. <i>5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate</i>)
BPM	proteini iz obitelji proteina BTB/POZ-MATH; proteini koji sadrže domene BTB/POZ i MATH
BSA	albumin iz govedeg seruma (engl. <i>bovine serum albumin</i>)
BTB/POZ	domena koju sadrže proteini iz obitelji proteina BPM (engl. <i>Broad complex, Tramtrack, Bric-a-brac / pox virus and zinc finger</i>)
CAT	katalaza (engl. <i>catalase</i>)
CRL3	ligaze E3 temeljene na kulinu 3 (engl. <i>CUL3-based E3 ligases</i>)
DTT	ditiotreitol (engl. <i>dithiothreitol</i>)
EDTA	etilendiamintetraoctena kiselina (engl. <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>)
FW	masa svježeg (biljnog) tkiva (engl. <i>fresh weight</i>)
GFP	zeleni fluorescentni protein (engl. <i>green fluorescent protein</i>)
G-POD	gvajakol peroksidaza (engl. <i>guaiacol peroxidase</i>)
HRP	peroksidaza iz hrena (engl. <i>horseradish peroxidase</i>)
HSE	sekvenca u genomu na koju se veže HSF (engl. <i>heat shock element</i>)
HSF	transkripcijski faktori koji reguliraju ekspresiju gena za proteine toplinskog šoka (engl. <i>heat shock transcription factors</i>)
HSP	proteini toplinskog šoka (engl. <i>heat shock proteins</i>)
HSP70	proteini toplinskog šoka (engl. <i>heat shock protein</i>) molekularne mase 70 kDa
K	oznaka za kontrolnu skupinu biljaka, odnosno biljke koje nisu bile izložene toplinskom stresu
LSB	pufer za obradu uzoraka pripremljen prema uputi objavljenoj u radu Laemmli (1970) (engl. <i>Laemmli sample buffer</i>)

MATH	domena koju sadrže proteini iz obitelji proteina BPM (engl. <i>mepirin and TRAF (tumor necrosis factor receptor-associated factor) homology</i>)
MDA	malondialdehid (engl. <i>malondialdehyde</i>)
MES	2-(N-morfolino)etansulfonska kiselina (engl. <i>2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid</i>)
MS	hranjivi medij pripremljen prema postupku Murashige i Skoog (1962)
NBT	nitro-plavo tetrazolijski klorid (engl. <i>nitroblue tetrazolium chloride</i>)
<i>oeBPM1</i>	linija biljaka koje imaju povećanu razinu ekspresije gena <i>BPM1</i> (engl. <i>overexpression of BPM1</i> ili povećana razina ekspresije gena <i>BPM1</i>)
<i>oeBPM1</i> (K)	linija biljaka koje imaju povećanu razinu ekspresije gena <i>BPM1</i> ; kontrolne biljke, odnosno biljke koje nisu bile izložene toplinskom stresu (<i>oeBPM1</i> od engl. <i>overexpression of BPM1</i> ili povećana razina ekspresije gena <i>BPM1</i> ; K od kontrola)
<i>oeBPM1</i> (P)	linija biljaka koje imaju povećanu razinu ekspresije gena <i>BPM1</i> ; biljke koje su bile izložene toplinskom stresu nakon prethodnog izlaganja primarnom tretmanu (<i>oeBPM1</i> od engl. <i>overexpression of BPM1</i> ili povećana razina ekspresije gena <i>BPM1</i> ; P od primarni tretman ili engl. <i>priming</i>)
<i>oeBPM1</i> (S)	linija biljaka koje imaju povećanu razinu ekspresije gena <i>BPM1</i> ; biljke koje su bile izložene toplinskom stresu bez prethodnog izlaganja primarnom tretmanu (<i>oeBPM1</i> od engl. <i>overexpression of BPM1</i> ili povećana razina ekspresije gena <i>BPM1</i> ; S od stres)
OJIP	označava porast fluorescencije od faze O do faze P u metodi mjerenja polifaznog rasta fluorescencije klorofila <i>a</i>
P	oznaka za skupinu biljaka koje su najprije bile izložene primarnom tretmanu, tj. umjerenom stresu (engl. <i>priming</i>), a potom toplinskom stresu
PFD	gustoća svjetlosnog toka (engl. <i>photon flux density</i>)
PSII	fotosustav II u fotosintezi (engl. <i>photosystem II</i>)
PVPP	polivinilpolipirrolidon (engl. <i>polyvinylpyrrolidone</i>)
RC	reakcijski centar fotosustava II (engl. <i>reaction center</i>)

ROS	reaktivni kisikovi oblici (engl. <i>reactive oxygen species</i>)
S	oznaka za skupinu biljaka koje su bile izložene toplinskom stresu bez prethodnog izlaganja primarnom tretmanu, tj. umjerenom stresu (engl. <i>priming</i>)
SDS	natrijev dodecil-sulfat (engl. <i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SOD	superoksid dismutaza (engl. <i>superoxide dismutase</i>)
TBA	tiobarbituratna kiselina (engl. <i>thiobarbituric acid</i>)
TBARS	reaktivne tvari tiobarbituratne kiseline (engl. <i>thiobarbituric acid reactive substances</i>)
TBS	pufer korišten za ispiranje membrana u metodi western (engl. <i>tris-buffered saline</i>)
TBS-T	pufer TBS s dodatkom Tweena
TCA	trikloroetna kiselina (engl. <i>trichloroacetic acid</i>)
wt	biljke divljeg tipa (engl. <i>wild type</i>)
wt (K)	biljke divljeg tipa; kontrolne biljke, odnosno biljke koje nisu bile izložene toplinskom stresu (wt od engl. <i>wild type</i> ili divlji tip; K od kontrola)
wt (P)	biljke divljeg tipa; biljke koje su bile izložene toplinskom stresu nakon prethodnog izlaganja primarnom tretmanu (wt od engl. <i>wild type</i> ili divlji tip; P od primarni tretman ili engl. <i>priming</i>)
wt (S)	biljke divljeg tipa; biljke koje su bile izložene toplinskom stresu bez prethodnog izlaganja primarnom tretmanu (wt od engl. <i>wild type</i> ili divlji tip; S od stres)

SADRŽAJ RADA

1. UVOD	1
1.1. Stres u biljaka	1
1.2. Toplinski stres	2
1.3. Primarni tretman	3
1.4. Pokazatelji učinka stresa u biljaka	4
1.4.1. Reaktivni kisikovi oblici i oksidacijski stres.....	4
1.4.2. Antioksidacijski sustav u biljaka.....	6
1.4.3. Proteini HSP70.....	8
1.4.4. Polifazni rast fluorescencije klorofila <i>a</i>	9
1.5. Proteini BPM	10
1.5.1. Protein BPM1.....	12
1.6. Biljka <i>Arabidopsis thaliana</i> kao modelni organizam	13
2. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA	14
3. MATERIJAL I METODE	15
3.1. Biljni materijal	15
3.2. Korišteni uređaji	16
3.3. Izlaganje biljaka toplinskom stresu	16
3.4. Ekstrakcija ukupnih topivih proteina	17
3.5. Određivanje udjela ukupnih topivih proteina	18
3.6. Određivanje udjela vodikovog peroksida	18
3.7. Određivanje stupnja lipidne peroksidacije	19
3.8. Određivanje sadržaja prolina	19
3.9. Određivanje aktivnosti katalaze	20
3.10. Određivanje aktivnosti askorbat peroksidaze	20
3.11. Određivanje aktivnosti gvajakol peroksidaze	21
3.12. Određivanje aktivnosti superoksid dismutaze	21

3.13. Razdvajanje proteina elektroforezom i imunodetekcija proteina HSP70 metodom western	22
3.14. Mjerenje polifaznog rasta fluorescencije klorofila <i>a</i> metodom OJIP	24
3.15. Statistička obrada podataka	25
4. REZULTATI	26
4.1. Izgled i preživljavanje biljaka	26
4.2. Udio ukupnih topivih proteina	27
4.3. Udio vodikovog peroksida	29
4.4. Stupanj lipidne peroksidacije	30
4.5. Sadržaj prolina	31
4.6. Aktivnost katalaze	32
4.7. Aktivnost askorbat peroksidaze	33
4.8. Aktivnost gvajakol peroksidaze	34
4.9. Aktivnost superoksid dismutaze	35
4.10. Ekspresija proteina HSP70	36
4.11. Fotosintetska učinkovitost na temelju parametara određenih metodom OJIP	37
4.11.1. Indeks fotosintetske učinkovitosti	37
4.11.2. Maksimalni kvantni prinos fotosustava II	38
4.11.3. Gustoća aktivnih reakcijskih centara	39
4.11.4. Apsorpcija svjetlosti, protok uhvaćenih fotona, prijenos elektrona i rasipanje energije po aktivnom reakcijskom centru fotosustava II	40
5. RASPRAVA	42
6. ZAKLJUČCI	52
7. ZAHVALE	53
8. POPIS LITERATURE	54
9. SAŽETAK	61
10. SUMMARY	62

1. UVOD

1.1. Stres u biljaka

Biljke su svakodnevno izložene različitim okolišnim stresnim faktorima ili čimbenicima, koji utječu na njihovu fiziologiju. Stres u biljaka obično se definira kao djelovanje nekog vanjskog čimbenika koji ima negativan utjecaj na biljku. Vanjski čimbenici kao što su suša, povećana vlažnost, visoke i niske temperature, previsoka razina soli, neadekvatna količina minerala te previsoki ili preniski intenzitet svjetlosti nazivaju se abiotički čimbenici. Osim potonjih, stres u biljaka mogu uzrokovati različiti biotički čimbenici, odnosno drugi organizmi, kao što su biljke, patogeni ili kukci. U većini slučajeva stres se izražava kao stopa preživljavanja biljaka, prinos, rast (akumulacija biomase) ili stopa primarnih asimilacijskih procesa (CO₂ i mineralnih elemenata) koji su povezani s rastom biljke (Taiz i Zeiger, 2010).

Odgovor stanica na stresne uvjete uključuje promjene u staničnom ciklusu i diobi stanica, promjene u unutarstaničnim membranskim sustavima i vakuolizaciji stanica te promjene u staničnoj membrani i staničnoj stijenci, što dovodi do poboljšanja tolerancije biljke na stres. Na biokemijskoj razini dolazi do promjene metabolizma u biljnim stanicama sa svrhom prilagodbe biljaka okolišnim stresnim čimbenicima. Primjer je takve promjene biosinteza osmoregulacijskih tvari kao što je prolin (Taiz i Zeiger, 2010). Trajanje i jačina nekog stresnog uvjeta utječu na konačni odgovor biljke na stres. Također, kombinacija više stresnih čimbenika odjednom može dovesti do potpuno drugačijeg odgovora biljke od pojedinačnog stresnog uvjeta. Odgovor biljke može biti pokrenut izravno od stresnog čimbenika, kao što je to kod suše, ili biti rezultat ozljede nastale uslijed stresa, kao što je gubitak integriteta membrane. Otpornost ili osjetljivost biljke na stresni čimbenik ovisi i o samoj biljnoj vrsti, genotipu, razvojnom stadiju i organu ili tkivu na koji stres djeluje (Buchanan i sur., 2015).

Mehanizmi otpornosti biljaka na stres mogu se podijeliti u dvije kategorije: jedni su mehanizmi izbjegavanja, koji sprječavaju izloženost stresu, a drugi su mehanizmi tolerancije, koji omogućuju biljkama toleranciju stresa. Biljke posjeduju različita adaptivna svojstva, odnosno evolucijske prilagodbe koje im omogućuju preživljavanje stresnih uvjeta, kao što su zatvaranje puči i razvoj dubokog korijenja u slučaju manjka vode. Takva svojstva genetski su određena i konstitutivno eksprimirana, bez obzira je li biljka u stresnim uvjetima ili nije. Drugi način ostvarenja rezistencije u biljaka je aklimatizacija, odnosno prilagodba kao odgovor na mijenjanje

okolišnih čimbenika. Tijekom aklimatizacije organizam mijenja svoju homeostazu s ciljem prilagodbe vanjskim uvjetima i osiguravanja boljeg preživljavanja (Buchanan i sur., 2015).

1.2. Toplinski stres

Jedna vrsta abiotičkog stresnog čimbenika koja uzrokuje fiziološki odgovor u biljaka jest toplinski stres. Izlaganje biljaka toplinskom stresu može biti kronično ili dugotrajno, što se događa u biljaka koje rastu u izrazito toplim predjelima, a može biti i akutno ili kratkotrajno, koje se javlja uslijed ekstremnih dnevnih ili sezonskih promjena temperature (Buchanan i sur., 2015).

Posljedice toplinskog stresa mogu biti vrlo raznolike, od usporenog rasta do oštećenja organa, što u konačnici može dovesti do smrti biljke. Većina tkiva viših biljaka ne može preživjeti dugotrajno izlaganje temperaturama višim od 45 °C, pri čemu su tkiva koja ne rastu i dehidrirana tkiva (npr. sjemenke) otpornija od hidriranih, vegetativnih i rastućih tkiva (Taiz i Zeiger, 2010). S obzirom na to da su biljke sesilni organizmi, one nemaju mogućnost izbjegavanja toplinskog stresa, stoga moraju uložiti resurse u modificiranje svojeg metabolizma kako bi izbjegle moguća oštećenja. U slučaju djelovanja stresa velike jačine aktivira se programirana stanična smrt u specifičnim stanicama i tkivima, što dovodi do odbacivanja listova, sprječavanja stvaranja cvijeta ili ploda, pa čak i smrti čitave biljke (Mittler i sur., 2012).

Ekstremno visoke temperature utječu na vitalnost biljnih organa, pogotovo onih uključenih u reprodukciju i oprašivanje. Dokazano je da ekstremne temperature imaju negativan učinak na oprašivanje jer smanjuju vijabilnost peludi, što smanjuje mogućnost uspješne oplodnje (Mosa i sur., 2017). Također, toplinski stres utječe na stabilnost različitih proteina, fluidnost staničnih membrana, strukturu citoskeleta, a ujedno i smanjuje učinkovitost enzimskih reakcija u stanici, što dovodi do stanja metaboličke neravnoteže (Ruelland i Zachowski, 2010). S obzirom na to da su brojne stanične reakcije međusobno povezane i odvijaju se paralelno, promjena metaboličke ravnoteže može dovesti do akumulacije toksičnih nusprodukata, kao što su reaktivni kisikovi oblici (ROS-ovi, engl. *reactive oxygen species*). Brojni radovi pokazuju da postoji izravna povezanost između uklanjanja ROS-ova i tolerancije biljaka na stres uslijed ekstremnih temperatura (Suzuki i Mittler, 2006). Stoga se poboljšanje tolerancije biljaka na stres često povezuje s povećanom aktivnošću enzima uključenih u antioksidacijske sustave.

Karakterističan odgovor biljaka na akutni toplinski stres jest brzo i privremeno reprogramiranje genoma, što uključuje smanjenje sinteze proteina uključenih u rast i razvoj u optimalnim okolišnim uvjetima i ubranu transkripciju gena i translaciju proteina toplinskog šoka (HSP, engl. *heat shock proteins*) (Taiz i Zeiger, 2010). U transkripciji proteina HSP značajnu ulogu imaju transkripcijski faktori koji sudjeluju u ekspresiji proteina toplinskog šoka (HSF, engl. *heat shock transcription factors*). Oni su bitna komponenta u prijenosu signala uslijed toplinskog stresa i aktiviraju se kako bi se prepisali njihovi ciljni geni, uključujući gene koji kodiraju proteine HSP (Buchanan i sur., 2015). Faktori HSF prepoznaju i vežu se na konzerviranu (evolucijski očuvanu) promotorsku sekvencu, tzv. element toplinskog šoka (HSE, engl. *heat shock element*), što regulira ekspresiju proteina HSP. Genom biljke *Arabidopsis thaliana* sadrži više od 20 gena za faktore HSF, od kojih osam ima ulogu u odgovoru na toplinski stres (Ling i sur., 2018). Toplinski stres mijenja funkciju mnogih proteina i dovodi do njihovog razmatanja ili krivog smatanja, što uzrokuje gubitak pravilne strukture i aktivnosti proteina. Krivo smotani proteini često stvaraju nakupine i precipitiraju, stoga proteini HSP najčešće djeluju kao molekularni šaperoni i omogućuju nastanak pravilne strukture proteina (Taiz i Zeiger, 2010).

1.3. Primarni tretman

Biljke kao sesilni organizmi svakodnevno su izložene temperaturnim varijacijama u prirodi. Sposobnost zadržavanja „memorije“ odnosno „pamćenja“ ranijih stresnih događaja može donijeti veliku prednost biljci i poboljšati otpornost na buduće stresne uvjete. Takva otpornost na visoke temperature može se postići izlaganjem biljaka određeno vrijeme povišenoj temperaturi koja izaziva blagi stres, a zatim temperaturi koja izaziva jači stres. Prethodno izlaganje blagom stresu naziva se primarni tretman (engl. *priming*). U biljke *A. thaliana* to se postiže tako da biljka prvo raste u optimalnim uvjetima, zatim se izloži primarnom tretmanu na temperaturi 36 – 38 °C u trajanju 1 – 2 sata te se, nakon oporavka od primarnog tretmana, izloži jakom toplinskom stresu na temperaturi višoj od 42 °C (Mittler i sur., 2012). Sposobnost biljke da preživi takav tretman najčešće se naziva stečena termotolerancija. To se također može postići postepenim povišavanjem temperature kojoj izlažemo biljke, kao što se u prirodi događa od ranog jutra do podneva tijekom vrućih ljetnih dana. Primarni tretman također se može postići različitim prirodnim i sintetičkim

tvarima (Conrath i sur., 2015). Često se koriste dušikovi oksidi, vodikov peroksid, vodikov sulfid, poliamini i različiti mikroorganizmi (Filippou i sur., 2013).

Proces primarnog tretmana uključuje sintezu već spomenutih proteina HSP i promjene u staničnom metabolizmu, koje još uvijek nisu sasvim razjašnjene, a sam učinak traje 24 sata ili kraće. Dolazi do brze aktivacije faktora HSF koji reguliraju stvaranje proteina HSP i pokreću njihovu akumulaciju. Promjene u staničnom metabolizmu uključuju aktivnost nekih antioksidacijskih i metaboličkih enzima kao što su askorbat peroksidaza i galaktinol sintaza (Mueller i sur., 2015).

Nakon primarnog tretmana biljke troše resurse kako bi reakcijom na taj tretman osigurale bolji i učinkovitiji odgovor na buduće stresne događaje, pa u konačnici primarni tretman donosi veliku dobrobit za biljku (Martinez-Medina i sur., 2016). Učestalo izlaganje primarnom tretmanu dovodi do nastanka „memorije stresa“ koju je moguće prenositi i na iduće generacije, što može biti evolucijska prednost za biljke koje se prilagođavaju na nepovoljne životne uvjete (Ramirez-Carrasco i sur., 2017). Stoga je nužno istraživati mehanizme uključene u stvaranje memorije uslijed primarnog tretmana i primijeniti te spoznaje za poboljšanje obrambenog sustava biljaka (npr. u agronomiji).

1.4. Pokazatelji učinka stresa u biljaka

1.4.1. Reaktivni kisikovi oblici i oksidacijski stres

Reaktivni kisikovi oblici (ROS-ovi, engl. *reactive oxygen species*) u biljaka se kontinuirano stvaraju kao produkti različitih metaboličkih puteva poput fotosinteze i staničnog disanja, pri čemu su glavna mjesta stvaranja kloroplasti, mitohondriji i peroksisomi (Choudhury i sur., 2017). Postoji velik broj različitih ROS-ova, a među najvažnijima su singletni kisik ($^1\text{O}_2$), vodikov peroksid (H_2O_2), superoksidni radikal ($\text{O}_2^{\cdot-}$), hidroksilni radikal (OH^{\cdot}) i perhidroksilni radikal ($\text{O}_2\text{H}^{\cdot}$). H_2O_2 je relativno stabilan i može se procesom difuzije prenositi na određene udaljenosti u stanici i izvanstaničnom prostoru, dok drugi ROS-ovi imaju jako kratko vrijeme poluživota i prenose se na male udaljenosti. Tako primjerice ROS-ovi koji nastanu u plastidima i mitohondriju mogu sudjelovati u retrogradnom signaliziranju u jezgri (Buchanan i sur., 2015).

H_2O_2 može nastati redukcijom kisika, kataliziranom određenim oksidazama, ili neizravno redukcijom i dismutacijom kisika koji stvaraju oksidaze, peroksidaze ili koji nastaje u lancu

prijenosa elektrona. U biljkama H_2O_2 stvaraju različiti enzimi kao produkt katalitičkih reakcija, a veliki izvor čine glikolat oksidaza i acil-CoA oksidaza, koje su uključene u fotorespiraciju u peroksisomu odnosno oksidaciju masnih kiselina u glioksisomu. Nekoliko enzima antioksidacijskog sustava može razgraditi H_2O_2 , npr. katalaza, askorbat peroksidaza, glutation peroksidaza i peroksiredoksini (Mhamdi i sur., 2010). Postoji nekoliko načina određivanja količine H_2O_2 u biljnom tkivu, a mi smo koristili metodu koja se temelji na mjerenju produkta reakcije H_2O_2 i kalijeveg jodida (KI). Značajan izvor superoksidnog radikala je NADPH oksidaza smještena na plazmatskoj membrani stanica (Baxter i sur., 2014). Također, važan izvor ROS-ova su i peroksidaze vezane uz staničnu stijenku, koje stvaraju H_2O_2 , te kloroplasti, u kojima se stvara singletni kisik pod utjecajem visokog intenziteta svjetlosti (Asada, 2006). U normalnim fiziološkim uvjetima ROS-ovi se nalaze u niskim koncentracijama i većinom imaju ulogu u signalnim putevima za aktivaciju obrambenog odgovora biljaka na stres, a pri višim koncentracijama služe kao indikatori različitih okolišnih stresnih čimbenika (Choudhury i sur., 2017).

Ukoliko dođe do prekomjernog stvaranja ROS-ova uslijed različitih biotičkih i abiotičkih stresnih čimbenika, dolazi do oksidacijskog stresa. Termin „oksidacijski stres“ prvi je upotrijebio Helmut Sies 1985. godine, kad je identificirao vodikov peroksid (H_2O_2) kao normalni metabolit aerobnih organizama i upotrijebio metodu određivanja njegove koncentracije (Jones i Radi, 2014). ROS-ovi imaju sposobnost stvaranja ireverzibilnih i reverzibilnih oštećenja makromolekula kao što su nukleinske kiseline, proteini i lipidi, što narušava njihovu funkciju. Također, oksidacijski stres može uzrokovati promjene na razini transkripcije i translacije (Choudhury i sur., 2017). Biljke uklanjaju ROS-ove pomoću antioksidacijskih obrambenih sustava koji se aktiviraju u različitim staničnim odjeljcima. Za njihovu detoksikaciju potrebno je utrošiti velike količine energije, što smanjuje energetske zalihe u biljci. U konačnici, ako se sustavi uklanjanja ROS-ova ne aktiviraju u dovoljnoj mjeri, tj. ako izostane antioksidacijski odgovor, može doći do programirane stanične smrti (Buchanan i sur., 2015).

Lipidna peroksidacija proces je u kojem ROS-ovi djeluju na lipide u staničnoj membrani i tako oštećuju stanice. Proces se odvija u tri faze, a to su inicijacija, propagacija i terminacija. Tijekom faze inicijacije hidroksilni, alkoksilni i peroksilni radikali uklanjaju vodikov atom iz masne kiseline, što dovodi do nastanka lipidnog radikala. On dalje uklanja vodikove atome iz susjednih masnih kiselina, pri čemu nastaje lipidni hidroperoksid i drugi lipidni radikal, čime se omogućuje kontinuirano odvijanje tog procesa (Catala, 2006), tj. ciklička lančana reakcija.

Posljedice lipidne peroksidacije uključuju jaka oštećenja staničnih membrana, gubitak njihove funkcije i promjene u organelima, stoga je ona česti marker oksidacijskog stresa (Demidchik, 2015). U metodi koju smo koristili stupanj lipidne peroksidacije procjenjuje se na temelju količine malondialdehida (MDA, engl. *malondialdehyde*), koji nastaje peroksidacijom polinezasićenih masnih kiselina, a u reakciji s tiobarbituratnom kiselinom (TBA, engl. *thiobarbituric acid*) daje obojeni produkt, tzv. TBARS (reaktivne tvari tiobarbituratne kiseline, engl. *thiobarbituric acid reactive substances*) (Jambunathan, 2010).

1.4.2. Antioksidacijski sustav u biljaka

Kao što je ranije spomenuto, nastanak ROS-ova u biljnim stanicama neizbježan je dio normalnog metabolizma, ali zbog potencijalno štetnog učinka njihove prekomjerne količine potrebno je regulirati njihovu razinu u stanici. Biljke izložene stresnim čimbenicima stoga koriste različite antioksidacijske mehanizme kako bi se što bolje nosile s negativnim učincima oksidacijskog stresa i poboljšale toleranciju stresa. Glavni zadatak antioksidacijskog sustava jest održavanje ravnoteže stvaranja i uklanjanja superoksidnog radikala, vodikovog peroksida i hidroksilnog radikala. To je moguće pomoću antioksidacijskih enzima, od kojih su najvažniji katalaza, peroksidaze i superoksid dismutaza te pomoću neenzimskih antioksidansa, kao što su α -tokoferol, askorbinska kiselina, glutation i karotenoidi. Dakle, povećana aktivnost enzima antioksidacijskog sustava u izravnoj je vezi s boljim odgovorom biljaka na različite abiotičke i biotičke okolišne stresne čimbenike (Kapoor i sur., 2019).

Katalaza (CAT, engl. *catalase*) tetramerni je enzim koji sadrži hem i ima ulogu u razgradnji H_2O_2 na vodu i kisik. Nalazi se prvenstveno u mikrotjeleščima – peroksisomima i glioksisomima, koji su mjesto povećanog stvaranja H_2O_2 uslijed fotorespiracije, metabolizma purina, beta-oksidacije masnih kiselina i oksidacijskog stresa. Međutim, katalaza je prisutna i u drugim staničnim odjeljcima, kao što su citosol, kloroplasti i mitohondriji (Mittler, 2002). Izloženost stanice povišenim koncentracijama ROS-ova dovodi do snažne indukcije ovog enzima. Dosadašnja istraživanja također su pokazala da izlaganje biljaka toplinskom stresu dovodi do porasta aktivnosti katalaze, što omogućuje bolju toleranciju i sprječava negativne posljedice stresa u biljaka (Chalanika De Silva i Asaeda, 2017). Metoda koju smo koristili za mjerenje aktivnosti katalaze temelji se na razgradnji vodikovog peroksida, što smo pratili spektrofotometrijski (Aebi, 1984).

Peroksidaze, u koje se ubrajaju askorbat peroksidaza (APX, engl. *ascorbate peroxidase*) i gvajakol peroksidaza (G-POD, engl. *guaiacol peroxidase*), u biljaka su glikoproteini koji sadrže hem, a oksidiraju velik broj tvari u prisutnosti H₂O₂. Najvažnija je uloga peroksidaza pretvorba H₂O₂ u vodu i kisik kao dio obrambenog sustava biljaka. Osim toga imaju ulogu u normalnom odvijanju fizioloških procesa kao što su oksidacija toksičnih tvari, biosinteza i degradacija lignina, katabolizam auksina, obrana od patogena ili kukaca (Gulen i Eris, 2004). Askorbat peroksidaza razlikuje se od ostalih peroksidaza zbog svoje ovisnosti o askorbatu (tj. askorbinskoj kiselini ili vitaminu C), koji u njezinoj aktivnosti ima ulogu donora elektrona. Genom *A. thaliana* sadrži devet gena za APX, koji kodiraju nekoliko različitih izoformi enzima. Različite izoforme klasificiraju se u odnosu na unutarstaničnu lokalizaciju, pa se tako razlikuju izoforme u kloroplastu, mitohondriju, peroksisomu i citosolu (Pandey i sur., 2017). APX pospješuje redukciju H₂O₂ do vode oksidacijom dviju molekula askorbata do monodehidroaskorbata (Uarrota i sur., 2016). Metoda koju smo koristili uključuje mjerenje smanjenja koncentracije supstrata, tj. askorbata (Nakano i Asada, 1981). G-POD, slično kao i APX, uključen je u razne procese vezane za stres induciran ROS-ovima, a lociran je u citosolu, vakuoli, staničnoj stijenci i apoplastu (Uarrota i sur., 2016). G-POD uz utrošak H₂O₂ oksidira donore elektrona kao što su gvajakol i pirogalol (Sharma i sur., 2012). Metoda koju smo koristili uključuje spektrofotometrijsko mjerenje stvaranja tetragvajakola u reakciji gvajakola i H₂O₂ (Chance i Maehly, 1955).

Superoksid dismutaza (SOD, engl. *superoxide dismutase*) predstavlja prvu liniju obrane od ROS-ova u biljnim stanicama. S obzirom na metalni kofaktor koji koriste razlikuju se tri skupine ovih enzima: SOD koji koriste željezo, mangan i bakar, a nalaze se u različitim staničnim odjeljcima. SOD je prisutan u mitohondrijima, kloroplastu, glioksisomima, peroksisomima, apoplastu i citosolu, tj. na svim mjestima povećanog stvaranja kisika. Fosfolipidne membrane nepropusne su za superoksidne radikale, pa je nužno da se SOD nalazi u svim staničnim odjeljcima gdje ti radikali nastaju (Alscher i sur., 2002). SOD u stanicama katalizira reakciju disproporcioniranja superoksidnog radikala na kisik i vodikov peroksid (Corpas i sur., 2017). Metoda koju smo koristili za mjerenje aktivnosti SOD-a temelji se na redukciji supstrata, nitro-plavog tetrazolijskog klorida (NBT-a, engl. *nitroblue tetrazolium chloride*), u NBT-diformazan. Za tu reakciju potrebni su superoksidni anioni koje generiraju riboflavin i metionin uz djelovanje svjetlosti. Budući da su superoksidni anioni supstrat enzima SOD, u

njegovoj je prisutnosti reakcija formiranja NBT-diformazana inhibirana. Nastanak produkta reakcije, NBT-diformazana, pratili smo spektrofotometrijski (Beauchamp i Fridovich, 1971).

Kada su izložene stresnim uvjetima, biljke također akumuliraju razne metabolite koji imaju važnu ulogu u metabolizmu i razvojnim procesima. Prolin je jedna od aminokiselina do čijeg nakupljanja dolazi prilikom izlaganja biljaka različitim stresnim čimbenicima. Osim što je izvrstan osmolit, prolin ima tri velike uloge u stresu: djeluje kao kelirajući agens, kao molekula antioksidacijskog sustava i kao signalna molekula. U uvjetima stresa dolazi do povećanog stvaranja prolina, koji poboljšava toleranciju na stres tako što održava turgor i osmotsku ravnotežu u stanici, stabilizira membrane te pridonosi održavanju koncentracije ROS-ova kako bi spriječio oksidacijski stres u biljaka (Hayat i sur., 2012). Metoda koju smo koristili za određivanje koncentracije prolina temelji se na detekciji produkta koji nastaje reakcijom prolina s ninhidrinom (Bates i sur., 1973).

1.4.3. Proteini HSP70

Biljke i drugi organizmi kao odgovor na povišenje temperature stvaraju proteine HSP različitih molekularnih masa (od 15 do 104 kDa). Oni se mogu podijeliti u pet grupa ovisno o molekularnoj masi. Najbrojnija grupa sadrži proteine HSP60, HSP70, HSP90 i HSP100, koji djeluju kao molekularni šaperoni i pomažu u stabilizaciji i smatanju proteina te slaganju oligomera. Proteini HSP male molekularne mase (smHSP, engl. *small heat shock proteins*) prisutni su u većim količinama u viših biljaka nego u drugih organizama, ali njihova uloga nije sasvim razjašnjena. Neki proteini HSP ne eksprimiraju se uslijed toplinskog stresa, već uslijed drugih stresnih okolišnih uvjeta kao što su manjak vode, ranjavanje, niska temperatura i povišen salinitet (Buchanan i sur., 2015).

Proteini HSP70 (u prokariota poznati kao DnaK) ATPaze su potrebne za normalnu funkciju stanica, a prisutni su u nekoliko staničnih odjeljaka (citoplazmi, endoplazmatskom retikulumu, mitohondriju i kloroplastu), gdje uglavnom imaju ulogu u smatanju i razmatanju proteina (Buchanan i sur., 2015). Njihovu strukturu čine vrlo očuvana N-terminalna domena od 44 kDa, koja veže ATP, te C-terminalna domena od 25 kDa, koja veže proteine. Mogu imati različite uloge u stanici, primjerice sudjeluju u proteolitičkoj razgradnji nestabilnih proteina tako da ih usmjeravaju na razgradnju u lizosom ili proteasom (Hartl, 1996). Poznata je i uloga proteina HSP70 u razvojnim procesima u biljaka. Postoji nekoliko gena *hsp70* za citosolne HSP70 eksprimirane

tijekom razvoja sjemenke, sazrijevanja i procesa klijanja. Osim toga proteini HSP70 u stromi u biljke *A. thaliana* nužni su za pravilan razvoj strukture plastida (Ray i sur., 2016). Mogu imati i ulogu motornih proteina koji pokreću translokaciju u kloroplaste, mitohondrije i endoplazmatski retikulum (Su i Li, 2008).

Najvažnija uloga u toplinskom stresu uloga je proteina HSP70 u pokretanju odgovora na toplinski šok (HSR, engl. *heat shock response*). U biljaka HSR uključuje nekoliko puteva, regulacijskih mreža i staničnih odjeljaka. Percepcija topline odvija se pomoću četiriju „senzora topline“, a to su kalcijev kanal na plazmatskoj membrani, koji regulira ulazak kalcija u stanicu, zatim histonska varijanta H2A.Z te dva senzora za nesmotane ili krivo smotane proteine u endoplazmatskom retikulumu i citosolu. Signale primljene od različitih senzora integrira mreža koja uključuje različite sekundarne glasnike, kinaze, fosfataze i transkripcijske regulatore. Najveću ulogu u kontroli ovih puteva imaju faktori HSF, koji reguliraju transkripcijsku aktivnost velikog broja gena (Lavania i sur., 2015).

1.4.4. Polifazni rast fluorescencije klorofila *a*

Fotosinteza je izrazito važan i kompleksan metabolički proces u biljaka i mjerenje njene učinkovitosti može pružiti informacije o vitalnosti biljke. Jedna od najraširenijih metoda za proučavanje fotosinteze jest mjerenje fluorescencije klorofila *a* (Papageorgiou, 2004). Ta metoda daje uvid u učinkovitost apsorpcije i prijenosa energije u reakcijskom centru fotosustava II (PSII, engl. *photosystem II*). Naime, u uvjetima optimalnim za biljku većina se apsorbirane svjetlosne energije koristi za reakcije fotosinteze. Manji dio energije pritom se gubi u obliku topline i fluorescencije. Kad su biljke izložene određenom stresnom čimbeniku, povećava se udio energije koji se gubi u obliku topline i fluorescencije. S obzirom na to da stres u biljaka može utjecati na sve korake u prijenosu svjetlosne energije i elektrona do njihovih akceptora, mjerenje fluorescencije klorofila *a* može pružiti informacije o učinku stresnih uvjeta na fotosintezu (Lichtenthaler i Rinderle, 1988). Postoji nekoliko metoda za analizu fluorescencije klorofila *a*, od kojih se često koristi tzv. OJIP test (Kalaji i sur., 2014). Metoda OJIP omogućuje analizu polifaznog rasta fluorescencije klorofila *a* pri kontinuiranom osvjetljenju. Prije mjerenja biljni materijal nužno je smjestiti u tamu tijekom otprilike 30 minuta kako bi fotosintetski pigmenti bili u osnovnom, a ne pobuđenom stanju te kako bi se reakcijski centri „otvorili“, tj. oksidirali. Tijekom

kontinuiranog osvjetljavanja fluorescencija raste od minimalne vrijednosti F_0 ili stanja O (engl. *open state*) preko stanja J i I, koja odgovaraju fluorescenciji koja se emitira nakon 2 ms, odnosno 30 ms, do najviše vrijednosti F_m ili P, pri čemu dolazi do „zatvaranja“ (redukcije) reakcijskih centara (Strasser i sur., 2004). Uređaj mjeri potonje parametre, a pomoću njih moguće je izračunati i druge parametre koji opisuju glavna funkcionalna svojstva PSII i daju informaciju o fotosintetskoj učinkovitosti. Indeks fotosintetske učinkovitosti (PI_{abs}) govori koliki se udio energije iz fotona koje apsorbira PSII iskoristi za proces redukcije akceptora elektrona unutar sustava. Omjer varijabilne fluorescencije (F_v , koja predstavlja razliku između F_m i F_0) i maksimalne fluorescencije (F_m), kada su svi reakcijski centri zatvoreni, pruža informacije o maksimalnom kvantnom prinosu PSII. Važan je parametar i gustoća aktivnih reakcijskih centara (RC/CS_0), koji pokazuje koliko je aktivnih reakcijskih centara PSII u trenutku $t = 0$ u presjeku biljnog tkiva koje se osvjetljuje. Naposljetku, bitni su i parametri koji govore o specifičnom energetskom toku u PSII, a izražavaju se po aktivnom reakcijskom centru. To su sljedeći parametri: apsorpcija svjetlosti (ABS/RC), koja predočava koliko fotona apsorbira PSII uzrokujući pobuđivanje molekula klorofila *a*; prijenos energije uhvaćenih fotona (TR_0/RC) koja se usmjerava u reakcijski centar kako bi došlo do redukcije plastokinona; prijenos elektrona (ET_0/RC) te rasipanje energije u obliku topline (DI_0/RC) (Tsimilli-Michael, 2020).

1.5. Proteini BPM

Zbog svoje sesilne prirode, biljke ovise o fleksibilnim regulacijskim sustavima koji im omogućuju prikladnu regulaciju razvojnih i fizioloških procesa u okviru različitih okolišnih čimbenika. Ubikvitinsko-proteasomni put, koji obilježava brojne proteine za degradaciju, jedan je od staničnih puteva koji omogućuje tako složenu regulaciju (Choi i sur., 2014). Dodatak ubikvitina zajednička je posttranslacijska modifikacija proteina koja utječe na stabilnost, funkciju i substaničnu lokalizaciju mnogih proteina te ima važne regulacijske uloge u različitim staničnim i fiziološkim procesima (Chen i Hellmann, 2013). Ubikvitinske ligaze E3 pružaju potrebnu specifičnost ubikvitinsko-proteasomnom putu tako što se selektivno vežu za određene supstrate i ubrzavaju njihovu ubikvitinaciju. Ligaze E3 mogu biti monomerne ili građene od više podjedinica, čija interakcija omogućuje vezanje i ubikvitinaciju određenih proteina supstrata. Najveća grupa ligaza E3 poznata u biljaka jesu multimerne kulin-RING ligaze E3 ili CRL (engl. *cullin-RING E3*

ligases ili *CRLs*; RING od engl. *really interesting new gene*). Enzimi CRL imaju važne uloge u mnogim aspektima života biljke. Postoji više vrsta enzima CRL u biljaka, koji imaju specifičnu građu, kontroliraju različite biološke procese, a njihova je aktivnost skladno regulirana. Kaskada prijenosa ubikvitina sastoji se od ubikvitin-aktivacijskog enzima E1 (engl. *E1 UBQ activating enzyme*) i ubikvitin-konjugacijskog enzima E2 (engl. *E2 UBQ conjugating enzyme*). Ligaze E3 vežu enzim E2 i ubrzavaju ubikvitinaciju proteina supstrata kako bi došlo do promjene njihova puta u stanici, najčešće potičući degradaciju proteina supstrata. Međutim, djelovanje ligaza E3 ne vodi nužno degradaciji njihovih proteina supstrata, već konjugacija ubikvitina s proteinom može biti i regulacijski mehanizam za moduliranje aktivnosti proteina (Choi i sur., 2014).

Kulini se međusobno razlikuju po svojoj N-terminalnoj regiji te ih se primarno dijeli prema afinitetu za određene vrste adaptora supstrata. Prema tim razlikama trenutno se u biljaka izdvajaju četiri vrste kulin-RING ligaza E3 (CRL ligaza E3). Četiri vrste kulin-RING ligaza E3 jesu sljedeće: ligaze E3 temeljene na kulinu 1 (CRL1, engl. *CUL1-based E3 ligases*), ligaze E3 temeljene na kulinu 3 (CRL3, engl. *CUL3-based E3 ligases*), ligaze E3 temeljene na kulinu 4 (CRL4, engl. *CUL4-based E3 ligases*) te kompleks za promociju anafaze ili ciklosom (APC/C, engl. *anaphase promoting complex* ili *cyclosome*). Druga vrsta CRL ligaza E3 u biljaka, CRL3 ligaze, koriste jedan protein adaptor kako bi povezale kulin i ciljani protein supstrat. Taj protein adaptor sadrži domenu BTB/POZ (engl. *Broad complex, Tramtrack, Bric-a-brac / pox virus and zinc finger*). Kulin služi kao strukturna okosnica kompleksa ligaze E3. Adaptor supstrata smješta protein supstrat u blizinu enzima E2 kako bi ubrzao prijenos ubikvitina s enzima E2 na supstrat. U *A. thaliana* zabilježeno je 80 članova obitelji proteina BTB/POZ, koji su podijeljeni u deset podobitelji. Osim domene BTB/POZ svi ovi proteini sadrže i sekundarne domene, npr. domenu NPH3 (engl. *non-phototrophic hypocotyl3*), koja je najčešća, ili domenu MATH (engl. *meprin and TRAF (tumor necrosis factor receptor-associated factor) homology*) (Choi i sur., 2014).

Kompleksi CRL3 uključeni su u regulaciju nekoliko biljnih procesa: biosinteze masnih kiselina, signalnih puteva kalcija i fitohormona te odgovora na abiotički stres, svjetlost, patogene i ranjavanje. CRL3 ligaze E3, uz ostale uloge koje imaju, uključene su i u signalni put apscizinske kiseline (ABA-e, engl. *abscisic acid*). U izvršavanju te uloge važni su proteini iz obitelji BTB/POZ-MATH, tj. proteini BPM. Domena MATH proteina BPM ulazi u interakciju s transkripcijskim faktorom ATHB6 (engl. *Arabidopsis thaliana homeobox protein 6*). ATHB6 je negativni regulator u signalnom putu ABA-e, a vezanje proteina BPM i ATHB6 destabilizira

ATHB6, stoga se kompleks CRL3^{BPM} smatra pozitivnim regulatorom signalnog puta ABA-e. Proteini BPM također ulaze u interakciju s nekoliko transkripcijskih faktora iz obitelji ERF/AP2 (engl. *ethylene response factor / apetala2*), koji su uključeni u signalne puteve fitohormona, odgovor na abiotički stres i metabolizam. Opisana je interakcija proteina BPM s proteinima RAP2.4/WIND1 (engl. *related to apetala2.4 / wound induced dedifferentiation 1*) i WRI1 (engl. *wrinkled1*) iz obitelji ERF/AP2. RAP2.4 je uključen u odgovor na sušu i ranjavanje, kontrolu senescencije te razvojne procese koji uključuju djelovanje etilena i citokinina. WRI1 je ključni regulator u biosintezi masnih kiselina u sjemenkama te ima uloge u ranom razvoju klijanaca. Kompleksi CRL3^{BPM} stupaju u interakciju izravno sa svojim supstratima ERF/AP2, što dovodi do njihove proteasomalne degradacije. Proteine ERF/AP2 ne ciljaju samo CRL3, već ih prepoznaju i druge ligaze E3 (Choi i sur., 2014).

1.5.1. Protein BPM1

U biljke *A. thaliana* opisano je šest gena *BTB/POZ-MATH* (geni *BPM1 – BPM6*). Ti geni kodiraju najmanje 16 različitih izoformi proteina zbog odvijanja procesa alternativnog prekrajanja (engl. *alternative splicing*). Proteini BPM biljke *A. thaliana*, uz već spomenute RAP2.4/WIND1 i WRI1, transkripcijske faktore iz obitelji ERF/AP2, te ATHB6, transkripcijski faktor prve skupine transkripcijskih faktora HD-ZIP (engl. *homeodomain-leucine zipper*), vežu i transkripcijske faktore iz obitelji R2R3 MYB (R od engl. *repeat*, MYB od engl. *myeloblastosis*) te proteinske fosfataze tipa 2C. Ciljanjem potonjih proteina za ubikvitinaciju i kasniju proteasomalnu degradaciju, proteini BPM imaju važne uloge u raznim procesima u biljaka: cvjetanju, razvoju sjemenaka i odgovoru na abiotički stres. Osim što su važni u regulaciji transkripcije (jer vežu određene transkripcijske faktore), esencijalni su u posredovanju vezanja proteina CUL3 za DNA i moguće je da mijenjaju aktivnost ciljanih transkripcijskih faktora tako što interferiraju pri njihovoj interakciji s drugim staničnim komponentama (Škiljaica i sur., 2020). Pritom domena MATH proteina BPM prepoznaje specifične proteine supstrate, dok domena BTB/POZ veže CUL3 (Genschik i sur., 2013). Različite linije mutanata sa smanjenom razinom ekspresije određenih proteina BPM imale su promjene u razvoju. Također, fenotip tih linija donekle se razlikovao, što upućuje na to da pojedini geni *BPM* imaju specifične i različite uloge u biljci *A. thaliana* (Škiljaica i sur., 2020).

Analizom razine ekspresije gena ustanovljeno je da dolazi do indukcije ekspresije gena *BPM1* tijekom solnog i osmotskog stresa te suše (Weber i Hellmann, 2009). Škiljaica i sur. (2020)

uzgojili su transgenične biljke *A. thaliana* s povećanom razinom ekspresije (engl. *overexpression*) gena *BPM1* obilježenog genom za protein GFP (zeleni fluorescentni protein, engl. *green fluorescent protein*). Na tim je transgeničnim biljkama cilj bio istražiti protein BPM1 i odrediti njegove specifične uloge. Istraživači su pokazali da povećana razina ekspresije gena *BPM1* inducira značajne morfološke i fiziološke promjene u *A. thaliana*, npr. ranije cvjetanje, redukciju stvaranja sjemenaka te veću stopu klijavosti sjemenaka linije s povećanom ekspresijom gena *BPM1* tretiranih ABA-om i manitolom. Okolišni uvjeti značajno su utjecali na nakupljanje proteina BPM1. Tama i solni stres potaknuli su degradaciju proteina BPM1. Produljeno izlaganje povećanoj temperaturi inducira je ekspresiju gena *BPM1*, *BPM2* i *BPM3* te povećanu stabilnost proteina BPM1. Ustanovili su da se BPM1-GFP degradira u proteasomu 26S u putu ovisnom o kulinu (Škiljaica i sur., 2020). Škiljaica i sur. (2020) za svoje pokuse koristili su T3 ili T4 transgenično potomstvo linije L104. Potomstvo (sjemenke) dobivene od iste linije mi smo koristili u svojim pokusima.

1.6. Biljka *Arabidopsis thaliana* kao modelni organizam

Biljka uročnjak, *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., jednogodišnja je zeljasta cvjetnjača iz porodice krstašica ili kupusnjača (Brassicaceae). Iako nema ekonomski značaj, pripada biljnoj porodici u kojoj su i neke važne kultivirane vrste, npr. kupus, rotkvica, brokula, kelj i korabica. Tijekom niza desetljeća upotrebe uročnjaka u istraživačke svrhe pokazao se izvrsnim modelnim organizmom u biologiji biljaka. Brojna su svojstva koja ga čine dobrim modelnim organizmom. Ima relativno malen genom, veličine oko 135 megabaza, koji sadrži 27 655 gena, a organiziran je u pet kromosoma ($2n = 10$). Metode transformacije uročnjaka bakterijom *Agrobacterium tumefaciens* dobro su uhodane te se koriste za uvođenje stranih gena i stvaranje transgeničnih biljaka. Biljka je malena i može se relativno jednostavno uzgajati u laboratorijskim uvjetima u malom prostoru. Ima relativno kratak životni ciklus: potrebno je samo od pet do šest tjedana od klijanja sjemenke do proizvodnje novih sjemenaka odrasle biljke. Proizvodi puno sjemenaka (do 10 000 po biljci), što uročnjak čini osobito pogodnim za studije u genetici i molekularnoj biologiji. Samooprašuje se, stoga se brže može doći do homozigotnih linija za određenu mutaciju (Diaz, 2019; Krämer, 2015; Pang i Meyerowitz, 1987). Zbog navedenih svojstava, kao i zbog dostupnosti materijala, odabrali smo ovu biljku kao modelni organizam za svoje istraživanje.

2. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA

Opći cilj ovog istraživanja bio je istražiti utjecaj primarnog tretmana i toplinskog stresa na biljku *Arabidopsis thaliana* i tako doprinijeti boljem razumijevanju njenog odgovora na takvu vrstu stresnog čimbenika. Nadalje, trebalo je utvrditi razliku u odgovoru na primarni tretman i toplinski stres između biljaka divljeg tipa i biljaka s povećanom razinom ekspresije gena *BPM1*.

Specifični ciljevi rada bili su:

- utvrditi učinak toplinskog stresa i primarnog tretmana na izgled i preživljenje biljaka
- utvrditi učinak toplinskog stresa i primarnog tretmana na pojavu oksidacijskog stresa u biljaka (mjenjem udjela vodikovog peroksida i određivanjem stupnja lipidne peroksidacije)
- utvrditi učinak toplinskog stresa i primarnog tretmana na aktivaciju antioksidacijskih mehanizama u biljaka (mjenjem sadržaja prolina i određivanjem aktivnosti antioksidacijskih enzima (katalaze, askorbat peroksidaze, gvajakol peroksidaze i superoksid dismutaze))
- utvrditi učinak toplinskog stresa i primarnog tretmana na ekspresiju proteina HSP70 (metodom po westernu)
- utvrditi učinak toplinskog stresa i primarnog tretmana na fotosintezu u biljaka (mjenjem polifaznog rasta fluorescencije klorofila *a* metodom OJIP)
- sve navedene parametre izmjeriti na biljkama divljeg tipa i biljkama s povećanom razinom ekspresije gena *BPM1* i usporediti dobivene rezultate

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Biljni materijal

U istraživanju smo koristili biljke uročnjaka (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.), ekotip Columbia-0 (Col-0), koje su bile u fazi klijanaca, odnosno starosti oko 16 dana od nasađivanja sjemenki na hranjivu podlogu. Koristili smo klijance biljaka divljeg tipa (wt) i klijance biljaka linije koja ima povećanu razinu ekspresije gena *BPM1*, koji kodira protein BPM1 (*oeBPM1*). Uz kontrolne biljke, koje nisu bile izložene toplinskom stresu (skupine wt (K) i *oeBPM1* (K)), u istraživanju smo proučavali i dvije skupine biljaka koje smo izlagali toplinskom stresu, pri čemu smo jednu od dviju skupina stresu izložili nakon primarnog tretmana, tj. nakon izlaganja umjerenom stresu (engl. *priming*) (skupine wt (P) i *oeBPM1* (P)), dok smo drugu skupinu biljaka izložili toplinskom stresu bez prethodnog izlaganja primarnom tretmanu (skupine wt (S) i *oeBPM1* (S)). Biljke smo uzgajali u steriliziranoj tekućoj hranjivoj podlozi, tj. u modificiranom mediju MS (Murashige i Skoog, 1962) koji je sadržavao 29,2 mM (1 % w/v) saharoze i 2,5 mM MES (Sigma), pH-vrijednosti 5,7. Hranjivi medij sterilizirali smo autoklaviranjem pri temperaturu od 121 °C i tlaku od 0,15 MPa u trajanju od 18 minuta.

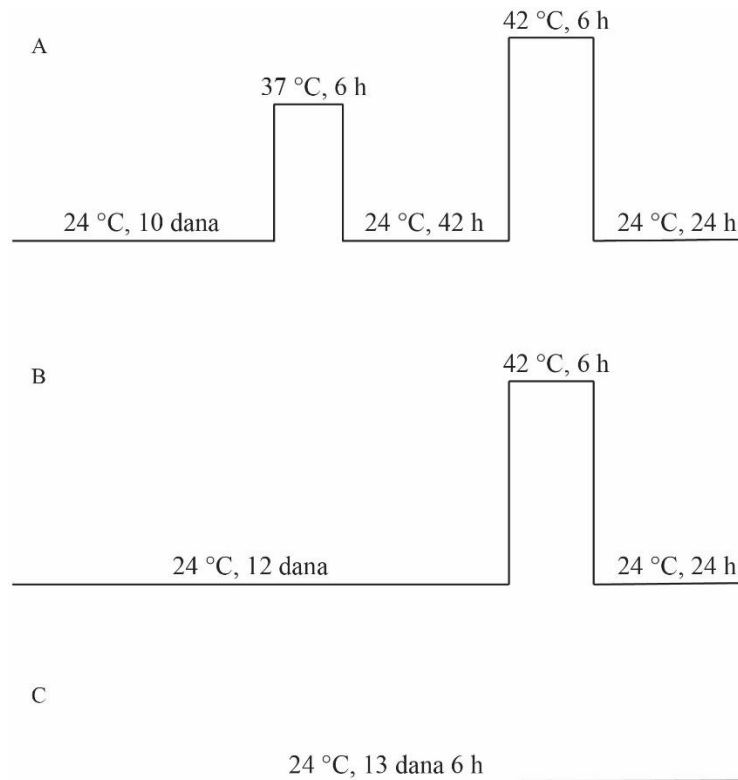
Prije nasađivanja sjemenaka biljaka u plastične petrijeve zdjelice promjera 6 cm proveli smo postupak površinske sterilizacije sjemenaka. Za sjemenke svake skupine biljaka (wt (K), wt (P), wt (S), *oeBPM1* (K), *oeBPM1* (P) i *oeBPM1* (S)) pripremili smo po šest plastičnih mikropruveta (volumena 2 ml) te u njih stavili po 3 mg sjemenki. Automatskom pipetom s plastičnim nastavkom dodali smo po 1 ml 70 %-tnog (v/v) etanola i promućkali. Nakon jedne minute uklonili smo etanol i sjemenke isprali sterilnom destiliranom vodom. Na sjemenke smo zatim dodali 1 %-tnu otopinu (w/v) Izosana G (Pliva Zagreb) i povremeno mućkali tijekom 10 min. Potom smo ih isprali četiri puta u 1 ml sterilne destilirane vode i dodali 1 ml medija MS. Sjemenke i medij zatim smo automatskom pipetom prenijeli u petrijeve zdjelice i dodali još 3 ml istog medija. Svaku zdjelicu zatvorenu poklopcem zapečatili smo pomoću parafilma. Petrijeve zdjelice tri smo dana držali u hladnjaku na 4 °C radi stratifikacije sjemenki, a nakon toga ih premjestili u komoru za uzgoj biljaka. Klijance smo uzgajali u uvjetima dugog dana (16 sati svjetlosti i 8 sati tame), pri temperaturi od 24 ± 1 °C, a kao izvor svjetlosti korištene su svjetiljke Master TL-D 58W/865, snage 58,5 W. Gustoća svjetlosnog toka (PFD, engl. *photon flux density*) na razini klijanaca bila je 75 – 85 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Petrijeve zdjelice na polici u komori za uzgoj biljaka bile su nasumično raspoređene i njihov smo raspored mijenjali svakog dana tijekom uzgoja.

3.2. Korišteni uređaji

Prilikom izvođenja pokusa korišteni su sljedeći uređaji: UV-VIS spektrofotometar Specord 40, Analytic Jena, Njemačka; magnetna miješalica Rotamix 550 MMH, Tehnica, Slovenija; centrifuga 3-18K, Sigma; vibracijska miješalica Vibromix 204 EV, Tehnica, Slovenija; termoblok AccuBlock, Labnet, SAD; pH-metar i konduktometar SevenCompact Duo, Mettler Toledo; inkubator Hood TH 30, Edmund Bühler, Njemačka; analitička vaga BL 120S, Sartorius, Hrvatska; mali sustav za gel-elektroforezu (*Mini-PROTEAN 3 Cell*), Bio-Rad, SAD; uređaj za mjerenje fluorescencije klorofila *a* FluorPen FP 100, Photon Systems Instruments, Češka; komora s horizontalnim strujanjem zraka (laminar) Heraeus, Njemačka; uređaj za detekciju kemiluminiscentnih signala C-DiGit Blot Scanner, LI-COR, SAD.

3.3. Izlaganje biljaka toplinskom stresu

Desetog dana uzgoja biljaka u ranije opisanim uvjetima u komori nasumično smo odabrali po šest petrijevih zdjelica s klijancima divljeg tipa i linije s povećanom razinom ekspresije gena *BPM1* (skupine wt (P) i *oeBPM1* (P)) te smo ih u inkubatoru, u kojem su svjetlosni uvjeti bili približno jednaki uvjetima u klima-komori, izložili temperaturi od 37 °C tijekom šest sati. Klijanci su na taj način podvrgnuti primarnom tretmanu, koji je trajao od 9:00 do 15:00 sati, i potom su vraćeni u komoru. Oko dva dana (42 sata) nakon tog postupka, iste smo klijance zajedno s klijancima iz skupina wt (S) i *oeBPM1* (S) (za koje je također nasumično odabrano po šest petrijevki s klijancima) u inkubatoru izložili temperaturi od 42 °C tijekom šest sati (klijanci su podvrgnuti toplinskom stresu od 9:00 do 15:00 sati) te smo ih potom vratili u komoru za uzgoj, gdje smo klijance ostavili sljedeća 24 sata kako bi se omogućio njihov oporavak (Slika 1). Po isteku 24 sata, tj. sljedećeg dana u 15:00 sati, klijance svih skupina (wt (K), wt (P), wt (S), *oeBPM1* (K), *oeBPM1* (P) i *oeBPM1* (S)) koristili smo za postupke ekstrakcije i za postupke analize fizioloških i biokemijskih parametara.



Slika 1. Shematski prikaz uzgoja klijanaca *A. thaliana* i izlaganja toplinskom stresu. Prikazan je vremenski tijek uzgoja klijanaca nakon trodnevne stratifikacije te temperature pri kojima su rasli i kojima su bili izloženi radi primarnog tretmana i toplinskog stresa. (A) Tijek rasta biljaka izloženih toplinskom stresu uz prethodni primarni tretman. (B) Tijek rasta biljaka izloženih toplinskom stresu bez prethodnog primarnog tretmana. (C) Tijek rasta kontrolnih biljaka, tj. onih koje nisu izložene toplinskom stresu.

3.4. Ekstrakcija ukupnih topivih proteina

Za pripremu proteinskih ekstrakata koristili smo po 100 mg svježeg tkiva kontrolnih biljaka, biljaka izloženih toplinskom stresu bez prethodnog primarnog tretmana, kao i biljaka izloženih toplinskom stresu koje su prethodno izložene primarnom tretmanu. Biljke smo homogenizirali u 1 ml ekstrakcijskog pufera (100 mM kalij-fosfatni pufer uz dodatak 0,1 mM EDTA, pH 7,0) u hladnom tarioniku, uz dodatak oko 10 mg polivinilpolipirolidona (PVPP-a). Uzorke smo centrifugirali 30 min pri 20 000 g i temperaturi od 4 °C. Nakon centrifugiranja odvojili smo supernatant, koji smo koristili za mjerenje ukupne koncentracije topivih proteina te za određivanje aktivnosti enzima katalaze, askorbat peroksidaze, gvajakol peroksidaze i superoksid dismutaze.

3.5. Određivanje udjela ukupnih topivih proteina

Koncentraciju ukupnih topivih proteina odredili smo metodom po Bradfordu (1976). Za izradu standardne krivulje koristili smo niz otopina albumina iz goveđeg seruma (BSA, Sigma; engl. *bovine serum albumin*) u rasponu koncentracija od 0,1 do 0,8 mg ml⁻¹. Za spektrofotometrijsko mjerenje koncentracije proteina u uzorcima, u mikroeprevetu od 1,5 ml dodali smo 1 ml radne otopine po Bradfordu i 50 µl proteinskog ekstrakta. Slijepa proba sadržavala je umjesto proteinskog ekstrakta 50 µl ekstrakcijskog pufera. Dobivenu smjesu kratko smo promućkali na vibracijskoj miješalici i inkubirali 10 minuta na sobnoj temperaturi, nakon čega smo spektrofotometrijski izmjerili apsorbanciju uzoraka na valnoj duljini od 595 nm. Za svaki uzorak pripremljene su dvije tehničke replike, a za izračun koncentracije proteina koristili smo srednju vrijednost njihovih apsorbancija. Na isti način izmjerili smo i apsorbancije prethodno pripremljenih razrjeđenja BSA za standardnu krivulju. Koncentraciju ukupnih topivih proteina izračunali smo iz vrijednosti apsorbancija, pomoću standardne krivulje, te vrijednosti izrazili kao µg proteina po mg svježeg tkiva [µg mg_{FW}⁻¹].

3.6. Određivanje udjela vodikovog peroksida

Metoda za određivanje količine vodikovog peroksida (H₂O₂) prilagođena je za vrstu *A. thaliana* prema protokolu Sergiev i sur. (1997). Ekstrakciju i spektrofotometrijsko mjerenje uzoraka napravili smo isti dan. Za pripremu ekstrakata izvagali smo 200 mg svježeg biljnog tkiva i homogenizirali ga u hladnom tarioniku uz dodatak oko 20 mg PVPP-a i 2 ml 6,12 mM (0,1 %-tne (w/v)) trikloroacetne kiseline (TCA, engl. *trichloroacetic acid*). Dobiveni ekstrakt zatim smo centrifugirali 15 minuta pri 12 000 g i temperaturi od 4 °C. Odvojili smo supernatant, koji smo koristili za mjerenje količine vodikovog peroksida te za mjerenje količine prolina i stupnja lipidne peroksidacije. Za izradu standardne krivulje priredili smo otopine H₂O₂ sljedećih koncentracija: 3,64; 7,28; 16,38; 25,48; 40,04; 50,96 i 72,8 µM, koje smo za spektrofotometrijsko mjerenje pripremili na isti način kao i ekstrakte klijanaca. Mjerenje smo radili u tripletu i uzeli srednje vrijednosti za izradu standardne krivulje. Za spektrofotometrijsko mjerenje koristili smo kvarcnu kivetu, u koju smo dodali 0,5 ml uzorka, 0,5 ml kalij-fosfatnog pufera (10 mM, pH 7,0) i 1 ml KI koncentracije 1 M. Apsorbanciju te smjese mjerili smo pri valnoj duljini od 390 nm. Za slijepu probu umjesto proteinskog ekstrakta koristili smo 0,5 ml 6,12 mM TCA. Nakon što smo izmjerili

apsorbanciju, pomoću standardne krivulje i mase svježeg tkiva izračunali smo sadržaj H₂O₂ i izrazili dobivene vrijednosti kao μmol H₂O₂ po g svježeg tkiva, tj. [μmol (H₂O₂) g_{FW}⁻¹].

3.7. Određivanje stupnja lipidne peroksidacije

Lipidnu peroksidaciju odredili smo spektrofotometrijskim mjerenjem prema protokolima Sunkar i sur. (2003) te Jambunathan (2010). U mikroepuvete s navojem otpipetirali smo 1 ml 34,7 mM (0,5 %-tne w/v) TBA koja je bila otopljena u 1,22 M (20 %-tnoj w/v) TCA te dodali 500 μl ekstrakta, koji smo koristili i za određivanje vodikovog peroksida, stoga je postupak pripreme ekstrakta opisan ranije. Za slijepu probu umjesto ekstrakta biljnog tkiva pipetirali smo 500 μl 6,12 mM (0,1 %-tne w/v) TCA. Uzorke smo smjestili u prethodno zagrijani termoblok (na 100 °C) i inkubirali 30 minuta. Po isteku inkubacije, uzorke smo naglo ohladili u ledu i nakon pet minuta mjerili apsorbanciju na valnim duljinama od 532 i 600 nm. Stupanj lipidne peroksidacije računali smo prema formuli:

$$\text{TBARS} = \frac{(A_{532} - A_{600}) \cdot f \cdot V_{ekstr.}}{\varepsilon \cdot l \cdot m_{ekstr.}}$$

gdje f označava faktor razrjeđenja, $V_{ekstr.}$ je volumen 6,12 mM TCA korištene za ekstrakciju tkiva, ε je ekstinkcijski koeficijent za TBARS, koji iznosi 155 mM⁻¹ cm⁻¹, l je duljina puta zrake svjetlosti kroz kivetu, a $m_{ekstr.}$ je masa svježeg biljnog tkiva korištenog za ekstrakciju. Mjerna jedinica u kojoj smo izražavali konačne rezultate je [nmol (TBARS) g_{FW}⁻¹]. TBARS označava reaktivne tvari tiobarbituratne kiseline, koje nastaju reakcijom između produkata lipidne peroksidacije (od kojih je najčešći MDA) i TBA u kiselom mediju.

3.8. Određivanje sadržaja prolina

Ukupnu koncentraciju prolina mjerili smo po metodi Bates i sur. (1973). Prvo smo pripremili otopine prolina za izradu standardne krivulje. Iz matične vodene otopine prolina koncentracije 1000 μM napravili smo šest razrjeđenja kako bismo dobili koncentracije otopina prolina od 1, 10, 25, 50, 100 i 250 μM. Za određivanje sadržaja prolina koristili smo ekstrakte pripremljene u 6,12 mM TCA, kao i za određivanje sadržaja vodikovog peroksida i stupnja lipidne peroksidacije. U mikroepuvete s navojem dodali smo 400 μl ledene octene kiseline, 400 μl kiselog ninhidrina (koncentracija ninhidrina u toj otopini bila je 0,140 M, a bio je otopljen u smjesi od

12 ml ledene octene kiseline i 8 ml 6 M fosforne kiseline) i 400 μl ekstrakta, odnosno pojedine otopine pripremljene za standardnu krivulju. Dobivenu smjesu mućkali smo 15-ak sekundi na vibracijskoj miješalici i uzorke inkubirali u termobloku jedan sat na 100 °C. Nakon isteka inkubacije uzorke smo ohladili, tj. stavili smo ih u led na pet minuta. Zatim smo ih prebacili u staklene epruvete te dodali 1 ml toluena i ponovno mućkali 15-ak sekundi. Nakon kratkog vremena razdvojile su se dvije faze. Gornju fazu, tj. toluen u kojem je otopljen produkt nastao reakcijom prolina s ninhidrinom, prebacili smo u kivetu i mjerili apsorbanciju na valnoj duljini od 520 nm. Kao slijepu probu koristili smo čisti toluen. Sadržaj prolina izračunali smo pomoću standardne krivulje i izrazili ga kao μmol prolina po masi svježeg tkiva, tj. [$\mu\text{mol g}_{\text{FW}}^{-1}$].

3.9. Određivanje aktivnosti katalaze

Aktivnost katalaze (CAT-a) mjerili smo spektrofotometrijski prema Aebi (1984). U kvarcnu kivetu pipetirali smo 950 μl reakcijske smjese koja se sastojala od 50 mM kalij-fosfatnog pufera s 10 mM H_2O_2 (pH 7,0) te dodali 50 μl proteinskog ekstrakta, brzo promiješali i stavili u spektrofotometar. Svakom uzorku izmjerili smo apsorbanciju na valnoj duljini od 240 nm svakih deset sekundi tijekom dviju minuta. Za slijepu probu umjesto proteinskog ekstrakta dodali smo 50 μl ekstrakcijskog pufera. Iz promjene apsorbancije po minuti i ekstinkcijskog koeficijenta za H_2O_2 ($\epsilon = 40 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) te sadržaja proteina u ekstraktu, izračunali smo aktivnost CAT-a i izrazili ju kao $\text{nmol H}_2\text{O}_2$ po min po mg proteina [$\text{nmol min}^{-1} \text{ mg}_{\text{prot.}}^{-1}$].

3.10. Određivanje aktivnosti askorbat peroksidaze

Aktivnost askorbat peroksidaze (APX-a) odredili smo spektrofotometrijski prema metodi Nakano i Asada (1981). Reakcijska smjesa ukupnog volumena od 1 ml sastojala se od 795 μl 50 mM kalij-fosfatnog pufera s 0,1 mM EDTA, 5 μl 20 mM askorbata, 180 μl proteinskog ekstrakta i 20 μl 12 mM H_2O_2 . Slijepa proba umjesto proteinskog ekstrakta sadržavala je ekstrakcijski pufer (100 mM kalij-fosfatni pufer s 0,1 mM EDTA, pH 7,0). Svakom uzorku izmjerili smo apsorbanciju na valnoj duljini od 290 nm, svake sekunde tijekom 15 sekundi. Aktivnost APX-a izračunali smo iz promjene apsorbancije po minuti i ekstinkcijskog koeficijenta za askorbat ($2,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), a konačnu aktivnost enzima izrazili smo u μmol po minuti po mg proteina [$\mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg}_{\text{prot.}}^{-1}$].

3.11. Određivanje aktivnosti gvajakol peroksidaze

Aktivnost gvajakol peroksidaze (G-POD-a) izmjerili smo koristeći postupak prema Chance i Maehly (1955). Reakcijska smjesa sadržavala je 50 mM kalij-fosfatni pufer (pH 7,0) s 0,1 mM EDTA te 18 mM gvajakola i 4,5 mM H₂O₂. U kivetu smo stavili 980 µl reakcijske smjese i 20 µl uzorka te mjerili apsorbanciju na valnoj duljini od 470 nm svakih 15 sekundi tijekom dviju minuta. Za slijepu probu umjesto uzorka dodali smo 20 µl ekstrakcijskog pufera (100 mM kalij-fosfatni pufer s 0,1 mM EDTA, pH 7,0). Aktivnost G-POD-a izračunali smo kao nastajanje produkta u µmol po minuti po ml koristeći ekstinkcijski koeficijent za tetragvajakol (26,6 mM⁻¹ cm⁻¹). Konačnu aktivnost izrazili smo po koncentraciji proteina u [µmol min⁻¹ mg_{prot.}⁻¹].

3.12. Određivanje aktivnosti superoksid dismutaze

Aktivnost superoksid dismutaze (SOD-a) odredili smo po metodi Beauchamp i Fridovich (1971). Reakcijska smjesa za određivanje aktivnosti SOD-a sadržavala je 50 mM kalij-fosfatni pufer (pH 7,8), 13 mM metionin, 75 µM NBT i 0,1 M EDTA. Pripremili smo 0,4 mM riboflavin, koji smo dodavali u tu reakcijsku smjesu neposredno prije spektrofotometrijskog mjerenja. Slijepa proba sadržavala je 800 µl reakcijske smjese, 195 µl 50 mM kalij-fosfatnog pufera (pH 7,8) i 5 µL 0,4 mM riboflavina. Zatim smo odredili maksimalnu brzinu redukcije NBT-a u NBT-diformazan tako da smo pripremili šest replika otopina koje su sadržavale 800 µl reakcijske smjese, 195 µl 50 mM kalij-fosfatnog pufera (pH 7,8) i 5 µl 0,4 mM riboflavina. Otopine smo izložili osam minuta djelovanju svjetlosti fluorescentnih svjetiljki (Philips TL-D 18W/54-765) i izmjerili apsorbanciju. Očekivana vrijednost apsorbancije je oko 0,5, što smo uzeli u obzir prilikom optimizacije metode (prilagođavanja volumena i koncentracije sastojaka reakcijske smjese). Uzorke smo mjerili tako da smo u plastičnu kivetu dodali 800 µl reakcijske smjese, 175 µl 50 mM kalij-fosfatnog pufera (pH 7,8), 20 µl uzorka i 5 µl 0,4 mM riboflavina, promiješali sadržaj okretanjem kivete i izložili osam minuta djelovanju svjetlosti. Po isteku tog vremena mjerili smo apsorbanciju uzoraka na valnoj duljini od 560 nm. Također, izradili smo standardnu krivulju sa standardom enzima SOD (Sigma). Priredili smo matičnu otopinu enzima aktivnosti 10 U (U – jedinica aktivnosti enzima, od engl. *unit*). U ovoj metodi 1 U označava 50 %-tnu inhibiciju reakcije redukcije NBT-a u NBT-diformazan. Iz matične otopine enzima pripremili smo seriju razrjeđenja 0; 0,01; 0,05; 0,1;

0,5 i 1 U. Izmjerali smo apsorbanciju na isti način kao što su mjereni uzorci, tj. umjesto uzoraka u kivetu smo dodavali pojedino razrijeđenje standardne otopine. Standardnu krivulju izračunali smo iz recipročnih vrijednosti izmjerenih apsorbancija standardnih otopina. Iz dobivene standardne krivulje odredili smo aktivnost SOD-a za pojedine uzorke. Konačnu aktivnost SOD-a izrazili smo u jedinicama aktivnosti enzima po mg proteina [$\text{U mg}_{\text{prot}}^{-1}$].

3.13. Razdvajanje proteina elektroforezom i imunodetekcija proteina HSP70 metodom western

Kako bismo detektirali ekspresiju proteina HSP70 i uvidjeli postoje li razlike u ekspresiji tog proteina između pojedinih skupina biljaka, primijenili smo metodu western. Za pripremu ekstrakta izvagali smo 100 mg biljnog tkiva i homogenizirali ga u hladnom tarioniku uz dodatak oko 10 mg PVPP-a i 1 ml ekstrakcijskog pufera. Za ekstrakciju smo koristili modificirani pufer po Staplesu i Stahmannu (1964) koji sadrži 0,1 M Tris, 0,5 M saharoze, 6,5 mM DTT i 8,25 mM cisteina. Uzorke smo centrifugirali 30 min pri 20 000 g i temperaturi od 4 °C. Nakon centrifugiranja odvojili smo supernatant i metodom po Bradfordu (1976) odredili koncentraciju proteina u uzorcima. Uzorke smo razrijedili puferom LSB (engl. *Laemmli sample buffer*) tako da smo u mikropruветu stavili 30 μl uzorka i 70 μl pufera LSB koji služi za denaturaciju proteina. Taj pufer sadržavao je 0,125 M Tris-HCl, 4 % (w/v) SDS, 20 % (v/v) glicerola, 10 % (v/v) 2-merkaptoetanol i 0,04 % (w/v) boje bromfenol modriло. Nakon dodavanja pufera koncentracija proteina u uzorcima bila je u rasponu 0,6 – 1 mg ml^{-1} . Uzorke smo zatim izložili temperaturi od 95 °C u trajanju od pet minuta kako bismo ih denaturirali. Proteine iz biljnih ekstrakata razdvojili smo denaturirajućom diskontinuiranom vertikalnom SDS-gel-elektroforezom u poliakrilamidnom gelu, u smjeru anode (Laemmli 1970). Za to smo u međuvremenu pripremili gelove za mali sustav za gel-elektroforezu (*Mini-PROTEAN 3 Cell*, Bio-Rad). Gel za razdvajanje sadržavao je 12 % (v/v) akrilamida/bis-akrilamida (T = 30 %, C = 2,66 %), 1,5 M Tris-HCl (pH 8,8), 10 % (w/v) SDS, 10 % (w/v) APS i 0,05 % (v/v) TEMED, a gel za sabijanje sadržavao je 4 % (v/v) akrilamida/bis-akrilamida (T = 30 %, C = 2,66 %), 0,5 M Tris-HCl (pH 6,8), 10 % (w/v) SDS, 10 % (w/v) APS i 0,1 % (v/v) TEMED (Sigma). Elektroodni pufer (pH 8,3) sadržavao je 0,02 M Tris-HCl, 0,1 % (w/v) SDS i 0,15 M glicina. Na gel je trebalo nanijeti 13 μg proteina, stoga smo iz podataka o koncentraciji proteina u uzorcima izračunali koji volumen pojedinog uzorka moramo nanijeti na gel. U prvu

jažicu na gelu nanijeli smo markere molekularnih masa u rasponu 8 – 220 kDa. U prvih 30-ak minuta elektroforeze napon je bio namješten na 100 V, a kada su uzorci prošli gel za sabijanje (što smo mogli pratiti zbog prisustva bromfenol modrila u uzorcima), povišili smo napon na 200 V. Elektroforeza je u tim uvjetima trajala još otprilike sat vremena. Prekinuli smo ju kada se boja bromfenol modrilo približila donjem rubu gela.

Zatim smo pripremili sustav za prijenos proteina na nitroceluloznu membranu (kazetu za prijenos). U velike petrijeve zdjelice stavili smo destiliranu vodu i namočili potreban pribor (plastične dijelove kazete, spužvice, filter-papire). Po završetku elektroforeze na namočeni filter-papir stavili smo izrezanu nitroceluloznu membranu, na koju smo položili gel odmah nakon elektroforeze. Iz tako složenog „sendviča“ pomoću staklene epruvete (koja nam je poslužila kao valjak) istisnuli smo zrak koji bi mogao ometati prijenos i tek nakon toga zatvorili kazetu. U sustav za prijenos složili smo kazete, stavili posudu s ledom i ulili pufer za prijenos (pH 8,3) koji je sadržavao 0,03 M Tris, 0,02 M glicina i 0,1 % (v/v) metanola. Kada je sve bilo spremno, namjestili smo napon na 60 V i pokrenuli prijenos, koji je trajao sat vremena. Nakon prijenosa membranu smo obojili bojom koja je sadržavala 0,05 % (w/v) Ponceau S u 5 %-tnoj (v/v) octenoj kiselini. Nakon što su se proteini obojili, markere molekularnih masa lagano smo označili grafitnom olovkom. Poslije postupka bojenja membranu smo isprali u puferu TBS (pH 7,5) (engl. *tris-buffered saline*) koji je sadržavao 0,02 M Tris i 0,5 M NaCl, dva puta u trajanju od pet minuta. Zatim smo membranu izložili jedan sat otopini za blokiranje, koja je sadržavala 5 % (w/v) nemasnog mlijeka u prahu otopljenog u puferu TBS-T, koji smo pripremili dodatkom Tweena 20 (0,05 % v/v) u pufer TBS. Poslije blokiranja membranu smo isprali u puferu TBS-T, dva puta u trajanju od pet minuta i inkubirali ju preko noći na 4 °C s primarnim protutijelom (anti HSP70, Agrisera, Švedska) pripremljenim u puferu TBS-T u omjeru 1 : 3000). Sutradan smo membranu isprali u puferu TBS-T, dva puta po pet minuta i inkubirali sat vremena u sekundarnom antitijelu (IgG HRP, Agrisera, Švedska) pripremljenim u otopini za blokiranje u omjeru 1 : 10 000. Na kraju smo membranu isprali dva puta po pet minuta u puferu TBS-T i još pet minuta u puferu TBS. Kako bismo detektirali ekspresiju proteina HSP70, koristili smo metodu kemiluminiscencije. Membranu smo inkubirali sa supstratom Immobilon Forte Western HRP (Merck) i stavili u uređaj bio C-DiGit Blot Scanner (LI-COR, USA) za detekciju kemiluminiscentnih signala na nitroceluloznoj membrani. Nakon 12 minuta membrana je skenirana i rezultat prikazan na zaslonu računala.

3.14. Mjerenje polifaznog rasta fluorescencije klorofila *a* metodom OJIP

Za određivanje fotosintetske učinkovitosti u klijancima divljeg tipa te klijancima s povećanom razinom ekspresije gena *BPM1* koristili smo uređaj FluorPen FP 100 (Photon Systems Instruments, Češka). Metoda se temelji na mjerenju polifaznog rasta fluorescencije klorofila *a* u biljaka aklimatiziranih na uvjete tame (Strasser i sur., 2004). Stoga smo prije početka mjerenja biljni materijal 30 min držali u tami pri sobnoj temperaturi (24 °C) kako bismo osigurali da sve molekule reakcijskog centra fotosustava II budu u oksidiranom stanju te da je prinos fluorescencije minimalan. To stanje označava tzv. korak O u korištenoj metodi. Početkom mjerenja uređaj je klijance osvjetlio pulsom plave svjetlosti (maksimum emisijske svjetlosti je pri valnoj duljini od 455 nm, PFD = 3000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), pri čemu su potaknuti fotokemijski procesi u reakcijskom centru, uključujući i porast fluorescencije. Kada je reducirana većina molekula plastokinona A reakcijskog centra, postignut je korak J, odnosno kada je reducirana većina molekula plastokinona B, postignut je korak I. Naposljetku, kada je reducirana većina molekula tzv. plastokinonskog bazena između fotosustava II i fotosustava I, postignut je korak P (Küpper i sur., 2019).

Fluorometar FluorPen omogućava mjerenje promjena u intenzitetu fluorescencije klorofila *a* tijekom 1 s, pri čemu bilježi podatke o intenzitetu fluorescencije nakon 50 μs (F_0), 2 ms (F_J), 30 ms (F_I) te maksimalni intenzitet fluorescencije (F_P ili F_m). Pomoću navedenih izmjerenih parametara moguće je izračunati i preostale parametre koji opisuju glavna funkcionalna svojstva PSII, a na temelju kojih se mogu izvoditi zaključci o fotosintetskoj učinkovitosti biljke. U Tablici 1. naveli smo mjerene parametre te izračunate parametre pomoću kojih smo procijenili fotosintetsku učinkovitost u svim skupinama klijanaca u pokusu (wt (K), wt (P), wt (S), *oeBPM1* (K), *oeBPM1* (P) i *oeBPM1* (S)).

Tablica 1. Parametri dobiveni mjerenjem polifaznog rasta fluorescencije klorofila *a* metodom OJIP.

RC – reakcijski centar

Parametar	Opis
F_0	intenzitet fluorescencije nakon 50 μ s (stupanj O)
F_J	intenzitet fluorescencije nakon 2 ms (stupanj J)
F_I	intenzitet fluorescencije nakon 30 ms (stupanj I)
F_m	maksimalni intenzitet fluorescencije (stupanj P)
F_v	maksimalna varijabilna fluorescencija
$F_v/F_m = (F_m - F_0)/F_m$	maksimalni kvantni prinos fotosustava II
V_J	varijabilna fluorescencija između koraka O i J
M_0	ukupna brzina zatvaranja RC
$RC/CS_0 = F_v/F_m \times (V_J/M_0) \times F_0$	gustoća aktivnih RC po osvjetljenoj površini lista
$ABS/RC = M_0 \times (1/V_J) \times [1/(F_v/F_m)]$	apsorpcija svjetlosti (fotona) po aktivnom RC
$TR_0/RC = M_0 \times (1/V_J)$	protok uhvaćenih fotona po aktivnom RC
$ET_0/RC = M_0 \times (1/V_J) \times (1 - V_J)$	prijenos elektrona po aktivnom RC
$DI_0/RC = (ABS/RC) - (TR_0/RC)$	rasipanje energije po aktivnom RC
$PI_{abs} = (RC/ABS) \times (TR_0/DI_0) \times [ET_0/(TR_0 - ET_0)]$	indeks fotosintetske učinkovitosti

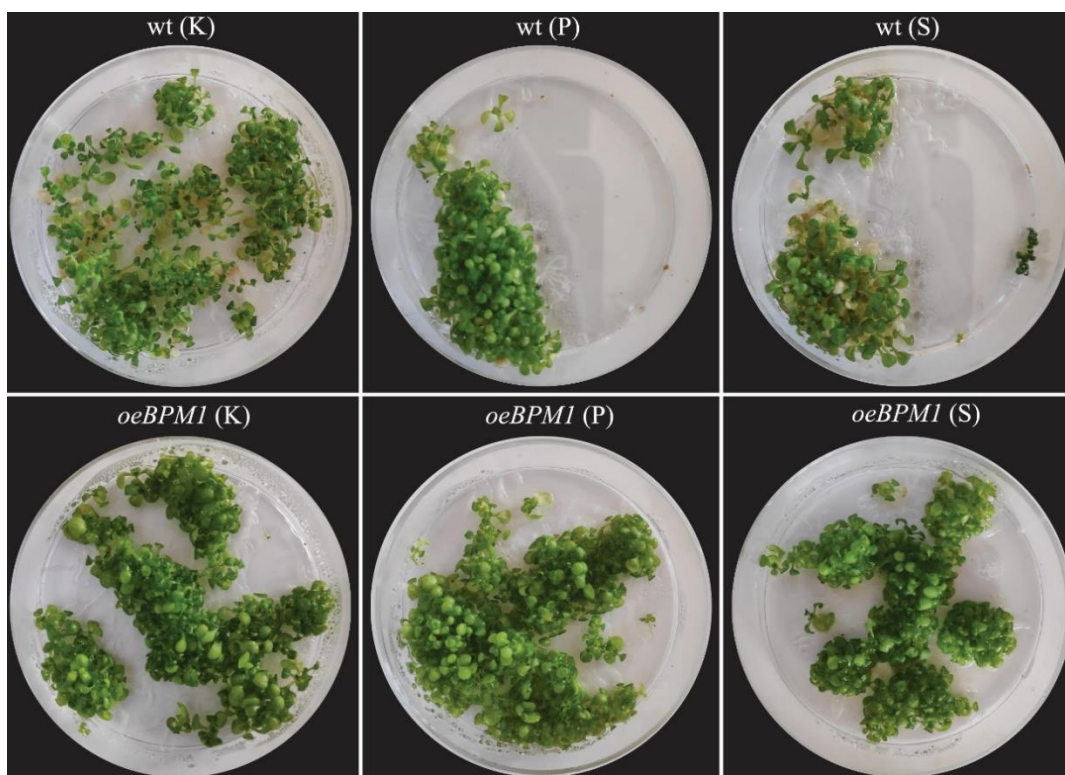
3.15. Statistička obrada podataka

Sve dobivene brojčane podatke obradili smo računalnim programom Microsoft Excel 2016 (iz paketa programa Microsoft Office Professional Plus 2016), pri čemu smo konačne rezultate prikazali kao srednje vrijednosti od pet do šest bioloških replika, a odstupanje od srednje vrijednosti izrazili smo kao standardnu pogrešku. Podatke smo statistički obradili računalnim programom Statistica 13 (TIBCO Software Inc., SAD). Proveli smo jednosmjernu analizu varijance (engl. *one-way ANOVA*), nakon čega smo izveli Tukeyjev test za nejednaki broj uzoraka (engl. *Tukey HSD for unequal N*) s ciljem određivanja značajnosti razlika između kontrolnih i tretiranih skupina te između biljaka divljeg tipa i biljaka s povećanom razinom ekspresije gena *BPM1*. Kod svih provedenih pokusa statistički značajnima smatrali smo samo one rezultate gdje smo dobili razinu značajnosti manju ili jednaku 0,05 ($p \leq 0,05$). Za kvantificiranje razine ekspresija proteina HSP70 u biljnom tkivu u metodi western koristili smo računalni program ImageJ2.

4. REZULTATI

4.1. Izgled i preživljavanje biljaka

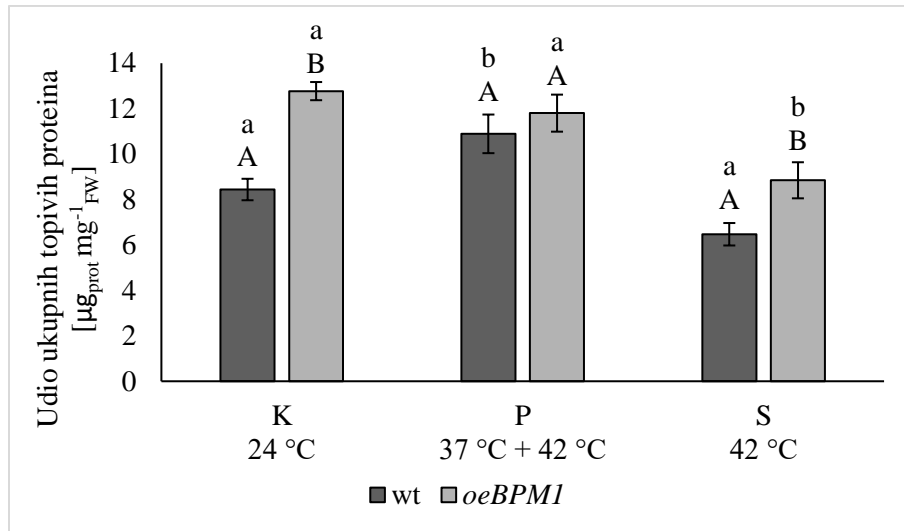
Izlaganje biljaka *A. thaliana* toplinskom stresu od 42 °C u trajanju od šest sati, u divljeg tipa (wt (S)) i u linije s povećanom razinom ekspresije gena *BPM1* (*oeBPM1* (S)) dovelo je do postupnog venuća i uginuća. U trenutku izrade ekstrakata i mjerenja fluorescencije klorofila *a* sve su biljke imale normalan izgled, odnosno nije bilo znakova venuća. Također, u tom trenutku nije bila vidljiva razlika između pojedinih linija (wt i *oeBPM1*) niti pojedinih tretmana (K, P i S) (Slika 2). Međutim, u naredna četiri dana biljke *A. thaliana* objiju linija (wt i *oeBPM1*) izložene toplinskom stresu od 42 °C u trajanju od šest sati (skupina S) počele su venuti, što je u konačnici dovelo do uginuća biljaka u razdoblju 5 – 7 dana nakon tretmana.



Slika 2. Izgled biljaka *A. thaliana* divljeg tipa (wt) i biljaka s povećanom razinom ekspresije gena *BPM1* (*oeBPM1*). Prikazano je tkivo kljanaca kontrolnih biljaka koje nisu bile izložene stresu (K), biljaka koje su stresu od 42 °C izložene nakon primarnog tretmana od 37 °C (P) i biljaka izloženih stresu od 42 °C bez primarnog tretmana (S), u trenutku izrade ekstrakata i mjerenja fluorescencije klorofila *a* metodom OJIP (13 dana i 6 h od početka uzgoja u komori).

4.2. Udio ukupnih topivih proteina

Izlaganje biljaka *A. thaliana* toplinskom stresu od 42 °C u trajanju od šest sati u divljeg tipa (wt (S)) nije dovelo do statistički značajne promjene udjela ukupnih topivih proteina u odnosu na kontrolu (wt (K)), dok je u biljaka koje su podvrgnute primarnom tretmanu od 37 °C (wt (P)) došlo do povećanja količine ukupnih topivih proteina u odnosu na kontrolu (wt (K)) (Slika 3). U biljaka koje imaju povećanu razinu ekspresije gena *BPM1* (*oeBPM1*) izlaganje toplinskom stresu (*oeBPM1* (S)) dovelo je do statistički značajnog smanjenja udjela ukupnih proteina u odnosu na kontrolu (*oeBPM1* (K)). Biljke wt (K) imale su statistički značajno manji udio ukupnih topivih proteina od skupine *oeBPM1* (K), jednako kao i skupina wt (S) od skupine *oeBPM1* (S). Između biljaka izloženih primarnom tretmanu (wt (P) i *oeBPM1* (P)) nismo uočili statistički značajnu razliku. Nadalje, u biljaka izloženim primarnom tretmanu (wt (P) i *oeBPM1* (P)) bio je veći udio proteina u usporedbi s kontrolnim biljkama divljeg tipa (wt (K)) te biljkama koje su bile izložene temperaturi od 42 °C bez primarnog tretmana (wt (S) i *oeBPM1* (S)).



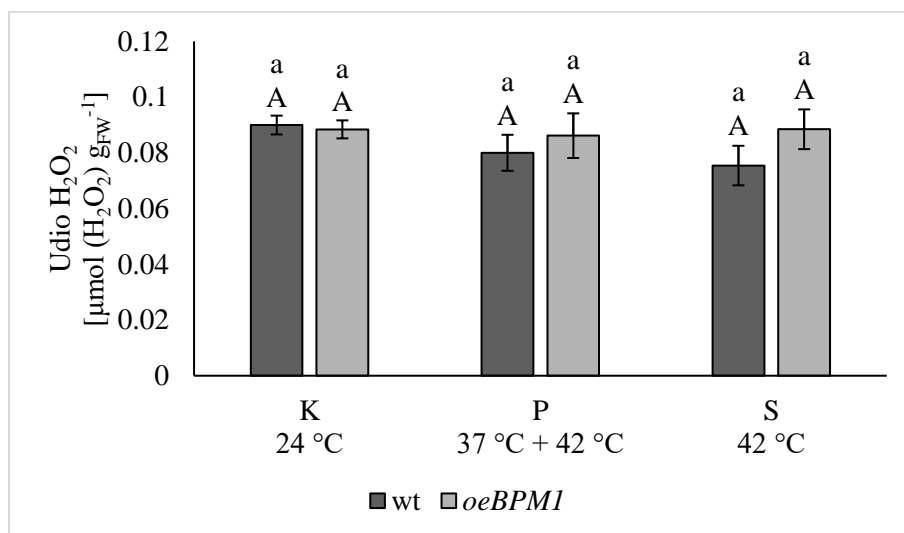
Slika 3. Udio ukupnih topivih proteina u listovima biljaka *A. thaliana* divljeg tipa (wt) i biljaka s povećanom razinom ekspresije gena *BPM1* (*oeBPM1*).

Analizirano je tkivo klijanaca kontrolnih biljaka koje nisu bile izložene stresu (K), biljaka koje su stresu od 42 °C izložene nakon primarnog tretmana od 37 °C (P) i biljaka izloženih stresu od 42 °C bez primarnog tretmana (S).

Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost pet ili šest bioloških replika \pm standardna pogreška. Rezultati koji se međusobno značajno razlikuju (prema Tukeyjevom testu za nejednak broj uzoraka) na razini $p \leq 0,05$, označeni su različitim slovima, pri čemu mala slova označavaju usporedbu odgovora pojedine linije (wt ili *oeBPM1*) na različite tretmane (K, P i S), dok velika slova označavaju usporedbu odgovora dviju linija biljaka (wt i *oeBPM1*) na pojedini tretman (K, P ili S).

4.3. Udio vodikovog peroksida

Izlaganje biljaka *A. thaliana* toplinskom stresu od 42 °C u trajanju od šest sati nakon primarnog tretmana kao i izlaganje stresu bez primarnog tretmana nije dovelo do statistički značajne promjene u udjelu H₂O₂ u odnosu na kontrolnu skupinu biljaka. Također, nije bilo razlike između biljaka wt i *oeBPM1* (Slika 4).



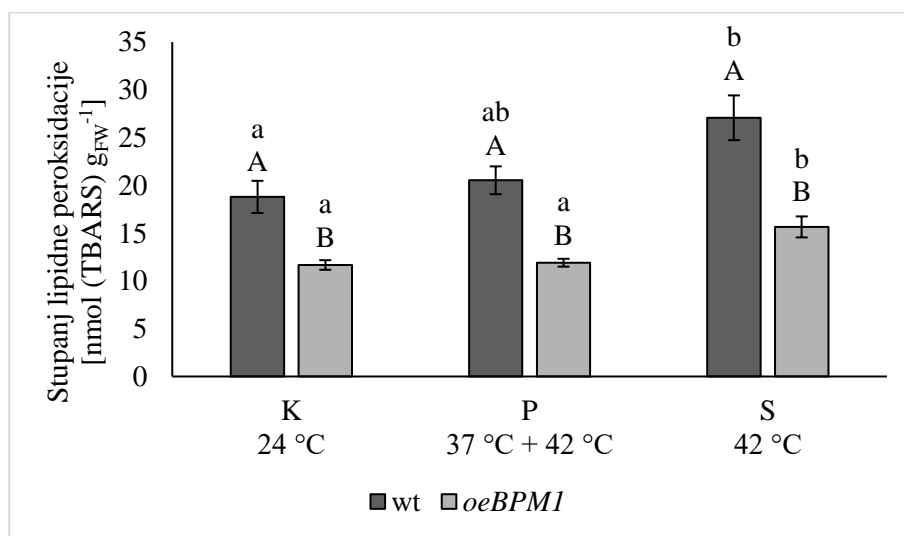
Slika 4. Udio H₂O₂ u listovima biljaka *A. thaliana* divljeg tipa (wt) i biljaka s povećanom razinom ekspresije gena *BPM1* (*oeBPM1*).

Analizirano je tkivo klijanaca kontrolnih biljaka koje nisu bile izložene stresu (K), biljaka koje su stresu od 42 °C izložene nakon primarnog tretmana od 37 °C (P) i biljaka izloženih stresu od 42 °C bez primarnog tretmana (S).

Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost pet ili šest bioloških replika ± standardna pogreška. Rezultati koji se međusobno značajno razlikuju (prema Tukeyjevom testu za nejednak broj uzoraka) na razini $p \leq 0,05$, označeni su različitim slovima, pri čemu mala slova označavaju usporedbu odgovora pojedine linije (wt ili *oeBPM1*) na različite tretmane (K, P i S), dok velika slova označavaju usporedbu odgovora dviju linija biljaka (wt i *oeBPM1*) na pojedini tretman (K, P ili S).

4.4. Stupanj lipidne peroksidacije

Izlaganje biljaka *A. thaliana* toplinskom stresu od 42 °C u trajanju od šest sati kod skupine wt (S) dovelo je do statistički značajnog povećanja stupnja lipidne peroksidacije u odnosu na skupinu wt (K), dok se stupanj lipidne peroksidacije u skupine wt (P) nije značajno razlikovao u odnosu na skupine wt (K) i wt (S). Kod skupine *oeBPMI* (S) uočili smo statistički značajno povećanje stupnja lipidne peroksidacije u odnosu na skupine *oeBPMI* (K) i *oeBPMI* (P). Usporedbom biljaka divljeg tipa (wt) s odgovarajućom skupinom biljaka s povećanom razinom ekspresije gena *BPMI* (*oeBPMI*) izloženom istim uvjetima (K, P i S) uočili smo statistički značajno viši stupanj lipidne peroksidacije u biljaka divljeg tipa (Slika 5).



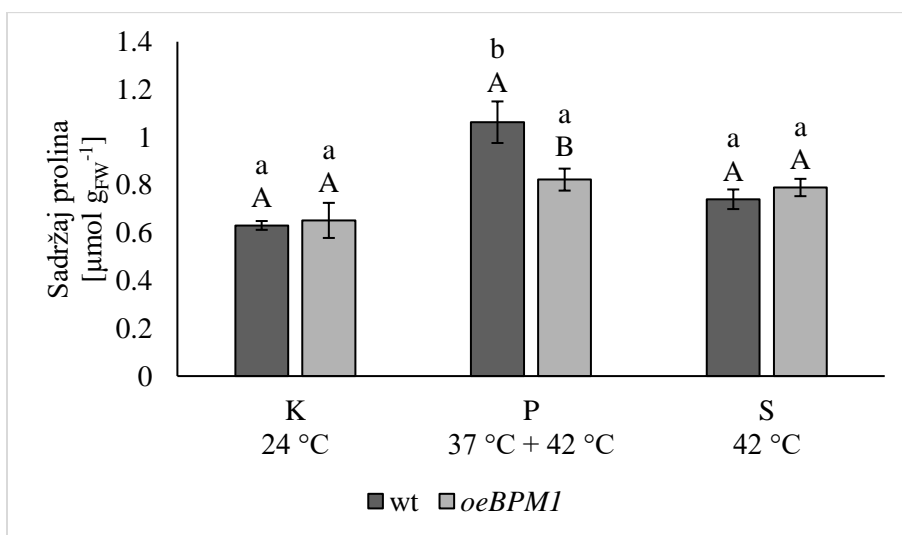
Slika 5. Stupanj lipidne peroksidacije u listovima biljaka *A. thaliana* divljeg tipa (wt) i biljaka s povećanom razinom ekspresije gena *BPMI* (*oeBPMI*).

Analizirano je tkivo klijanaca kontrolnih biljaka koje nisu bile izložene stresu (K), biljaka koje su stresu od 42 °C izložene nakon primarnog tretmana od 37 °C (P) i biljaka izloženih stresu od 42 °C bez primarnog tretmana (S).

Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost pet ili šest bioloških replika ± standardna pogreška. Rezultati koji se međusobno značajno razlikuju (prema Tukeyjevom testu za nejednak broj uzoraka) na razini $p \leq 0,05$, označeni su različitim slovima, pri čemu mala slova označavaju usporedbu odgovora pojedine linije (wt ili *oeBPMI*) na različite tretmane (K, P i S), dok velika slova označavaju usporedbu odgovora dviju linija biljaka (wt i *oeBPMI*) na pojedini tretman (K, P ili S).

4.5. Sadržaj prolina

Izlaganje biljaka *A. thaliana* toplinskom stresu od 42 °C u trajanju od šest sati s prethodnim izlaganjem primarnom tretmanu u divljeg tipa (wt (P)) dovelo je do statistički značajnog povećanja sadržaja prolina u odnosu na skupine wt (K) i wt (S). Kod biljaka s povećanom razinom ekspresije gena *BPM1* (*oeBPM1* (K), *oeBPM1* (P) i *oeBPM1* (S)) nismo uočili statistički značajnu razliku u sadržaju prolina između pojedinih skupina. Skupina wt (P) imala je značajno viši sadržaj prolina u odnosu na skupinu *oeBPM1* (P) (Slika 6).



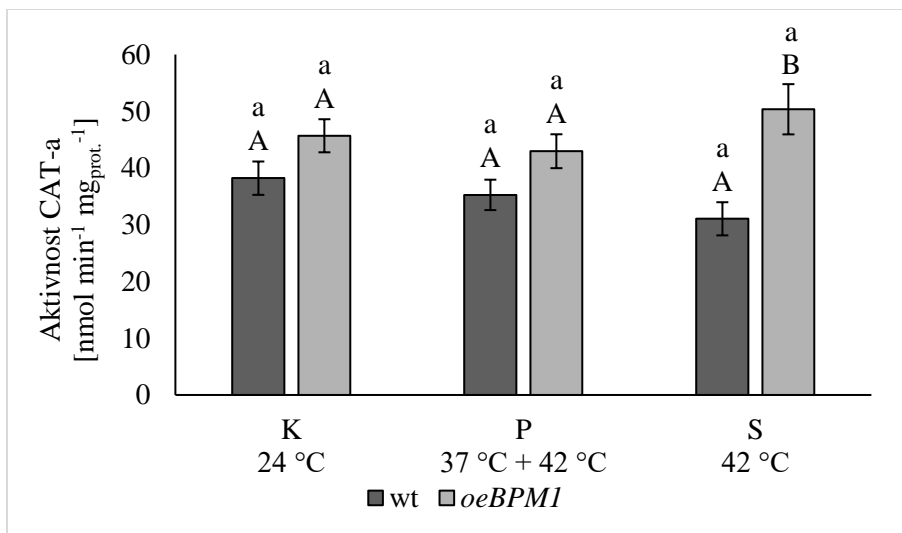
Slika 6. Sadržaj prolina u listovima biljaka *A. thaliana* divljeg tipa (wt) i biljaka s povećanom razinom ekspresije gena *BPM1* (*oeBPM1*).

Analizirano je tkivo klijanaca kontrolnih biljaka koje nisu bile izložene stresu (K), biljaka koje su stresu od 42 °C izložene nakon primarnog tretmana od 37 °C (P) i biljaka izloženih stresu od 42 °C bez primarnog tretmana (S).

Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost pet ili šest bioloških replika \pm standardna pogreška. Rezultati koji se međusobno značajno razlikuju (prema Tukeyjevom testu za nejednak broj uzoraka) na razini $p \leq 0,05$, označeni su različitim slovima, pri čemu mala slova označavaju usporedbu odgovora pojedine linije (wt ili *oeBPM1*) na različite tretmane (K, P i S), dok velika slova označavaju usporedbu odgovora dviju linija biljaka (wt i *oeBPM1*) na pojedini tretman (K, P ili S).

4.6. Aktivnost katalaze

Izlaganje biljaka *A. thaliana* toplinskom stresu od 42 °C u trajanju od šest sati dovelo je do statistički značajne razlike u aktivnosti CAT-a između skupina wt (S) i *oeBPM1* (S): skupina *oeBPM1* (S) imala je značajno povećanu razinu aktivnosti CAT-a u odnosu na skupinu wt (S). Između ostalih skupina biljaka nije uočena statistički značajna razlika u aktivnosti CAT-a (Slika 7).



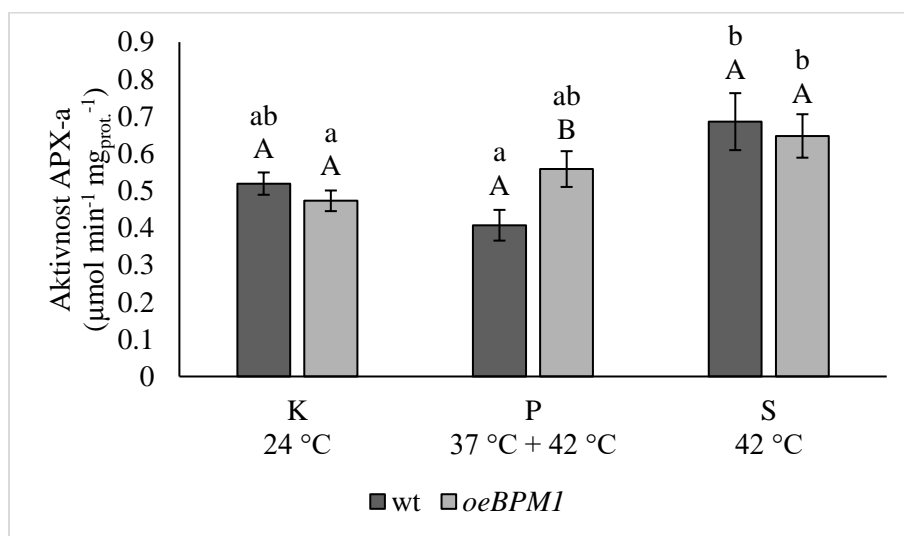
Slika 7. Aktivnost CAT-a u ekstraktima biljaka *A. thaliana* divljeg tipa (wt) i biljaka s povećanom razinom ekspresije gena *BPM1* (*oeBPM1*).

Analizirano je tkivo klijanaca kontrolnih biljaka koje nisu bile izložene stresu (K), biljaka koje su stresu od 42 °C izložene nakon primarnog tretmana od 37 °C (P) i biljaka izloženih stresu od 42 °C bez primarnog tretmana (S).

Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost pet ili šest bioloških replika \pm standardna pogreška. Rezultati koji se međusobno značajno razlikuju (prema Tukeyjevom testu za nejednak broj uzoraka) na razini $p \leq 0,05$, označeni su različitim slovima, pri čemu mala slova označavaju usporedbu odgovora pojedine linije (wt ili *oeBPM1*) na različite tretmane (K, P i S), dok velika slova označavaju usporedbu odgovora dviju linija biljaka (wt i *oeBPM1*) na pojedini tretman (K, P ili S).

4.7. Aktivnost askorbat peroksidaze

Izlaganje biljaka *A. thaliana* toplinskom stresu od 42 °C u trajanju od šest sati bez prethodnog izlaganja primarnom tretmanu u divljeg tipa (wt (S)) dovelo je do statistički značajnog povećanja aktivnosti APX-a u odnosu na skupinu wt (P), dok se aktivnost APX-a u skupine wt (K) nije razlikovala u odnosu na skupine wt (P) i wt (S). Skupina *oeBPM1* (S) imala je statistički značajno povećanu aktivnost APX-a u odnosu na skupinu *oeBPM1* (K), dok aktivnost istog enzima u skupine *oeBPM1* (P) nije bila statistički značajno različita u odnosu na skupine *oeBPM1* (K) i *oeBPM1* (S). Uočili smo statistički značajno povećanje aktivnosti APX-a u skupine *oeBPM1* (P) u odnosu na skupinu wt (P) (Slika 8).



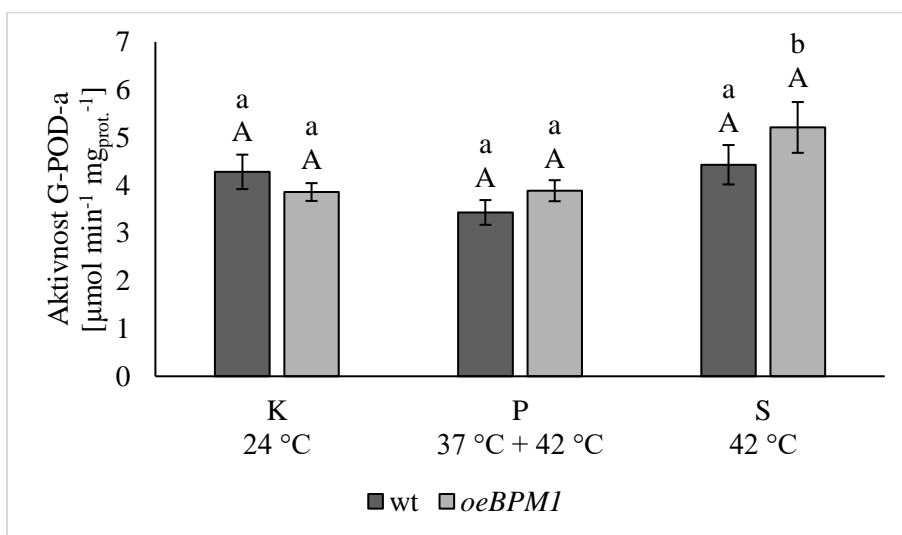
Slika 8. Aktivnost APX-a u ekstraktima biljaka *A. thaliana* divljeg tipa (wt) i biljaka s povećanom razinom ekspresije gena *BPM1* (*oeBPM1*).

Analizirano je tkivo klijanaca kontrolnih biljaka koje nisu bile izložene stresu (K), biljaka koje su stresu od 42 °C izložene nakon primarnog tretmana od 37 °C (P) i biljaka izloženih stresu od 42 °C bez primarnog tretmana (S).

Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost pet ili šest bioloških replika ± standardna pogreška. Rezultati koji se međusobno značajno razlikuju (prema Tukeyjevom testu za nejednak broj uzoraka) na razini $p \leq 0,05$, označeni su različitim slovima, pri čemu mala slova označavaju usporedbu odgovora pojedine linije (wt ili *oeBPM1*) na različite tretmane (K, P i S), dok velika slova označavaju usporedbu odgovora dviju linija biljaka (wt i *oeBPM1*) na pojedini tretman (K, P ili S).

4.8. Aktivnost gvajakol peroksidaze

Izlaganje biljaka divljeg tipa *A. thaliana* toplinskom stresu od 42 °C u trajanju od šest sati s prethodnim izlaganjem primarnom tretmanu (wt (P)) i bez primarnog tretmana (wt (S)) nije dovelo do statistički značajne promjene aktivnosti G-POD-a u odnosu na kontrolu (wt (K)). U biljaka koje imaju povećanu razinu ekspresije gena *BPM1*, u skupine *oeBPM1* (S) došlo je do značajnog povećanja aktivnosti G-POD-a u odnosu na skupine *oeBPM1* (K) i *oeBPM1* (P). Između biljaka divljeg tipa i biljaka koje imaju povećanu razinu ekspresije gena *BPM1* unutar pojedinih tretmana (K, P i S) nismo uočili statistički značajnu razliku u aktivnosti G-POD-a (Slika 9).



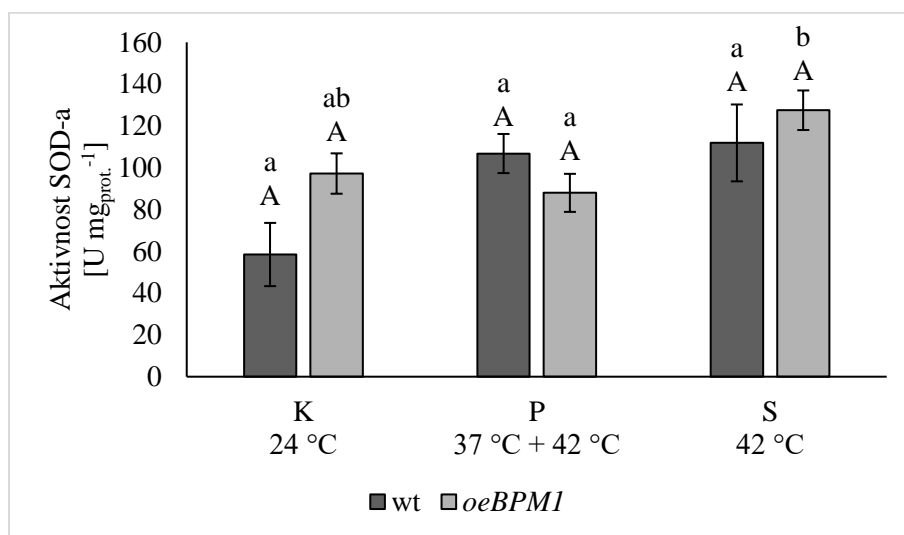
Slika 9. Aktivnost G-POD-a u ekstraktima biljaka *A. thaliana* divljeg tipa (wt) i biljaka s povećanom razinom ekspresije gena *BPM1* (*oeBPM1*).

Analizirano je tkivo klijanaca kontrolnih biljaka koje nisu bile izložene stresu (K), biljaka koje su stresu od 42 °C izložene nakon primarnog tretmana od 37 °C (P) i biljaka izloženih stresu od 42 °C bez primarnog tretmana (S).

Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost pet ili šest bioloških replika \pm standardna pogreška. Rezultati koji se međusobno značajno razlikuju (prema Tukeyjevom testu za nejednak broj uzoraka) na razini $p \leq 0,05$, označeni su različitim slovima, pri čemu mala slova označavaju usporedbu odgovora pojedine linije (wt ili *oeBPM1*) na različite tretmane (K, P i S), dok velika slova označavaju usporedbu odgovora dviju linija biljaka (wt i *oeBPM1*) na pojedini tretman (K, P ili S).

4.9. Aktivnost superoksid dismutaze

Izlaganje biljaka divljeg tipa *A. thaliana* toplinskom stresu od 42 °C u trajanju od šest sati, s prethodnim izlaganjem primarnom tretmanu (wt (P)) i bez primarnog tretmana (wt (S)), nije dovelo do statistički značajne promjene u aktivnosti SOD-a u odnosu na kontrolu (wt (K)). U biljaka koje imaju povećanu razinu ekspresije gena *BPM1* u skupine *oeBPM1* (S) došlo je do statistički značajnog povećanja aktivnosti SOD-a u odnosu na skupinu *oeBPM1* (P), dok se aktivnost istog enzima u skupine *oeBPM1* (K) nije značajno razlikovala u odnosu na skupine *oeBPM1* (P) i *oeBPM1* (S). Između biljaka divljeg tipa i biljaka koje imaju povećanu razinu ekspresije gena *BPM1* unutar pojedinih tretmana (K, P i S) nismo uočili statistički značajnu promjenu u aktivnosti SOD-a (Slika 10).



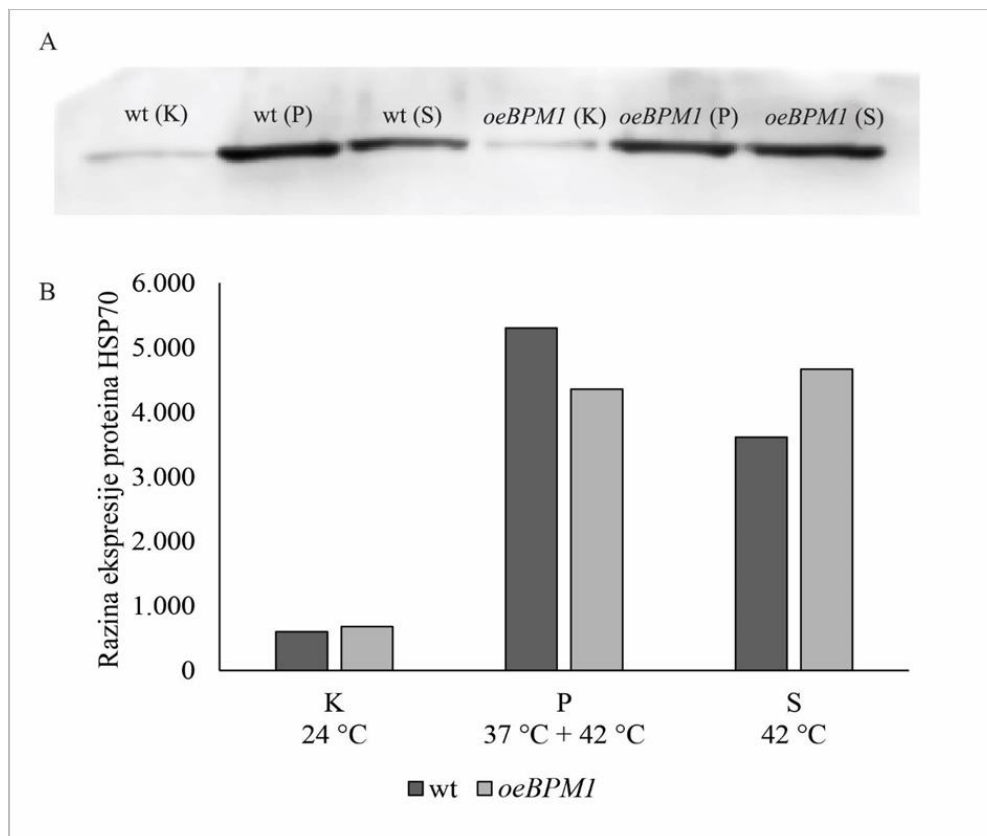
Slika 10. Aktivnost SOD-a u ekstraktima biljaka *A. thaliana* divljeg tipa (wt) i biljaka s povećanom razinom ekspresije gena *BPM1* (*oeBPM1*).

Analizirano je tkivo klijanaca kontrolnih biljaka koje nisu bile izložene stresu (K), biljaka koje su stresu od 42 °C izložene nakon primarnog tretmana od 37 °C (P) i biljaka izloženih stresu od 42 °C bez primarnog tretmana (S).

Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost četiriju ili pet bioloških replika \pm standardna pogreška. Rezultati koji se međusobno značajno razlikuju (prema Tukeyjevom testu za nejednak broj uzoraka) na razini $p \leq 0,05$, označeni su različitim slovima, pri čemu mala slova označavaju usporedbu odgovora pojedine linije (wt ili *oeBPM1*) na različite tretmane (K, P i S), dok velika slova označavaju usporedbu odgovora dviju linija biljaka (wt i *oeBPM1*) na pojedini tretman (K, P ili S).

4.10. Ekspresija proteina HSP70

Izlaganje biljaka divljeg tipa *A. thaliana* toplinskom stresu od 42 °C u trajanju od šest sati s prethodnim izlaganjem primarnom tretmanu (wt (P)) i bez primarnog tretmana (wt (S)) dovelo je do povećanja razine ekspresije proteina HSP70 u odnosu na kontrolu (wt (K)). U biljaka koje imaju povećanu razinu ekspresije gena *BPM1*, u skupina *oeBPM1* (P) i *oeBPM1* (S) također smo uočili povećanje razine ekspresije proteina HSP70 u odnosu na kontrolu (*oeBPM1* (K)) (Slika 11).



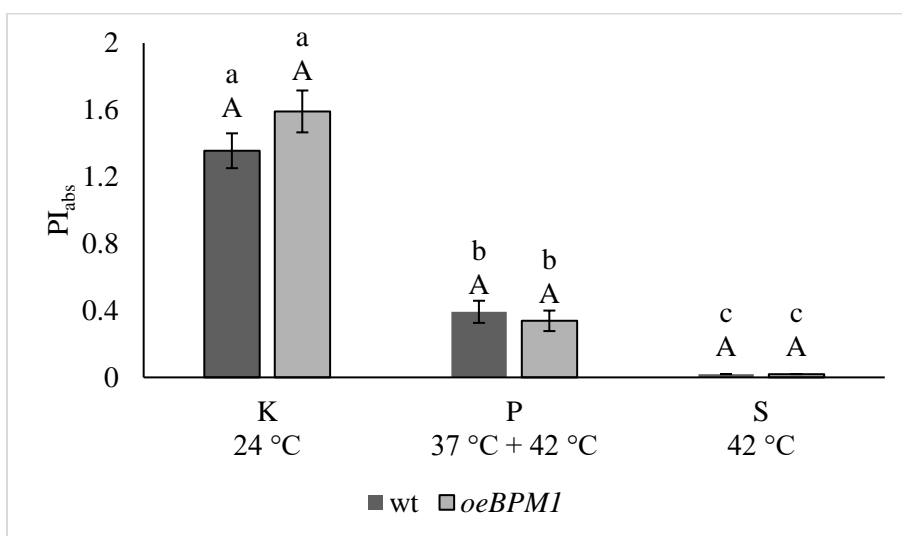
Slika 11. Razina ekspresije proteina HSP70 u listovima biljaka *A. thaliana* divljeg tipa (wt) i biljaka s povećanom razinom ekspresije gena *BPM1* (*oeBPM1*). Analizirano je tkivo klijanaca kontrolnih biljaka koje nisu bile izložene stresu (K), biljaka koje su stresu od 42 °C izložene nakon primarnog tretmana od 37 °C (P) i biljaka izloženih stresu od 42 °C bez primarnog tretmana (S).

(A) Snimka membrane nakon provedene metode western koja prikazuje detekciju proteina HSP70. (B) Rezultati kvantifikacije razine ekspresije proteina određeni pomoću programa ImageJ2 na temelju Slike 11A.

4.11. Fotosintetska učinkovitost na temelju parametara određenih metodom OJIP

4.11.1. Indeks fotosintetske učinkovitosti

Izlaganje biljaka divljeg tipa *A. thaliana* toplinskom stresu od 42 °C u trajanju od šest sati bez prethodnog izlaganja primarnom tretmanu (wt (S)) i nakon primarnog tretmana (wt (P)) dovelo je do statistički značajnog smanjenja indeksa fotosintetske učinkovitosti (PI_{abs}) u odnosu na skupinu wt (K). U biljaka koje imaju povećanu razinu ekspresije gena *BPM1* u skupina *oeBPM1* (P) i *oeBPM1* (S) dobivene vrijednosti ukazuju na značajno smanjenje PI_{abs} u odnosu na kontrolu (*oeBPM1* (K)). Smanjenje je također bilo više izraženo u skupine izložene stresu bez prethodnog izlaganja primarnom tretmanu. Između biljaka divljeg tipa i biljaka koje imaju povećanu razinu ekspresije gena *BPM1* unutar pojedinih tretmana (K, P i S) dobivene vrijednosti ne ukazuju na statistički značajnu promjenu PI_{abs} (Slika 12).



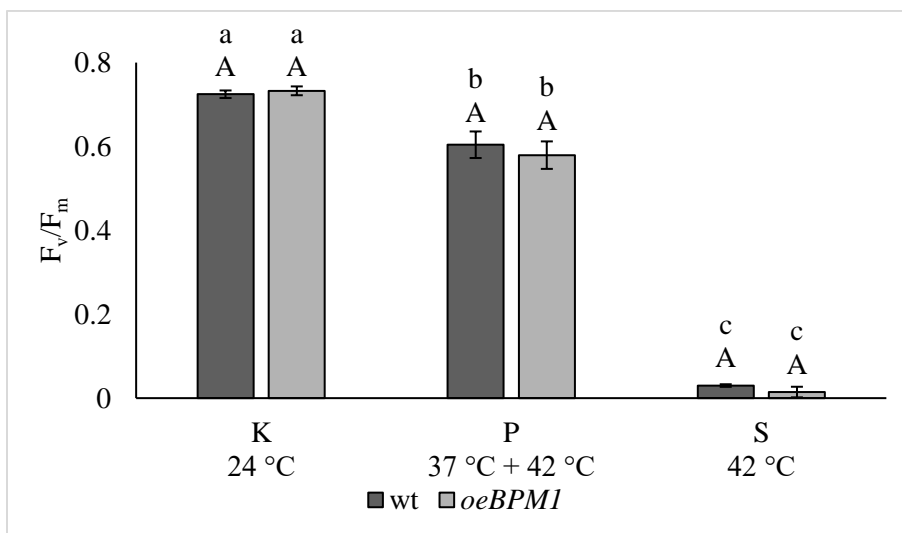
Slika 12. Indeks fotosintetske učinkovitosti izmjeren na listovima biljaka *A. thaliana* divljeg tipa (wt) i biljaka s povećanom razinom ekspresije gena *BPM1* (*oeBPM1*).

Analizirano je tkivo klijanaca kontrolnih biljaka koje nisu bile izložene stresu (K), biljaka koje su stresu od 42 °C izložene nakon primarnog tretmana od 37 °C (P) i biljaka izloženih stresu od 42 °C bez primarnog tretmana (S).

Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost pet ili šest bioloških replika \pm standardna pogreška. Rezultati koji se međusobno značajno razlikuju (prema Tukeyjevom testu za nejednak broj uzoraka) na razini $p \leq 0,05$, označeni su različitim slovima, pri čemu mala slova označavaju usporedbu odgovora pojedine linije (wt ili *oeBPM1*) na različite tretmane (K, P i S), dok velika slova označavaju usporedbu odgovora dviju linija biljaka (wt i *oeBPM1*) na pojedini tretman (K, P ili S).

4.11.2. Maksimalni kvantni prinos fotosustava II

Izlaganje biljaka divljeg tipa *A. thaliana* toplinskom stresu od 42 °C u trajanju od šest sati bez prethodnog izlaganja primarnom tretmanu (wt (S)) i uz primarni tretman (wt (P)) dovelo je do statistički značajnog smanjenja maksimalnog kvantnog prinosa PSII (F_v/F_m) u odnosu na skupinu wt (K), i to do većeg smanjenja u skupine izložene stresu bez prethodnog izlaganja primarnom tretmanu. U biljaka koje imaju povećanu razinu ekspresije gena *BPM1* u skupina *oeBPM1* (P) i *oeBPM1* (S) dobivene vrijednosti također ukazuju na značajno smanjenje F_v/F_m u odnosu na kontrolu (*oeBPM1* (K)), i to veće smanjenje u skupine izložene stresu bez prethodnog izlaganja primarnom tretmanu. Između biljaka divljeg tipa i biljaka koje imaju povećanu razinu ekspresije gena *BPM1* unutar pojedinih tretmana (K, P i S) dobivene vrijednosti ne ukazuju na statistički značajnu promjenu F_v/F_m (Slika 13).



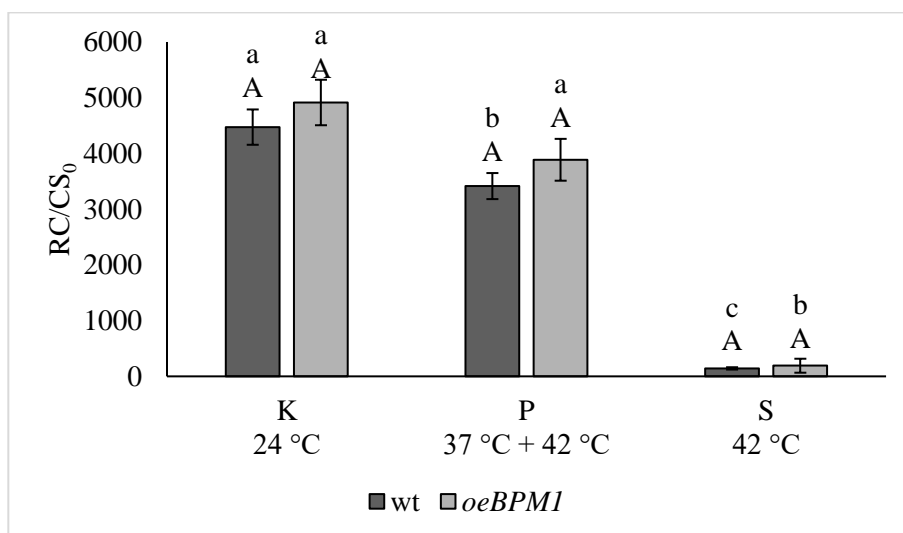
Slika 13. Maksimalni kvantni prinos PSII izmjeren na listovima biljaka *A. thaliana* divljeg tipa (wt) i biljaka s povećanom razinom ekspresije gena *BPM1* (*oeBPM1*).

Analizirano je tkivo klijanaca kontrolnih biljaka koje nisu bile izložene stresu (K), biljaka koje su stresu od 42 °C izložene nakon primarnog tretmana od 37 °C (P) i biljaka izloženih stresu od 42 °C bez primarnog tretmana (S).

Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost pet ili šest bioloških replika \pm standardna pogreška. Rezultati koji se međusobno značajno razlikuju (prema Tukeyjevom testu za nejednak broj uzoraka) na razini $p \leq 0,05$, označeni su različitim slovima, pri čemu mala slova označavaju usporedbu odgovora pojedine linije (wt ili *oeBPM1*) na različite tretmane (K, P i S), dok velika slova označavaju usporedbu odgovora dviju linija biljaka (wt i *oeBPM1*) na pojedini tretman (K, P ili S).

4.11.3. Gustoća aktivnih reakcijskih centara

Izlaganje biljaka divljeg tipa *A. thaliana* toplinskom stresu od 42 °C u trajanju od šest sati bez prethodnog izlaganja primarnom tretmanu (wt (S)) i nakon primarnog tretmana (wt (P)) dovelo je do statistički značajnog smanjenja gustoće aktivnih reakcijskih centara (RC/CS₀) u odnosu na skupinu wt (K), i to do većeg smanjenja u skupine izložene stresu bez prethodnog primarnog tretmana. U biljaka koje imaju povećanu razinu ekspresije gena *BPM1* u skupine *oeBPM1* (S) dobivene vrijednosti ukazuju na statistički značajno smanjenje RC/CS₀ u odnosu na skupine *oeBPM1* (K) i *oeBPM1* (P), dok između skupina *oeBPM1* (K) i *oeBPM1* (P) nema značajne razlike. Između biljaka divljeg tipa i biljaka koje imaju povećanu razinu ekspresije gena *BPM1* unutar pojedinih tretmana (K, P i S) dobivene vrijednosti ne ukazuju na statistički značajnu promjenu RC/CS₀ (Slika 14).



Slika 14. Gustoća aktivnih reakcijskih centara izmjerena na listovima biljaka *A. thaliana* divljeg tipa (wt) i biljaka s povećanom razinom ekspresije gena *BPM1* (*oeBPM1*).

Analizirano je tkivo klijanaca kontrolnih biljaka koje nisu bile izložene stresu (K), biljaka koje su stresu od 42 °C izložene nakon primarnog tretmana od 37 °C (P) i biljaka izloženih stresu od 42 °C bez primarnog tretmana (S).

Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost pet ili šest bioloških replika ± standardna pogreška. Rezultati koji se međusobno značajno razlikuju (prema Tukeyjevom testu za nejednak broj uzoraka) na razini $p \leq 0,05$, označeni su različitim slovima, pri čemu mala slova označavaju usporedbu odgovora pojedine linije (wt ili *oeBPM1*) na različite tretmane (K, P i S), dok velika slova označavaju usporedbu odgovora dviju linija biljaka (wt i *oeBPM1*) na pojedini tretman (K, P ili S).

4.11.4. Apsorpcija svjetlosti, protok uhvaćenih fotona, prijenos elektrona i rasipanje energije po aktivnom reakcijskom centru fotosustava II

Izlaganje biljaka divljeg tipa *A. thaliana* toplinskom stresu od 42 °C u trajanju od šest sati bez prethodnog priminga (wt (S)) dovelo je do statistički značajnog povećanja apsorpcije po reakcijskom centru (ABS/RC) i rasipanja energije po reakcijskom centru (DI₀/RC) u odnosu na skupine wt (K) i wt (P). Između biljaka wt (K), wt (P) i wt (S) nije uočena statistički značajna razlika u protoku uhvaćenih fotona po reakcijskom centru (TR₀/RC) i prijenosu elektrona po reakcijskom centru (ET₀/RC). U biljaka koje imaju povećanu razinu ekspresije gena *BPM1* u skupina *oeBPM1* (P) i *oeBPM1* (S) dobivene vrijednosti ne ukazuju na značajnu promjenu niti jednog parametra (ABS/RC, TR₀/RC, ET₀/RC i DI₀/RC) u odnosu na kontrolu (*oeBPM1* (K)). Između biljaka divljeg tipa i biljaka koje imaju povećanu razinu ekspresije gena *BPM1* uočili smo povećanje TR₀/RC, ET₀/RC i DI₀/RC kod skupine *oeBPM1* (P) u odnosu na skupinu wt (P), dok kod skupina K i S nismo uočili statistički značajnu promjenu istih parametara između linija wt i *oeBPM1*. Parametar ABS/RC nije se statistički značajno razlikovao između biljaka divljeg tipa i biljaka s povećanom razinom ekspresije gena *BPM1* (Tablica 2).

Tablica 2. Apsorpcija svjetlosti (ABS/RC), protok uhvaćenih fotona (TR₀/RC), prijenos elektrona (ET₀/RC) i rasipanje energije po reakcijskom centru (DI₀/RC) izmjereni na listovima biljaka *A. thaliana* divljeg tipa (wt) i biljaka s povećanom razinom ekspresije gena *BPM1* (*oeBPM1*).

Analizirano je tkivo klijanaca kontrolnih biljaka koje nisu bile izložene stresu (K), biljaka koje su stresu od 42 °C izložene nakon primarnog tretmana od 37 °C (P) i biljaka izloženih stresu od 42 °C bez primarnog tretmana (S).

Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost pet ili šest bioloških replika ± standardna pogreška. Rezultati koji se međusobno značajno razlikuju (prema Tukeyjevom testu za nejednak broj uzoraka) na razini $p \leq 0,05$, označeni su različitim slovima, pri čemu mala slova označavaju usporedbu odgovora pojedine linije (wt ili *oeBPM1*) na različite tretmane (K, P i S), dok velika slova označavaju usporedbu odgovora dviju linija biljaka (wt i *oeBPM1*) na pojedini tretman (K, P ili S).

	linija biljaka	K	P	S
ABS/RC	wt	3,002 ± 0,060 aA	3,265 ± 0,274 aA	73,042 ± 6,145 bA
	<i>oeBPM1</i>	2,987 ± 0,073 aA	3,826 ± 0,160 aA	42,246 ± 36,858 aA
TR ₀ /RC	wt	2,176 ± 0,054 aA	1,934 ± 0,076 aA	2,252 ± 0,156 aA
	<i>oeBPM1</i>	2,188 ± 0,058 aA	2,194 ± 0,064 aB	2,355 ± 0,182 aA
ET ₀ /RC	wt	1,266 ± 0,061 aA	0,903 ± 0,061 aA	0,734 ± 0,043 aA
	<i>oeBPM1</i>	1,376 ± 0,021 aA	1,145 ± 0,021 aB	3,024 ± 1,788 aA
DI ₀ /RC	wt	0,827 ± 0,029 aA	1,128 ± 0,116 aA	70,912 ± 6,219 bA
	<i>oeBPM1</i>	0,800 ± 0,039 aA	1,777 ± 0,120 aB	41,491 ± 36,499 aA

5. RASPRAVA

Nakon tretmana temperaturom od 42 °C i perioda oporavka, odnosno u trenutku izrade ekstrakata i mjerenja fluorescencije klorofila *a*, klijanci su izgledali normalno, tj. nije bilo znakova venuća (Slika 2). Nije bilo razlika između kontrolnih biljaka i biljaka izloženih toplinskom stresu. Također, prethodni primarni tretman temperaturom od 37 °C kao ni njegov izostanak nisu imali utjecaja na izgled biljaka. Međutim, biljke izložene stresu bez primarnog tretmana tijekom sljedeća četiri dana počele su venuti, što je u konačnici dovelo do uginuća biljaka 5 – 7 dana nakon tretmana. Kontrolne biljke i biljke prethodno izložene primarnom tretmanu nisu pokazivale znakove venuća. Dakle biljke koje su prošle primarni tretman (umjereni toplinski stres) bile su pripremljene na jači toplinski stres i dugoročno preživljavanje posljedica stresa. Temperatura od 37 °C (primarni tretman) potaknula je u biljaka određene stanične promjene i aktivirala signalne puteve ili na neki drugi način pripremila biljke kako bi one mogle spremno odgovoriti na jači toplinski stres od 42 °C na razini cijelog organizma. Nije bilo razlika u morfološkom izgledu i preživljavanju biljaka linija *wt* i *oeBPM1* nakon izlaganja stresu. Dakle izlaganje biljaka obiju linija primarnom tretmanu učinkovito ih je pripremio za bolji odgovor na toplinski stres.

Poznato je da prilikom izlaganja stresu u biljaka tijekom vremena dolazi do povećane biosinteze proteina (Smirnov, 2014). Povećana biosinteza proteina ukazuje na odgovor biljke na stres: u biljnim stanicama dolazi do ekspresije različitih enzima i drugih proteina koji su biljci potrebni za postizanje otpornosti na stres, odnosno za podnošenje stresa. Naši su rezultati pokazali da je taj proces bio učinkovitiji u biljaka divljeg tipa koje su prvo bile izložene umjerenom, a potom jakom toplinskom stresu, dok izlaganje samo jakom stresu nije induciralo opisanu povećanu biosintezu proteina (Slika 3), što upućuje na to da su te biljke imale općenito lošiji odgovor na toplinski stres. Dakle, u okviru povećane biosinteze proteina primarni tretman pomogao je biljkama *wt* da se pripreme za podnošenje toplinskog stresa, dok je sam toplinski stres bio prejak i biljke obiju linija nisu uspješno odgovorile na njega bez prethodnog primarnog tretmana. Linija *oeBPM1* imala je značajno povećanu količinu proteina (udio ukupnih toplivih proteina) u odnosu na liniju *wt* kod kontrole i stresa bez primarnog tretmana, dakle biljke s povećanom razinom ekspresije proteina *BPM1* imale su povećanu biosintezu proteina i u normalnim uvjetima. Moguće je da je to posljedica upravo povećane razine ekspresije proteina *BPM1* jer je ekspresija transgena *BPM1-GFP* pod regulacijom konstitutivnog promotora 35S (Škiljaica i sur., 2020) te su bolje odgovorile

na toplinski stres. To je u korelaciji s ranije dokazanim poticanjem ekspresije i ulogom proteina BPM u odgovoru na različite stresne čimbenike (Weber i Hellmann, 2009).

Rezultati određivanja udjela H_2O_2 nisu pokazali značajnu razliku između linija wt i *oeBPM1* (Slika 4). Također, nije bilo razlike između različitih tretmana. Povećana sinteza H_2O_2 znak je oksidacijskog stresa u biljaka uslijed izlaganja različitim stresnim čimbenicima, a razgrađuju ga enzimi antioksidacijskog sustava biljke, koji se aktiviraju uslijed izlaganja stresu. Međutim, H_2O_2 je uključen kao signalna molekula i u regulaciju određenih signalnih puteva u biljaka (Choudhury i sur., 2017). Zbog složene mreže u kojoj sudjeluje H_2O_2 teško je pretpostaviti kakav bi njegov udio u biljci trebao biti uslijed izlaganja određenom tretmanu. Moguće je da je izlaganje biljaka toplinskom stresu s prethodnim primarnim tretmanom i bez njega aktiviralo enzime antioksidacijskog sustava koji su uklonili višak vodikovog peroksida (čija je sinteza inducirana istim stresom) u linija wt i *oeBPM1*. Međutim, opažena aktivnost enzima antioksidacijskog sustava koji uklanjaju H_2O_2 (tj. aktivnost CAT-a, APX-a i G-POD-a) nije bila jednaka između različitih linija i tretmana, što će biti kasnije objašnjeno, dakle u svih skupina nije bilo jednako uspješno uklanjanje H_2O_2 . Biljke smo uzorkovali 24 h nakon tretmana temperaturom od 42 °C, stoga je zaista moguće da je tijekom i nakon tretmana došlo do aktivacije antioksidacijskog sustava, koji je tijekom sljedeća 24 sata uklonio višak H_2O_2 . Druga moguća objašnjenja opaženih udjela H_2O_2 uključuju prvotno različitu razinu sinteze H_2O_2 kod različitih skupina, ali i sudjelovanje H_2O_2 u signalnim putevima koji se vjerojatno aktiviraju uslijed izlaganja stresu, a koji bi u različitim proučavanim skupina mogli biti u različitoj mjeri aktivirani, ovisno o liniji i tretmanu. Osim toga H_2O_2 sudjeluje i u drugim procesima vezanim za djelovanje stresnih uvjeta, kao što su promjene strukture stanične stijenke. Lima i sur. (2013) pokazali su na listovima kave (*Coffea arabica* L.) da izlaganje toplinskom stresu utječe na promjenu sadržaja i organizacije polimera u staničnoj stijenci. H_2O_2 nastao zbog toplinskog stresa može doprinijeti povećanju unakrsnog vezanja polimera stanične stijenke, odnosno očvršćivanju stanične stijenke, a što povećava otpornost na stresne čimbenike. Pretpostavlja se da arabinogalaktan tipa II u stresnim uvjetima sudjeluje u očvršćivanju stanične stijenke putem procesa oksidativnog unakrsnog vezanja (Seifert i Roberts, 2007).

Stupanj lipidne peroksidacije dobar je i često korišten pokazatelj oksidacijskog stresa u biljaka jer njene posljedice mogu biti vrlo štetne za biljni organizam, a uključuju oštećenja i gubitak funkcije staničnih membrana te promjene u organelima (Demidchik, 2015). Naši su rezultati

pokazali da je linija *oeBPMI* u svim tretmanima imala značajno niži stupanj lipidne peroksidacije od linije wt (Slika 5), dakle općenito niži stupanj lipidne peroksidacije neovisno o toplinskim uvjetima. Skupina *oeBPMI* (S) imala je značajno viši stupanj lipidne peroksidacije od *oeBPMI* (K), dok je skupina *oeBPMI* (P) imala stupanj lipidne peroksidacije koji se nije značajno razlikovao od kontrole iste linije. Dakle, u linije *oeBPMI* primarni tretman bio je učinkovit u pripremanju biljke na odgovor na veći toplinski stres. U linije wt, skupina wt (P) nije imala značajno niži stupanj lipidne peroksidacije od skupine wt (S), iako postoji trend smanjenja, dok wt (S) ima značajno viši stupanj od kontrole iste linije. Sumarno, primarni tretman u obiju linija bio je uspješan za pripremanje biljaka za odgovor na veći toplinski stres, nešto uspješniji u linije *oeBPMI* nego u wt. Dakle linija s povećanom razinom ekspresije gena *BPMI*, u okviru stupnja lipidne peroksidacije, općenito ima bolji odgovor na toplinski stres, neovisno o tretmanu, uz napomenu da je imala niži stupanj lipidne peroksidacije i u normalnim uvjetima (skupina *oeBPMI* (K)).

Do povećane sinteze prolina dolazi uslijed izlaganja biljaka različitim stresnim čimbenicima, a on ima višestruke uloge u odgovoru na stres: djeluje kao osmolit, kelirajući agens, molekula antioksidacijskog sustava i signalna molekula. S ulogama u održavanju turgora i osmotske ravnoteže u stanici, stabilizaciji membrana i održavanju koncentracije ROS-ova poboljšava toleranciju stresa (Hayat i sur., 2012). Značajno povećanje sadržaja prolina uočili smo u linije wt izložene primarnom tretmanu prije izlaganja većem toplinskom stresu (Slika 6). U linije *oeBPMI* nismo uočili značajno povećanje sadržaja prolina u skupine *oeBPMI* (P), međutim vidljiv je trend porasta. Sintezu prolina inducirao je umjereni toplinski stres, u linije biljaka divljeg tipa nešto uspješnije nego u biljaka s povećanom razinom ekspresije gena *BPMI*. Tretman jačim toplinskim stresom bez primarnog tretmana vjerojatno je bio prevelik stres za biljke da se potakne sinteza prolina, stoga je primarni tretman, u ovom slučaju poticanjem sinteze prolina, imao vrlo važnu ulogu u pripremanju uročnjaka za odgovor na jači toplinski stres. Određena istraživanja pokazuju da je u nekih biljaka temperatura od 42 °C ipak potaknula sintezu prolina, međutim ti su pokusi provedeni na drugim biljnim vrstama (na bobu, *Vicia faba* L., i indijskom divljem grahu, *Vigna aconitifolia* L.) te je vrijeme izlaganja toplinskom stresu i vrijeme oporavka bilo drukčije nego u našim pokusima (Alamri i sur., 2019; Harsh i sur., 2016).

Spomenuli smo da povećana aktivnost enzima antioksidacijskog sustava upućuje na bolji odgovor biljaka na različite abiotičke i biotičke okolišne stresne čimbenike, pa tako i na toplinski

stres (Kapoor i sur., 2019). Istraživanja su pokazala da povećane koncentracije ROS-ova u stanicama i izlaganje biljaka toplinskom stresu dovode do porasta aktivnosti katalaze, što omogućuje bolju toleranciju stresa (Chalanika De Silva i Asaeda, 2017). Uočili smo značajno veću aktivnost enzima CAT u skupine *oeBPMI* (S) u odnosu na wt (S) (Slika 7), što znači da se u biljaka linije *oeBPMI* kao dio odgovora na toplinski stres bez prethodnog primarnog tretmana inducirala aktivnost CAT-a kako bi enzim razgradio višak nastalog H_2O_2 , koji je pokazatelj oksidacijskog stresa. Međutim u odnosu na kontrolu linije *oeBPMI*, razlika aktivnosti u skupine *oeBPMI* (S) nije značajna iako smo uočili trend njenog porasta. Biljke divljeg tipa nisu pokazale indukciju aktivnosti istog enzima. Ovaj parametar ukazuje na to da su biljke s povećanom razinom ekspresije gena *BPMI* bolje odgovorile na toplinski stres. Kod askorbat peroksidaze uočili smo značajno veću aktivnost enzima u obiju linija izloženih toplinskom stresu bez primarnog tretmana (Slika 8), što znači da su biljke linija *oeBPMI* i wt kao dio odgovora na toplinski stres bez prethodnog primarnog tretmana imale indukciju aktivnosti APX-a kako bi razgradile višak nastalog H_2O_2 , bez značajne razlike između linija. Kod biljaka koje su prije toplinskog stresa izložene primarnom tretmanu, linija *oeBPMI* imala je značajno veću aktivnost APX-a u odnosu na wt, što znači da su u okviru aktivnosti ovog enzima biljke linije s povećanom razinom ekspresije gena *BPMI* bolje odgovorile na toplinski stres od biljaka divljeg tipa. Značajno povećanje aktivnosti gvajakol peroksidaze uočili smo samo u biljaka linije *oeBPMI* koje su bile izložene toplinskom stresu bez prethodnog primarnog tretmana, dok u linije wt aktivnost ovog enzima nije bila značajno povećana (Slika 9). Dakle biljke linije *oeBPMI* kao dio odgovora na toplinski stres bez prethodnog primarnog tretmana imale su indukciju aktivnosti G-POD-a kako bi razgradile višak nastalog H_2O_2 . U okviru aktivnosti ovog enzima biljke linije s povećanom razinom ekspresije gena *BPMI* bolje su odgovorile na toplinski stres od biljaka divljeg tipa. Kod aktivnosti superoksid dismutaze uočili smo značajno povećanje aktivnosti enzima u biljaka linije *oeBPMI* koje su bile izložene toplinskom stresu bez prethodnog primarnog tretmana (Slika 10). U biljaka divljeg tipa nije bilo značajnog povećanja aktivnosti istog enzima, međutim uočili smo trend povećanja njegove aktivnosti u biljaka izloženih toplinskom stresu s prethodnim izlaganjem primarnom tretmanu i bez njega u odnosu na kontrolne biljke divljeg tipa. Dakle biljke obiju linija kao dio odgovora na toplinski stres imale su indukciju aktivnosti SOD-a, enzima koji predstavlja prvu liniju obrane biljke od ROS-ova i katalizira reakciju disproporcioniranja superoksidnog radikala na kisik i vodikov peroksid (Corpas i sur., 2017). U okviru aktivnosti SOD-a biljke divljeg tipa i biljke linije s povećanom razinom ekspresije gena

BPMI pokazale su odgovor na toplinski stres, i to potonje biljke nešto značajniji odgovor u odnosu na biljke divljeg tipa. Kod aktivnosti enzima APX, G-POD i SOD uočili smo značajno povećanu aktivnost samo u biljaka izloženih toplinskom stresu bez prethodnog primarnog tretmana, dok biljke koje su prethodno prošle primarni tretman nisu imale povećanu aktivnost istih enzima. Moguće je da su se u potonjih biljaka već tijekom i nakon primarnog tretmana razgradili nastali ROS-ovi, a dodatan toplinski stres nije uzrokovao njihovo dodatno stvaranje i/ili su nastale ROS-ove inducirani enzimi razgradili u biljkama prije uzorkovanja, tj. prije izrade ekstrakata za mjerenje i potom se aktivnost i količina enzima smanjila, stoga nismo uočili njihovu povećanu aktivnost, uz razlike između linija, kao što nismo uočili ni razlike u udjelu H₂O₂ između različitih skupina. Napominjemo da smo biljke uzorkovali 24 h nakon izlaganja toplinskom stresu od 42 °C, tako da je nepoznato kakva je aktivnost enzima bila u međuvremenu i, kako smo već spomenuli, možda su se antioksidacijski enzimi u biljaka prethodno izloženih primarnom tretmanu aktivirali ranije (tijekom i nakon izlaganja primarnom tretmanu), zaštitili biljke od oksidacijskog stresa te se do trenutka uzorkovanja njihova aktivnost vratila na razinu kao u kontrolnih biljaka. Sličan trend pokazali su i rezultati određivanja stupnja lipidne peroksidacije: u biljaka koje su prethodno izložene primarnom tretmanu on nije povišen, dok u biljaka izloženih samo toplinskom stresu od 42 °C on je povišen u odnosu na kontrolu, u obiju linija. Stoga bi svakako u nastavku istraživanja bilo zanimljivo odrediti aktivnost enzima antioksidacijskog sustava u više vremenskih točaka nakon tretmana (prije 24 h nakon tretmana). Zaključno, obrazac koji vrijedi za više enzima (askorbat peroksidazu, gvajakol peroksidazu i superoksid dismutazu) jest bolja indukcija njihove aktivnosti nakon izlaganja toplinskom stresu bez prethodnog primarnog tretmana, uz napomenu da je aktivnost enzima u periodu između izlaganja primarnom tretmanu i uzorkovanja nepoznata.

Poznato je da na akutni toplinski stres biljke odgovaraju povećanjem ekspresije proteina HSP. Toplinski stres uzrokuje razmatanje ili krivo smatanje mnogih proteina u stanici, a upravo proteini HSP djeluju kao molekularni šaperoni koji pomažu u smatanju tih proteina kako bi oni ponovno poprimili pravilnu strukturu i funkciju (Taiz i Zeiger, 2010). HSP70 ima temeljnu ulogu u pokretanju odgovora na toplinski šok (Lavania i sur., 2015). Uočili smo povećanu količinu proteina HSP70 u obiju linija i u oba tretmana u odnosu na kontrolne biljke (Slika 11). Dakle, izlaganje biljaka toplinskom stresu s prethodnim primarnim tretmanom i bez njega induciralo je ekspresiju ovog proteina u biljaka divljeg tipa i biljaka s povećanom razinom ekspresije gena

BPM1. Biljke obiju linija kao dio odgovora na toplinski stres imale su indukciju ekspresije proteina HSP70, koji je vrlo važan element u obrani biljaka od toplinskog stresa.

U uvjetima optimalnim za biljku većina se apsorbirane svjetlosne energije koristi za fotosintezu u biljnim organima u kojima se taj proces provodi. Manji dio energije gubi se u obliku topline i fluorescencije. Kad su biljke izložene određenom stresnom čimbeniku, povećava se udio energije koji se gubi u obliku topline i fluorescencije. S obzirom na to da stres u biljaka može utjecati na sve korake u prijenosu svjetlosne energije i elektrona do njihovih akceptora, mjerenje fluorescencije klorofila *a* može pružiti informacije o učinku stresa na učinkovitost prijenosa energije u reakcijskom centru fotosustava II (Lichtenthaler i Rinderle, 1988). Parametri koje smo odredili pomoću metode OJIP opisuju glavna funkcionalna svojstva PSII i na temelju njih mogu se donijeti zaključci o fotosintetskoj učinkovitosti biljke izložene određenom tretmanu. Poznato je da toplinski stres inhibira sustav za fotosintezu i da je fotosinteza jedan od biljnih procesa koji su najosjetljiviji i među prvima inhibirani uslijed toplinskog stresa, a PSII je primarni cilj njegova negativnog djelovanja (Mathur i sur., 2014). Kod određenih parametara dobivenih metodom OJIP (indeksa fotosintetske učinkovitosti, maksimalnog kvantnog prinosa PSII, gustoće aktivnih reakcijskih centara te apsorpcije svjetlosti i rasipanja energije po aktivnom reakcijskom centru PSII) uočili smo drastičnije razlike između kontrolnih biljaka i biljaka izloženih toplinskom stresu u odnosu na razlike koje smo opazili kod dosad opisanih parametara, tj. kad bismo razlike između kontrolnih i tretiranih biljaka izrazili u postocima, razlike kod navedenih parametara koje smo mjerili u metodi OJIP bile bi puno veće od razlika dobivenih kod svih ostalih parametara koje smo u ovom istraživanju mjerili. Jedno od objašnjenja za uočeni učinak jest to što povišena temperatura značajno utječe na fluidnost membrana, čime se narušava i integritet proteina membranskih sustava, dolazi do oštećenja PSII i zaustavljanja lanca prijenosa elektrona na tilakoidnim membranama (Yamamoto, 2016), a što smo opazili kao velike razlike kod određenih parametara OJIP-a u biljaka izloženih toplinskom stresu u odnosu na kontrolu. Indeks fotosintetske učinkovitosti (PI_{abs}) značajno je manji u obiju linija izloženih stresu bez primarnog tretmana, dok je uz prethodni primarni tretman PI_{abs} nešto veći, ali i dalje značajno manji nego u kontrole (Slika 12). Dakle primarni tretman nije bio dovoljno učinkovit u pripremanju biljaka za toplinski stres u okviru ovog parametra u linija *wt* i *oeBPM1*. Maksimalni kvantni prinos fotosustava II (F_v/F_m) značajno je smanjen u obiju linija izloženih toplinskom stresu bez prethodnog primarnog tretmana, a primarni tretman nije spriječio značajno smanjenje kvantnog prinosa u odnosu na

kontrolne biljke, međutim smanjenje je puno manje drastično nego u biljaka izloženih samo toplinskom stresu (Slika 13). Primarni tretman nije bio dovoljno učinkovit u pripremanju biljaka za toplinski stres u okviru ovog parametra u linija wt i *oeBPMI*. Gustoća aktivnih reakcijskih centara (RC/CS_0) značajno je smanjena u obiju linija izloženih toplinskom stresu bez prethodnog primarnog tretmana (Slika 14). Primarni tretman nije spriječio značajno smanjenje gustoće aktivnih reakcijskih centara u linije wt, međutim smanjenje je puno manje drastično nego u biljaka izloženih samo toplinskom stresu. U linije *oeBPMI* RC/CS_0 nije značajno smanjen kod biljaka izloženih stresu s prethodnim primarnim tretmanom u odnosu na kontrolu iako je i ovdje vidljiv trend smanjenja. Primarni tretman nije bio dovoljno učinkovit u pripremanju biljaka divljeg tipa za toplinski stres u okviru ovog parametra, ali je u istome bio u određenoj mjeri učinkovit u biljaka s povećanom razinom ekspresije gena *BPMI*. Apsorpcija svjetlosti po aktivnom reakcijskom centru PSII (ABS/RC) značajno je povećana u linije wt izložene toplinskom stresu bez prethodnog primarnog tretmana, dok u linije *oeBPMI* povećanje nije značajno iako je vidljiv trend povećanja (Tablica 2). Napominjemo da smo u skupine *oeBPMI* (S) uočili i vrlo veliku standardnu pogrešku; iako su biljke u trenutku mjerenja parametara metode OJIP izgledale dobro, tj. nisu pokazivale znakove venuća, vjerojatno su se u njihovim stanicama odvijali neki procesi potaknuti toplinskim stresom zbog kojih smo dobili takve rezultate. U biljaka prije toplinskog stresa izloženih primarnom tretmanu nismo uočili značajno povećanje ABS/RC u odnosu na kontrolu. Dakle primarni tretman bio je učinkovit u pripremanju biljaka obiju linija za toplinski stres u okviru ovog parametra. Protok uhvaćenih fotona po aktivnom reakcijskom centru (TR_0/RC) nije se značajno promijenio u obiju linija biljaka izloženih toplinskom stresu s prethodnim primarnim tretmanom ili bez njega u odnosu na kontrolu, dok je skupina *oeBPMI* (P) imala značajno veći TR_0/RC od skupine wt (P) (Tablica 2). Toplinski stres nije utjecao na promjenu protoka uhvaćenih fotona u odnosu na kontrolu iako je linija *oeBPMI* izložena toplinskom stresu s prethodnim primarnim tretmanom imala značajno veći TR_0/RC od linije wt izložene istom tretmanu, dakle linija *oeBPMI* prvotno izložena umjerenom toplinskom stresu bolje je odgovorila na toplinski stres u okviru ovog parametra. Prijenos elektrona po aktivnom reakcijskom centru (ET_0/RC) također se nije značajno promijenio u obiju linija biljaka izloženih toplinskom stresu s prethodnim primarnim tretmanom ili bez njega u odnosu na kontrolu, dok je skupina *oeBPMI* (P) imala značajno veći ET_0/RC od skupine wt (P) (Tablica 2). Toplinski stres nije utjecao na promjenu prijenosa elektrona u odnosu na kontrolu iako je linija *oeBPMI* izložena toplinskom stresu s prethodnim primarnim tretmanom

imala značajno veći ET_0/RC od linije wt izložene istom tretmanu, dakle linija *oeBPMI* prvotno izložena umjerenom toplinskom stresu bolje je odgovorila na toplinski stres u okviru ovog parametra. Wahid i sur. (2007) komentirali su da proteini HSP male molekularne mase (proteini smHSP) možda imaju strukturne uloge u održavanju integriteta membrana: proteini smHSP ulaze u sastav membrana kloroplasta te je moguće da štite PSII od štetnih učinaka toplinskog stresa i imaju ulogu u prijenosu elektrona. Rasipanje energije po aktivnom reakcijskom centru (DI_0/RC) predstavlja gubitak energije za fotosintezu jer se dio energije koji bi se mogao iskoristiti u fotosintezi gubi u obliku topline. Parametar DI_0/RC bio je značajno povećan u linije wt izložene stresu bez prethodnog primarnog tretmana, dok u linije *oeBPMI* povećanje nije značajno iako smo uočili trend povećanja u odnosu na kontrolu (Tablica 2). Napominjemo da smo u skupine *oeBPMI* (S) uočili i vrlo veliku standardnu pogrešku kod ovog parametra, slično kao i kod parametra ABS/RC . U biljaka koje su prije toplinskog stresa bile izložene primarnom tretmanu nismo uočili značajno povećanje DI_0/RC , dakle primarni tretman bio je učinkovit u pripremanju biljaka obiju linija za toplinski stres. Skupina *oeBPMI* (P) imala je značajno veći DI_0/RC od skupine wt (P), dakle linija wt prvotno izložena umjerenom toplinskom stresu bolje je odgovorila na toplinski stres u okviru ovog parametra, tj. imala je manje rasipanje energije od linije *oeBPMI*. Sumarno, u okviru parametara određenih metodom OJIP, koji govore o učinkovitosti sustava za fotosintezu biljaka, može se zaključiti da je toplinski stres značajno narušio fotosintetsku učinkovitost, dok je primarni tretman bio samo djelomično uspješan u pripremanju biljaka za toleranciju toplinskog stresa, a između linija wt i *oeBPMI* nije uvijek bila vidljiva razlika u odgovoru na tretman.

Neki od parametara koje smo određivali u okviru ovog rada pokazali su da je primarni tretman (izlaganje umjerenom toplinskom stresu) bio učinkovit u pripremanju biljaka za toleranciju jačeg toplinskog stresa. Svojim rezultatima pokazali smo da primarni tretman biljke *A. thaliana*, odnosno izlaganje biljke umjereno povećanoj temperaturi ili umjerenom stresu, zaista može pomoći biljkama u toleranciji jačeg toplinskog stresa, ali i drugih oblika stresa jer primjerice, kako smo ranije spomenuli, indukcija aktivnosti enzima antioksidacijskog sustava omogućuje bolji odgovor biljaka na različite abiotičke i biotičke okolišne stresne čimbenike. Slični su rezultati u prijašnjim istraživanjima dobiveni i za neke druge biljne vrste, npr. za običnu pšenicu, *Triticum aestivum* (Fan i sur., 2018). Uočili smo da postoje razlike u parametrima koje smo određivali u okviru važnosti primarnog tretmana u pripremanju biljaka za toleranciju toplinskog stresa,

primjerice primarni tretman bio je manje uspješan u pripremanju biljaka za odgovor na toplinski stres s obzirom na održavanje fotosintetske učinkovitosti, dok je bio važan kod preživljavanja biljaka, povećane biosinteze proteina, aktivnosti enzima antioksidacijskog sustava (askorbat peroksidaze, gvajakol peroksidaze i superoksid dismutaze), lipidne peroksidacije i indukcije sinteze prolina, uz razlike između linija. Također smo uočili razlike između biljaka divljeg tipa i biljaka s povećanom razinom ekspresije gena *BPM1*. Općenito smo primijetili da linija *oeBPM1* ima bolji odgovor na toplinski stres od biljaka divljeg tipa (primjerice kod aktivnosti enzima antioksidacijskog sustava i lipidne peroksidacije), dok kod parametara fotosintetske učinkovitosti nismo uočili znatno bolji odgovor. Takav različit odgovor linije *oeBPM1* može upućivati na to da protein BPM1 na neki način sudjeluje u staničnom putu različitih proteinskih i drugih faktora uključenih u biljne procese čije smo parametre istraživali i kod kojih smo uočili razlike u odnosu na biljke divljeg tipa.

Naši su rezultati ukazali na zanimljiva i potencijalno važna saznanja, ali je još više detalja koje tek treba istražiti. U biljaka s povećanom količinom proteina BPM1 na temelju dosadašnjih spoznaja ne možemo donijeti konačne zaključke o ulozi proteina BPM1 u regulaciji ekspresije, aktivnosti i/ili degradacije primjerice opisanih enzima antioksidacijskog sustava ili proteina uključenih u signalne puteve ostalih opisanih parametara. Međutim, upravo razlike u određenim parametrima u odnosu na biljke divljeg tipa upućuju na to da postoji neka veza između složenog staničnog puta u kojem sudjeluje BPM1 i procesa istraživanih parametara. Uz već poznatu interakciju s transkripcijskim faktorom DREB2A, koji je uključen u aktivaciju velikog broja gena koji sudjeluju u odgovoru na stres (Morimoto i sur., 2017), te s transkripcijskim faktorima iz nekih drugih obitelji, preostaje istražiti i druge moguće interakcije u kojima sudjeluje BPM1, metaboličke procese koje regulira i druge proteine u biljaka kojima posredno ili neposredno mijenja aktivnost. Istraživanje dosad nepoznatih interakcija proteina BPM1 s drugim proteinima moglo bi utvrditi da je BPM1 doista uključen u regulaciju staničnog puta određenih proteina, a što bi moglo objasniti i promjene nekih parametara koje smo uočili u biljaka s povećanom količinom proteina BPM1. Kako stupaju u interakciju s određenim transkripcijskim faktorima i na različite načine mijenjaju njihovu aktivnost (najčešće sudjeluju u obilježavanju ovih proteina za proteasomalnu degradaciju), uključeni su u regulaciju ekspresije velikog broja gena, moguće i posredno i neposredno. Upravo bi utjecaj na regulaciju ekspresije velikog broja gena mogao biti jedno od objašnjenja zašto promjena ekspresije gena *BPM1* utječe na promjenu mnogih, nekih naizgled nepovezanih procesa

u biljci. Zanimljivo bi bilo istražiti i kako promjena ekspresije drugih gena iz skupine *BPM* (*BPM 2 – 6*), i povećanje i smanjenje njihove ekspresije, kao i smanjenje ekspresije gena *BPM1*, utječu na promjenu istih i drugih procesa u biljci, s obzirom na to da su dosadašnja istraživanja pokazala različite fenotipe mutanata *A. thaliana* za različite proteine iz skupine *BPM* (Škiljaica i sur., 2020), upućujući na njihove različite uloge u biljci. Potrebno je istražiti je li ekspresija i aktivnost proteina *BPM* specifična za tkiva ili biljne organe, kako je regulirana njihova ekspresija i aktivnost i potiču li određeni čimbenici iz okoliša ekspresiju proteina *BPM* te na taj način nadopuniti dosadašnja saznanja. Uz učinak toplinskog stresa, koji smo istraživali, i nekih drugih istraživanih stresnih čimbenika, svakako bi bilo zanimljivo vidjeti kako promijenjena ekspresija gena *BPM* utječe na odgovor biljke na ostale tipove okolišnih stresnih čimbenika.

U konačnici, naši su rezultati pokazali da povećana razina ekspresije gena *BPM1* u biljci *A. thaliana* ima utjecaj na bolji odgovor biljke na toplinski stres te da primarni tretman (izlaganje umjerenom toplinskom stresu) može biti koristan u pripremanju biljke za toleranciju jačeg toplinskog stresa, kao i drugih oblika stresa. Uvidjeli smo da protein *BPM1* potencijalno ima određenu ulogu u regulaciji proteina uključenih u odgovor biljke na stres. Time smo uputili na nova saznanja o proteinu *BPM1* i otvorili brojna pitanja čije će odgovore trebati pokušati pronaći buduća istraživanja, koja će zasigurno dovesti do zanimljivih i važnih spoznaja u regulaciji staničnih puteva i odgovora na stresne čimbenike u biljnom svijetu. Nesumnjivo će se dugi niz godina provoditi brojna istraživanja koja će rasvijetliti složenu mrežu biljnih procesa u kojima sudjeluju proteini *BPM*.

6. ZAKLJUČCI

U ovom radu istraživali smo utjecaj primarnog tretmana i toplinskog stresa na biljku *Arabidopsis thaliana*. Htjeli smo utvrditi i razliku u odgovoru na primarni tretman i toplinski stres između biljaka divljeg tipa (wt) i biljaka s povećanom razinom ekspresije gena *BPM1* (*oeBPM1*). S tim ciljem određivali smo parametre oksidacijskog stresa, aktivnost antioksidacijskih enzima, ekspresiju proteina HSP70 i učinkovitost fotosinteze. Na temelju provedenog istraživanja zaključujemo sljedeće:

- Biljke koje su prošle primarni tretman (umjereni toplinski stres) bile su bolje pripremljene na jači toplinski stres i dugoročno preživljavanje posljedica stresa.
- S obzirom na stupanj lipidne peroksidacije primarni tretman u obiju linija bio je učinkovit u pripremi biljaka za odgovor na jači toplinski stres. Sinteza prolina bila je inducirana uz primarni tretman u biljaka divljeg tipa.
- Obrazac koji smo uočili za aktivnost više enzima (askorbat peroksidazu, gvajakol peroksidazu i superoksid dismutazu) pokazuje bolju indukciju njihove aktivnosti nakon izlaganja toplinskom stresu bez prethodnog primarnog tretmana.
- U okviru parametara određenih metodom OJIP, koji govore o učinkovitosti fotosinteze, može se zaključiti da je toplinski stres značajno narušio fotosintetsku učinkovitost, dok je primarni tretman bio samo djelomično uspješan u pripremanju biljaka za toleranciju toplinskog stresa.
- Biljke obiju linija kao dio odgovora na toplinski stres imale su indukciju ekspresije proteina HSP70.
- Primarni tretman biljke *A. thaliana* može pomoći u toleranciji jačeg toplinskog stresa. Općenito smo primijetili da linija *oeBPM1* ima bolji odgovor na toplinski stres od biljaka divljeg tipa (primjerice kod aktivnosti enzima antioksidacijskog sustava i lipidne peroksidacije), dok kod parametara fotosintetske učinkovitosti nismo uočili znatno bolji odgovor.
- Stupanj lipidne peroksidacije i aktivnost antioksidacijskih enzima katalaze i askorbat peroksidaze ukazuju da linija *oeBPM1* ima bolji odgovor na toplinski stres od biljaka divljeg tipa, što može upućivati na moguće uloge proteina BPM1.

7. ZAHVALE

Zahvaljujemo svojoj mentorici, izv. prof. dr. sc. Željki Vidaković-Cifrek, na pomoći i savjetima prilikom izvođenja eksperimentalnog dijela izrade rada te na svesrdnoj pomoći, podršci i savjetima prilikom pisanja ovog rada.

Zahvalni smo doktorandici Sandri Vitko, mag. biol. exp., na strpljivosti, pomoći i savjetima prilikom izvođenja eksperimentalnog dijela rada te na savjetima prilikom pisanja rada.

8. POPIS LITERATURE

- Aebi, H. (1984). Catalase in vitro. *Methods in Enzymology* **105**, 121-126.
- Alamri, S. A., Siddiqui, M. H., Al-Khaishany, M. Y., Khan, M. N., Ali, H. M. i Alakeel, K. A. (2019). Nitric oxide-mediated cross-talk of proline and heat shock proteins induce thermotolerance in *Vicia faba* L. *Environmental and Experimental Botany* **161**, 290-302.
- Alscher, R. G., Erturk, N. i Heath, L. S. (2002). Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *Journal of Experimental Botany* **53**(372), 1331-1341.
- Asada, K. (2006). Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. *Plant Physiology* **141**, 391-396.
- Bates, L. S., Waldren, R. P. i Teare, I. D. (1973). Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil* **39**(1), 205-207.
- Baxter, A., Mittler, R. i Suzuki, N. (2014). ROS as key players in plant stress signalling. *Journal of Experimental Botany* **65**, 1229-1240.
- Beauchamp, C. i Fridovich, I. (1971). Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry* **44**(1), 276-287.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**(1-2), 248-254.
- Buchanan, B., Gruissem, W. i Jones, R. (2015). *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. 2nd ed. John Wiley and Sons, str. 1094-1097.
- Catala, A. (2006). An overview of lipid peroxidation with emphasis in outer segments of photoreceptors and the chemiluminescence assay. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology* **38**, 1482-1495.
- Chalanika De Silva, H. C. i Asaeda, T. (2017). Effects of heat stress on growth, photosynthetic pigments, oxidative damage and competitive capacity of three submerged macrophytes. *Journal of Plant Interactions* **12**(1), 228-236.

- Chance, B. i Maehly, A. C. (1955). Assay of catalases and peroxidases. *Methods in Enzymology* **136**, 764-755.
- Chen, L. i Hellmann, H. (2013). Plant E3 ligases: flexible enzymes in a sessile world. *Molecular Plant* **6**(5), 1388-1404.
- Choi, C. M., Gray, W. M., Mooney, S. i Hellmann, H. (2014). Composition, roles, and regulation of cullin-based ubiquitin e3 ligases. *Arabidopsis Book* **12**, e0175.
- Choudhury, F., Rivero, R., Blumwald, E. i Mittler, R. (2017). Reactive oxygen species, abiotic stress and stress combination. *The Plant Journal* **90**(5), 856-867.
- Conrath, U., Beckers, G. J., Langenbach, C. J. i Jaskiewicz, M. R. (2015). Priming for enhanced defense. *Annual Review in Phytopathology* **53**, 97-119.
- Corpas, F. J., Barroso, J. B., Palma, J. M. i Rodriguez-Ruiz, M. (2017). Plant peroxisomes: a nitro-oxidative cocktail. *Redox Biology* **11**, 535-542.
- Demidchik, V. (2015). Mechanisms of oxidative stress in plants: from classical chemistry to cell biology. *Environmental and Experimental Botany* **109**, 212-228.
- Diaz, M. (2019). *Arabidopsis Thaliana*: from weed to model organism. *Current Protocols Essential Laboratory Techniques* **19**, e38.
- Fan, Y., Ma, C., Huang, Z., Abid, M., Jiang, S., Dai, T., Zhang, W., Ma, S., Jiang, D. i Han, X. (2018). Heat priming during early reproductive stages enhances thermo-tolerance to post-anthesis heat stress via improving photosynthesis and plant productivity in winter wheat (*Triticum aestivum* L.). *Frontiers in Plant Science* **9**, 805.
- Filippou, P., Tanou, G., Molassiotis, A. i Fotopoulos, V. (2013). Plant acclimation to environmental stress using priming agents. U: Tuteja, N. i Singh Gill, S. (ur.) *Plant Acclimation to Environmental Stress*. Springer, New York, str. 1-27.
- Genschik, P., Sumara, I. i Lechner, E. (2013). The emerging family of CULLIN3-RING ubiquitin ligases (CRL3s): cellular functions and disease implications. *The EMBO Journal* **32**, 2307-2320.

- Gulen, H. i Eris, A. (2004). Effect of heat stress on peroxidase activity and total protein content in strawberry plants. *Plant Science* **166**(3), 739-744.
- Harsh, A., Sharma, Y. K., Joshi, U., Rampuria, S., Singh, G., Kumar, S. i Sharma, R. (2016). Effect of short-term heat stress on total sugars, proline and some antioxidant enzymes in moth bean (*Vigna aconitifolia*). *Annals of Agricultural Sciences* **61**(1), 57-64.
- Hartl, F. U. (1996). Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature* **381**, 571-580.
- Hayat, S., Hayat, Q., Alyemeni, M. N., Wani, A. S., Pichtel, J. i Ahmad, A. (2012). Role of proline under changing environments: a review. *Plant Signaling and Behavior* **7**(11), 1456-1466.
- Jambunathan, N. (2010). Determination and detection of reactive oxygen species (ROS), lipid peroxidation, and electrolyte leakage in plants. U: Sunkar, R. (ur.) Plant Stress Tolerance. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols) **639**. Humana Press, str. 291-297.
- Jones, D. P. i Radi, R. (2014). Redox pioneer: professor Helmut Sies. *Antioxidants and Redox Signaling* **21**, 2459-2468.
- Kalaji, H. M., Schansker, G., Ladle, R. J., Goltsev, V., Bosa, K. i Allakhverdiev, S. I. (2014). Frequently asked questions about *in vivo* chlorophyll fluorescence: practical issues. *Photosynthesis Research* **122**, 121-158.
- Kapoor, D., Singh, S., Kumar, V., Romero, R., Prasad, R. i Singh, J. (2019). Antioxidant enzymes regulation in plants in reference to reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS). *Plant Gene* **19**, 100182.
- Krämer, U. (2015). Planting molecular functions in an ecological context with *Arabidopsis thaliana*. *eLife* **4**, e06100.
- Küpper, H., Benedikty, Z., Morina, F., Andresen, E., Mishra, A. i Trtílek, M. (2019). Analysis of OJIP chlorophyll fluorescence kinetics and QA reoxidation kinetics by direct fast imaging. *Plant Physiology* **179**(2), 369-381.
- Laemmli, U. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.

- Lavania, D., Dhingra, A., Siddiqui, M. H., Al-Wahaibi, M. H. i Grover, A. (2015). Current status of the production of high temperature tolerant transgenic crops for cultivation in warmer climates. *Plant Physiology and Biochemistry* **86**, 100-108.
- Lichtenthaler, H. K. i Rinderle, U. (1988). The role of chlorophyll fluorescence in the detection of stress conditions in plants. *CRC Critical Reviews in Analytical Chemistry* **19**(1), 29-85.
- Lima, R. B., dos Santos, T. B., Vieira, L. G., Ferrarese Mde, L., Ferrarese-Filho, O., Donatti, L., Boeger, M. R. i Petkowicz, C. L. (2013). Heat stress causes alterations in the cell-wall polymers and anatomy of coffee leaves (*Coffea arabica* L.). *Carbohydrate Polymers* **93**(1), 135-43.
- Ling, Y., Serrano, N., Gao, G., Atia, M., Mokhtar, M., Woo, Y. H.,... i Mahfouz, M. M. (2018). Thermopriming treatment triggers splicing memory in Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany* **69**(10), 2659-2675.
- Martinez-Medina, A., Flors, V., Heil, M., Mauch-Mani, B., Pieterse, C. M. i Pozo, M. J. (2016). Recognizing plant defense priming. *Trends in Plant Science* **21**(10), 818-822.
- Mathur, S., Agrawal, D. i Jajoo, A. (2014). Photosynthesis: response to high temperature stress. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **137**, 116-26.
- Mhamdi, A., Queval, G., Chaouch, S., Vanderauwera, S., Van Breusegem, F. i Noctor, G. (2010). Catalase function in plants: a focus on Arabidopsis mutants as stress-mimic models. *Journal of Experimental Botany* **61**(15), 4197-4220.
- Mittler, R. (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science* **7**, 405-410.
- Mittler, R., Finka, A. i Goloubinoff, P. (2012). How do plants feel the heat?. *Trends in Biochemical Sciences* **37**(3), 118-125.
- Morimoto, K., Ohama, N., Kidokoro, S., Mizoi, J., Takahashi, F., Todaka, D.,... i Yamaguchi-Shinozaki, K. (2017). BPM-CUL3 E3 ligase modulates thermotolerance by facilitating negative regulatory domain-mediated degradation of DREB2A in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **114**(40), 8528-8536.

- Mosa, K. A., Ismail, A. i Helmy, M. (2017). Introduction to plant stresses. U: Mosa, K. A., Ismail, A. i Helmy, M. (ur.) *Plant Stress Tolerance*. Springer, Cham, str. 1-19.
- Mueller, S. P., Krause, D. M., Mueller, M. J. i Fekete, A. (2015). Accumulation of extra-chloroplastic triacylglycerols in Arabidopsis seedlings during heat acclimation. *Journal of Experimental Botany* **66**(15), 4517-4526.
- Murashige, T. i Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* **15**, 473-479.
- Nakano, Y. i Asada, K. (1981). Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant and Cell Physiology* **22**(5), 867-880.
- Pandey, S., Fartyal, D., Agarwal, A., Shukla, T., James, D., Kaul, T.,... i Reddy, M. K. (2017). Abiotic stress tolerance in plants: myriad roles of ascorbate peroxidase. *Frontiers in Plant Science* **8**, 581.
- Pang, P. i Meyerowitz, E. (1987). *Arabidopsis Thaliana*: a model system for plant molecular biology. *Nature Biotechnology* **5**, 1177-1181.
- Papageorgiou, G. C. (2004). Fluorescence of photosynthetic pigments *in vitro* and *in vivo*. U: Papageorgiou, G. C. i Govindjee (ur.) *Chlorophyll a Fluorescence*. Advances in Photosynthesis and Respiration **19**. Springer, Dordrecht, str. 43-63.
- Ramirez-Carrasco, G., Martinez-Aguilar, K. i Alvarez-Venegas, R. (2017). Transgenerational defense priming for crop protection against plant pathogens: a hypothesis. *Frontiers in Plant Science* **8**, 696.
- Ray, D., Ghosh, A., Mustafi, S. B. i Raha, S. (2016). Plant stress response: Hsp70 in the spotlight. U: Asea, A., Kaur, P. i Calderwood, S. (ur.) *Heat Shock Proteins and Plants*. Heat Shock Proteins **10**. Springer, Cham, str. 123-147.
- Ruelland, E. i Zachowski, A. (2010). How plants sense temperature. *Environmental and experimental botany* **69**(3), 225-232.
- Seifert, G. J. i Roberts, K. (2007). The biology of arabinogalactan proteins. *Annual Review of Plant Biology* **58**, 137-61.

- Sergiev, I., Alexieva, V. i Karanov, E. (1997). Effect of spermine, atrazine and combination between them on some endogenous protective systems and stress markers in plants. *Comptes rendus de l'Academie bulgare des Sciences* **51**(3), 121-124.
- Sharma, P., Jha, A. B., Dubey, R. S. i Pessarakli, M. (2012). Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *Journal of Botany* **2012**, 217037.
- Smirnoff, N. (2014). Plant stress physiology. U: (ur.) eLS. John Wiley & Sons, Ltd.
- Staples, R. C. i Stahmann, M. A. (1964). Changes in proteins and several enzymes in susceptible bean leaves after infection by the bean rust fungus. *Phytopathology* **54**(760), 537-564.
- Strasser, R. J., Tsimilli-Michael, M. i Srivastava, A. (2004). Analysis of the chlorophyll *a* fluorescence transient. U: Papageorgiou, G. C. i Govindjee (ur.) Chlorophyll *a* Fluorescence. *Advances in Photosynthesis and Respiration* **19**. Springer, Dordrecht, str. 321-362.
- Su, P. H. i Li, H. M. (2008). Arabidopsis stromal 70-kD heat shock proteins are essential for plant development and important for thermotolerance of germinating seeds. *Plant Physiology* **146**(3), 1231-1241.
- Sunkar, R., Bartels, D. i Kirch, H. H. (2003). Overexpression of a stress-inducible aldehyde dehydrogenase gene from *Arabidopsis thaliana* in transgenic plants improves stress tolerance. *The Plant Journal* **35**(4), 452-464.
- Suzuki, N. i Mittler, R. (2006). Reactive oxygen species and temperature stresses: a delicate balance between signaling and destruction. *Physiologia Plantarum* **126**, 45-51.
- Škiljaica, A., Lechner, E., Jagić, M., Majsec, K., Malenica, N., Genschik, P. i Bauer, N. (2020). The protein turnover of Arabidopsis BPM1 is involved in regulation of flowering time and abiotic stress response. *Plant Molecular Biology* **102**(4-5), 359-372.
- Taiz, L. i Zeiger, E. (2010). Plant Physiology. 5th ed. Sinauer Associates Inc. Publishers, Massachusetts, str. 602-605.

- Tsimilli-Michael, M. (2020). Revisiting JIP-test: an educative review on concepts, assumptions, approximations, definitions and terminology. *Photosynthetica* **58**, 275-292.
- Uarrota, V. G., Moresco, R., Schmidt, E. C., Bouzon, Z. L., da Costa Nunes, E., de Oliveira Neubert, E., Peruch, L. A. M., Rocha, M. i Maraschin, M. (2016). The role of ascorbate peroxidase, guaiacol peroxidase, and polysaccharides in cassava (*Manihot esculenta* Crantz) roots under postharvest physiological deterioration. *Food Chemistry* **197**, 737-746.
- Wahid, A., Gelani, S., Ashraf, M. i Foolad, M. R. (2007). Heat tolerance in plants: an overview. *Environmental and Experimental Botany* **61**(3), 199-223.
- Weber, H. i Hellmann, H. (2009). *Arabidopsis thaliana* BTB/POZ-MATH proteins interact with members of the ERF/AP2 transcription factor family. *The FEBS Journal* **276**(22), 6624-6635.
- Yamamoto, Y. (2016). Quality control of photosystem II: the mechanisms for avoidance and tolerance of light and heat stresses are closely linked to membrane fluidity of the thylakoids. *Frontiers in Plant Science* **7**, 1136.

9. SAŽETAK

Matea Đaković i Marin Kutnjak

Umjereno povećana temperatura modificira fiziološki odgovor na toplinski stres u uročnjaka (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.) s povećanom ekspresijom gena *BPM1*

Biljke su svakodnevno izložene stresnim uvjetima koji utječu na njihove fiziološke procese. Povećana temperatura dovodi do toplinskog stresa i uzrokuje niz promjena u biljnim stanicama. Izlaganjem primarnom tretmanu, odnosno primjenom blagog stresa prije izlaganja jačem stresu, moguće je poboljšati otpornost na buduće stresne uvjete. Cilj našeg rada bio je utvrditi učinak primarnog tretmana primijenjenog prije toplinskog stresa na oksidacijski stres i antioksidacijski odgovor, ekspresiju proteina HSP70 te učinkovitost fotosinteze. Istraživanje je provedeno na klijancima biljaka *Arabidopsis thaliana* divljeg tipa (wt) i linije koja ima povećanu razinu ekspresije gena *BPM1* (*oeBPM1*). Jednu skupinu biljaka izložili smo temperaturi od 42 °C u trajanju od šest sati, drugu skupinu istom toplinskom stresu od 42 °C nakon primarnog tretmana temperaturom od 37 °C, dok je treća, kontrolna skupina biljaka rasla na 24 °C. Nakon 24-satnog oporavka klijance smo koristili za analizu ranije navedenih parametara. Primjena primarnog tretmana dovela je do boljeg dugoročnog preživljavanja posljedica toplinskog stresa. Biljke podvrgnute primarnom tretmanu pokazale su značajno povećanje biosinteze proteina i sinteze prolina te smanjeni stupanj lipidne peroksidacije u odnosu na biljke izložene samo temperaturi od 42 °C. Izlaganje samo toplinskom stresu dovelo je do indukcije aktivnosti enzima antioksidacijskog sustava: askorbat peroksidaze, gvajakol peroksidaze i superoksid dismutaze. Također, u obiju linija zabilježeno je povećanje ekspresije proteina HSP70. Mjerenjem fluorescencije klorofila *a* uočili smo da je toplinski stres značajno narušio fotosintetsku učinkovitost, a primarni tretman bio je samo djelomično učinkovit u poboljšanju tolerancije stresa. Stupanj lipidne peroksidacije i aktivnost antioksidacijskih enzima katalaze i askorbat peroksidaze ukazuju da linija *oeBPM1* ima bolji odgovor na toplinski stres od biljaka divljeg tipa, što može upućivati na moguće uloge proteina *BPM1*. Rezultati ovog rada pokazali su da povećana razina ekspresije gena *BPM1* u biljci *A. thaliana* i primarni tretman imaju utjecaj na odgovor na toplinski stres, čime se otvaraju brojna pitanja za buduća istraživanja uloge ekspresije gena *BPM1*, kao i za mogućnosti potencijalne primjene primarnog tretmana.

Ključne riječi: *Arabidopsis thaliana*, toplinski stres, primarni tretman, ekspresija gena *BPM1*

10. SUMMARY

Matea Đaković and Marin Kutnjak

Moderately increased temperature modifies heat stress response in *BPM1*-overexpressing thale cress (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.)

Plants' exposure to stress factors affects their physiological processes daily. Increased temperature leads to heat stress in plants and causes several changes in cells. Resistance to future stress can be improved by applying mild heat stress before severe stress, which is called priming. Our study aimed to determine the effect of priming on oxidative stress and antioxidative response, expression of HSP70 and photosynthetic efficiency. The research was conducted on wild type (wt) *Arabidopsis thaliana* seedlings and *BPM1*-overexpressing line (*oeBPM1*). The first group was exposed to 42 °C for 6 hours, the second one was exposed to priming at 37 °C before 42 °C, and the third was the control group, which grew at 24 °C. After a 24-hour recovery, seedlings were used for analyses of the parameters mentioned above. Priming led to better long-term survival from the effects of heat stress. Also, plants that were primed showed a significant increase in protein and proline content, as well as a decrease in lipid peroxidation when compared to plants exposed to 42 °C. Heat stress increased the activity of antioxidative enzymes ascorbate peroxidase, guaiacol peroxidase and superoxide dismutase. In addition, an increased expression of HSP70 was observed in both plant lines. Based on the chlorophyll *a* fluorescence measurement, it was obvious that heat stress impaired photosynthetic efficiency and priming was only partially effective in improving heat stress tolerance. According to level of lipid peroxidation, catalase and ascorbate peroxidase activity, the *oeBPM1* line had a better response to heat stress than wt, which suggests a possible role of *BPM1* in heat stress response. The results of this study showed that overexpression of the *BPM1* gene in *A. thaliana*, as well as priming, impacts heat stress response. Therefore, this study raises questions for future research into the role of the *BPM1* gene and opens opportunities for the potential application of priming in plants.

Key words: *Arabidopsis thaliana*, heat stress, priming, *BPM1* gene expression

ŽIVOTOPISI

Matea Đaković

Završila sam Osnovnu školu Augusta Šenoje i XI. gimnaziju u Zagrebu. Tijekom obrazovanja u osnovnoj i srednjoj školi sudjelovala sam na brojnim školskim, županijskim i međužupanijskim natjecanjima. Preddiplomski sveučilišni studij Molekularne biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu (PMF-u) Sveučilišta u Zagrebu upisala sam 2016. godine i završila 2019. godine, nakon čega sam upisala diplomski sveučilišni studij Molekularne biologije. Diplomski rad izrađujem u Zavodu za molekularnu biologiju PMF-a u Zagrebu. Tijekom studija dvaput sam sudjelovala na manifestaciji Noć biologije (2018. i 2021.) te jednom na Simpoziju studenata bioloških usmjerenja u Zagrebu (2021.) i simpoziju studenata biologije u Banjoj Luci (2020.). Trenutno sam i sudionica projekta PROMISE programa Erasmus+, na kojem stječem vještine i znanja vezana uz P4 medicinu. U slobodno vrijeme volontiram u Zakladi Dijete svjetla, koja pomaže siromašnoj djeci u afričkoj državi Benin, a posebice djevojčicama bez roditeljske skrbi. Od hobija bih istaknula pjevanje (aktivna sam članica dvaju pjevačkih zborova, među kojima je i zbor Cantus Naturae na PMF-u), grafički dizajn i fotografiranje te uređivanje fotografija. Aktivno se služim engleskim jezikom, a poznajem i koristim njemački jezik.

Marin Kutnjak

Završio sam Osnovnu školu Vladimir Nazor Virovitica kao najučenic generacije te Katoličku klasičnu gimnaziju s pravom javnosti u Virovitici kao najučenic generacije i najučenic županije. Tijekom obrazovanja u osnovnoj i srednjoj školi sudjelovao sam na brojnim školskim, županijskim, međužupanijskim i državnim natjecanjima. Od najznačajnijih uspjeha istaknuo bih dva prva mjesta na državnom Natjecanju iz hrvatskog jezika (2013. i 2015. godine), za koja mi je od Agencije za odgoj i obrazovanje bila uručena nagrada Oskar znanja. Preddiplomski sveučilišni studij Molekularne biologije na PMF-u u Zagrebu upisao sam 2016. godine i završio ga s velikom pohvalom 2019. godine, nakon čega sam upisao diplomski sveučilišni studij Molekularne biologije. Diplomski rad izrađujem u Laboratoriju za molekularnu ekotoksikologiju Instituta Ruđer Bošković. Dobitnik sam STEM stipendije Ministarstva znanosti i obrazovanja ak. god. 2017./2018. i 2018./2019. te stipendije Sveučilišta u Zagrebu za izvrsnost ak. god. 2020./2021. Tijekom studija dvaput sam sudjelovao na manifestaciji Noć biologije (2018. i 2021.), Simpoziju studenata bioloških usmjerenja u Zagrebu (2019. i 2021.) te simpozijima studenata biologije u Sarajevu i Banjoj Luci (2019. i 2020.). 2019. završio sam šestodnevnu školu molekularne biologije u Istraživačkoj stanici Petnica. Član sam studentske udruge BIUS. Od hobija bih istaknuo gledanje filmova i serija, čitanje i pisanje. Aktivno govorim engleski i njemački jezik.