

**Sveučilište u Zagrebu**  
**Prirodoslovno – matematički fakultet**  
**Biološki odsjek**

INES KRALJ I PETRA NIŽIĆ

**Molekularna osnova tolerancije na teške metale u**  
**vrste *Nicotiana glauca* Graham**

*Zagreb, 2012.*

Ovaj rad izrađen je u Zavodu za molekularnu biologiju Biološkog odsjeka Prirodoslovno – matematičkog fakulteta pod vodstvom Prof. dr. sc. Mirjane Pavlica te neposrednim vodstvom mag. mol. biol. Kristine Majsec i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2011. / 2012.

## Popis i objašnjenje kratica

- A – apsorbancija
- Akt – aktin
- As – arsen
- AtNRAMP1-6 – *A. thaliana* engl. *natural resistance associated macrophage protein 1-6*
- Ca – kalcij
- $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$  – kalcijev klorid dihidrat
- Cd – kadmij
- $\text{CdCl}_2$  – kadmij(II) klorid
- cDNA – komplementarna deoksiribonukleinska kiselina
- Co – kobalt
- $\text{CoCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$  – kobalt(II) klorid heksahidrat
- Cr – krom
- $C_T$  – engl. *threshold cycle*
- Cu – bakar
- $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$  – bakar(II) sulfat pentahidrat
- DEPC – dietil-pirokarbonat
- $\text{dH}_2\text{O}$  – destilirana voda
- DNA – deoksiribonukleinska kiselina
- dNTP – deoksiribonukleozid-trifosfat
- DTT – ditionitrol
- EDTA – etilendiamintetraoctena kiselina
- Fe – željezo
- $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  – željezo(II) sulfat heptahidrat
- $\text{H}_3\text{BO}_3$  – boratna kiselina
- HCl – klorovodična kiselina
- Hg – živa
- ICP-OES – optička emisijska spektrometrija uz induktivno spregnutu plazmu
- K – kalij
- $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – kalij dihidrofosfat
- KI – kalij jodid
- $\text{KNO}_3$  – kalij nitrat
- MES – 2-N-morfolino-etansulfonska kiselina
- $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$  – magnezij sulfat heptahidrat
- Mn – mangan

- $\text{MnSO}_4 \times 4 \text{H}_2\text{O}$  – mangan sulfat tetrahidrat
- Mo – molibden
- mRNA – glasnička RNA
- MS – Murashige i Skoog
- NA – nikotianamin
- $\text{Na}_2\text{EDTA}$  – natrij etilendiamintetraoctena kiselina
- $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$  – natrij molibdat dihidrat
- NAS – nikotianamin sintaza
- Ng – *Nicotiana glauca*
- $\text{NH}_4\text{NO}_3$  – amonij nitrat
- Ni – nikal
- NRAMP – engl. *natural resistance associated macrophage protein*
- Nt – *Nicotiana tabacum*
- NTC – engl. *non template control*
- oligo-dT – oligo-deoksitimidin
- Pb – olovo
- PCR – engl. *polymerase chain reaction*, lančana reakcija polimerazom
- Početnica F – engl. *Forward* početnica
- Početnica R – engl. *Reverse* početnica
- poli-A – poli-deoksiadenin
- PSI - fotosistem I
- PSII - fotosistem II
- RNA – ribonukleinska kiselina
- ROS – engl. *reactive oxygen species*, reaktivne kisikove vrste
- Sb – antimon
- Se – selenij
- TAE – Tris-acetat-EDTA pufer
- Tl – talij
- UV – ultraljubičasto
- Zn – cink
- $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$  – cink sulfat heptahidrat

## Sadržaj rada

1. Uvod .....	1
1.1. Teški metali .....	1
1.1.1. Kadmij.....	2
1.1.2. Željezo.....	3
1.2. Fitoremedijacija i hiperakumulatori.....	4
1.3. Geni uključeni u mehanizme tolerancije i/ili hiperakumulacije teških metala .....	6
2. Cilj istraživanja.....	9
3. Materijali i metode .....	10
3.1. Materijali .....	10
3.2. Metode.....	11
3.2.1. Rad u kulturi biljnog tkiva .....	11
3.2.2. Priprema uzoraka korijena i izdanaka klijanaca za analizu sadržaja metala.....	14
3.2.3. Mjerenje fluorescencije lista metodom saturacijskog pulsa.....	14
3.2.4. Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu ( <i>Real-time</i> PCR) .....	16
4. Rezultati .....	23
4.1. Određivanje klijavosti, dužine korijena i izdanka te biomase klijanaca starosti 28 dana .....	23
4.2. Određivanje sadržaja metala u izdanku i korijenu klijanaca starosti 28 dana .....	26
4.3. Određivanje parametara fotosinteze biljaka .....	27
4.5. Optimiziranje uvjeta lančane reakcije polimerazom za provjeru uspješnosti reverzne transkripcije .....	30
4.6. Određivanje specifičnosti i efikasnosti reakcija <i>real-time</i> PCR .....	32
4.7. Određivanje promjene ekspresije gena <i>NAS</i> i <i>NRAMP-1</i> kao odgovora na tretman teškim metalima Fe i Cd metodom <i>real-time</i> PCR.....	35
4.8. Određivanje razlike u konstitutivnoj ekspresiji gena <i>NAS</i> i <i>NRAMP-1</i> između vrsta <i>N. tabacum</i> i <i>N. glauca</i> .....	37
5. Rasprava.....	38
5.1. Učinak Fe i Cd na vrste <i>N. glauca</i> i <i>N. tabacum</i> .....	38
5.2. Procjena tolerancije na Fe i Cd vrsta <i>N. glauca</i> i <i>N. tabacum</i> .....	38
5.3. Uloga gena <i>NAS</i> i <i>NRAMP-1</i> u mehanizmima tolerancije i akumulacije Fe i Cd kod vrste <i>N. glauca</i> .....	40
6. Zaključci .....	42

7. Zahvala.....	43
8. Popis literature.....	44
9. Sažetak.....	47
10. Summary.....	48

# 1. Uvod

## 1.1. Teški metali

Teški metali su s kemijskog stajališta prijelazni metali s atomskom masom iznad 20 i specifičnom težinom iznad 5. U biologiji se pojam "težak" odnosi na niz metala i metaloida koji mogu biti toksični, kako za biljke tako i životinje, čak i pri vrlo niskim koncentracijama pa se stoga u ovome radu pojam "teški metali" koristi za te potencijalno fitotoksične elemente. Neki od teških metala, kao što su As, Cd, Hg, Pb ili Se nisu esencijalni jer ne obavljaju nikakvu poznatu fiziološku funkciju u biljkama, dok su drugi, poput Co, Cu, Fe, Mn, Mo, Ni i Zn, bitni elementi neophodni za normalan rast i metabolizam biljaka (Rascio i Navari-Izzo, 2011.). Metali kao što su željezo (Fe), mangan (Mn) i bakar (Cu) su potrebni kao kofaktori za mnoge enzimske reakcije, dok primjerice cink (Zn) ima važnu strukturnu ulogu u proteinima, a drugi metalni kationi su uključeni i u signalizaciju.

Navedeni elementi lako mogu dovesti do trovanja kada je njihova koncentracija iznad optimalnih vrijednosti. Fitotoksičnost teških metala može biti rezultat promjena u brojnim fiziološkim procesima uzrokovanim na staničnoj i molekularnoj razini, kao što su inaktivacija enzima, blokiranje funkcionalnih skupina metabolički važnih molekula, potiskivanje ili zamjena esencijalnih elemenata i narušavanje integriteta stanične membrane. Zajednička posljedica učinka teških metala je povećana proizvodnja reaktivnih kisikovih vrsta (engl. ROS - *reactive oxygen species*) uslijed ometanja transporta elektrona, što je posebno izraženo u membrani kloroplasta (Rascio i Navari-Izzo, 2011.). To povećanje količine ROS-a izlaže stanice oksidativnom stresu i oštećenjima koja dovode do povećane peroksidacije lipida, oksidacije proteina i reducensa u stanici, narušavanja membrane, curenja iona i cijepanja lanaca DNA (Rascio i Navari-Izzo, 2011.).

S obzirom da su teški metali neophodni za osnovne stanične procese, ali toksični u većim koncentracijama, potrebna je precizna kontrola nad njihovom unutarstaničnom koncentracijom – ovaj proces regulacije naziva se homeostaza. Za razliku od organskih zagađivača, metali se u organizmu ne mogu razgraditi pa biljke pribjegavaju nizu obrambenih mehanizama kako bi imale što bolji nadzor nad unosom, nakupljanjem i transportom tih opasnih elemenata te detoksikacijom isključivanjem slobodnih iona metala iz citoplazme (Martinez, 2006.). Biljke hiperakumulatori su razvile toleranciju na ione teških metala kroz različite dodatne detoksikacijske mehanizme koji mogu uključivati selektivan unos, vezanje u

komplekse s posebnim ligandima i odjeljivanje kompleksa metal-ligand (Rascio i Navari-Izzo, 2011.), a postoje dokazi o modifikaciji homeostaze metala kao što su Cu, Mn i posebice Fe (Verbruggen i sur. 2009.).

### **1.1.1. Kadmij**

Kadmij (Cd) je neesencijalni teški metal i jedan od glavnih zagađivača okoliša kojemu se u zadnje vrijeme pridaje velika važnost zbog njegove toksičnosti za životinje i ljude. Prisutnost kadmija u biljkama, a osobito njegov prijenos u jestive dijelove biljke predstavlja njegov glavni put ulaska u hranidbeni lanac (Cailliatte i sur., 2009.) jer se u biljkama mogu nakupiti koncentracije Cd koje nisu toksične za njih, ali su otrovne za organizme koji se tim biljkama hrane. Cd je široko rasprostranjen u okolišu zbog onečišćenja iz elektrana, industrije obrade metala i spaljivanja otpada (Suzuki i sur. 2001.). Čovjek unosi Cd u okoliš preko industrijskog otpada iz procesa kao što su proizvodnja plastike, rudarenje, galvaniziranje, priprema legura, upotreba pigmentata boja i baterija koje sadrže kadmij, ali i iz kućanskih aparata, automobila, poljoprivrednih strojeva, avionskih dijelova, industrijskih alata, ručnih alata, vijaka i čavala koji su obično obloženi kadmijem. Koristi se i za luminiscentne bročcanike, u fotografiji, zatim kao fungicid, a poznato je i da duhan nakuplja Cd što dovodi do izloženosti ljudi ovom teškom metalu putem pušenja (Kirkham, 2006.).

Cd se u životinjskim organizmima kontinuirano nakuplja, osobito u bubrezima, jetri i reproduktivnim organima, a već pri vrlo niskim koncentracijama uzrokuje toksičnost za stanice živog organizma (Kirkham, 2006.). Klasificiran je kao ljudski karcinogen koji utječe na mnoge stanične procese, uključujući stanični ciklus, staničnu proliferaciju i popravak DNA (Cailliatte i sur. 2009). Toksičnost Cd osobito utječe na ljude u odnosu na životinje jer zbog dugog životnog vijeka dolazi do veće akumulacije Cd uslijed unosa hrane koja je onečišćena Cd.

U biljaka je toksičnost Cd dobro dokumentirana u obliku vidljivih simptoma poput kloroze, zaostajanja u rastu, promjene boje vrška korijena i u konačnici smrti biljke. Cd djeluje negativno na rast korijena i proizvodnju biomase zbog inhibicije fotosinteze, disanja i unosa minerala u biljku, kao i remećenja vodnog statusa biljke (Yoshiharai sur., 2006.). Cd oštećuje fotosisteme I i II koji su ključni u fotosintezi, ukupni sadržaj klorofila se smanjuje, a raste nefotokemijsko prigušivanje te se smanjuje asimilacija ugljika. Također, Cd najvjerojatnije ometa kretanje iona  $K^+$  i  $Ca^{2+}$  te apscizinske kiseline u stanice zapornice puči čime se inhibira njihovo otvaranje, zatim mijenja sintezu RNA, inhibira aktivnost



ribonukleaza, smanjuje aktivnost katalaze i povećava aktivnost peroksidaze te dovodi biljku u stanje oksidativnog stresa. Može istisnuti  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  i  $\text{Fe}^{2+}$  iz enzima što rezultira njihovom inaktivacijom i oslobađanjem tih iona. Također je poznato da Cd omogućuje nastanak aktivnih hidroksilnih radikala uključenih u Fentonovu reakciju i oslobađanje  $\text{Fe}^{2+}$  (Suzuki i sur., 2001.). Zbog svega toga, vrlo je vjerojatno da Cd ometa mehanizme transkripcije i prijenosa signala u stanici, ali i da stres izazvan njegovom povećanom koncentracijom uzrokuje aktivaciju gena vezanih uz prijenos signala, odgovor na oksidativni stres i denaturaciju proteina.

### 1.1.2. Željezo

Željezo (Fe) je jedan od najvažnijih mikronutrijenata koje koriste živi organizmi, ali ujedno za njih predstavlja i problem. To je neophodan mikronutrijent i jedan od najsvestranijih metala u biologiji. Važnost Fe proizlazi iz njegove uloge kao neizostavnog kofaktora za brojne stanične redoks reakcije uključene u fotosintezu, disanje te mnoge druge reakcije (Conte i Walker, 2011.). Sastavni je dio mnogih enzima koji kataliziraju redoks reakcije ili su uključeni u prijenos elektrona. Njegove funkcije se uglavnom temelje na reverzibilnim redoks reakcijama  $\text{Fe}^{2+}$  i  $\text{Fe}^{3+}$  iona, njegovoj sposobnost da tvori oktaedarske komplekse s različitim ligandima i da varira svoj redoks potencijal kao odgovor na različite ligande (Hell i Stephan, 2003.). Nedostatak Fe dovodi do karakterističnog klorotičnog fenotipa koji se obično počinje razvijati na najmlađim listovima. Biološki značaj Fe je velik te je dovoljna opskrba Fe neophodna za sve žive organizme kako bi održali staničnu homeostazu (Hell i Stephan, 2003.).

S druge strane, netopljivost i toksičnost slobodnih iona Fe predstavljaju i dva glavna izazova za biljke. Ako je prisutno u razinama višim od uobičajenih, uslijed djelovanja slobodnih radikala nastalih putem Fentonove reakcije, Fe može uzrokovati oštećenja stanica (Hell i Stephan, 2003.). Ista fizikalna svojstva koja omogućuju Fe da djeluje kao učinkovit kofaktor i katalizator u kontroliranim redoks reakcijama također mu omogućuju da djeluje kao moćan toksin kada se nađe u kontaktu s osjetljivim biomolekulama. Fe je također samo umjereno topljivo u vodenim otopinama, a osobito slabo u okolišu bogatom s kisikom te s pH vrijednostima iznad 7, gdje se topljivost Fe smanjuje na razine nekoliko redova veličine manje od onih potrebnih za optimalan rast biljaka (Hell i Stephan, 2003.).

Kao odgovor na ova ključna svojstva Fe, biljke su razvile raznolike homeostatske mehanizme kojima reguliraju unos Fe iz okoliša i transport Fe između organela, stanica, tkiva i organa. Transporterski proteini imaju istaknutu ulogu kao posrednici homeostatske kontrole

Fe (Conte i Walker, 2011.). Takvi transporteri postoje za ulazak Fe u korijen, unos u ksilem te za unos u stanice lista, ali i unutar stanica korijena i lista, primjerice na membranama vakuola i plastida. Unutar stanice se nastajanje vrlo otrovnih hidroksilnih radikala izbjegava zamršenim mehanizmima heliranja. Organske kiseline, od kojih je najpoznatiji nikotianamin, i specijalizirani proteini vežu Fe prije nego se ono može umetnuti u ciljne molekule (Maestri i sur., 2010.).

Važnost i osjetljivost homeostaze Fe u biljkama primjećuje se i kod fenomena nedostatka Fe potaknutog Cd (Hodoshima i sur., 2007.). Naime, Cd zbog kompeticije sa Fe za transportere kojima se vrši unosi i prijenos kroz biljku, onemogućava transport Fe iz korijena u izdanak (Yoshihara i sur., 2006.) što dovodi do simptoma nedostatka Fe u nadzemnim dijelovima biljke, usprkos dostupnosti Fe u okolišu. Kloroza uzrokovana nedostatkom Fe je dobro poznata posljedica izlaganja biljke Cd (Hodoshima i sur., 2007.). Zbog toga je u ovom radu istražen učinak Fe i Cd na vrste *Nicotiana tabacum* i *Nicotiana glauca*, kako pojedinačnih tretmana, tako i kombinacije oba metala zajedno.

## **1.2. Fitoremedijacija i hiperakumulatori**

Od sredine 18. stoljeća, odnosno početka industrijske revolucije pa do današnjeg dana zagađenje biosfere toksičnim teškim metalima ubrzano raste. Ono je dramatično pojačano u prošlom stoljeću uslijed razvoja raznih djelatnosti kao što su rudarstvo i taljenje, ali i zbog nezbrinjavanja otpada i onečišćenja poljoprivrednih površina. Zagađenje teškim metalima stoga sve više predstavlja velike ekološke i zdravstvene probleme za sva živa bića. Za razliku od organskih onečišćivača, teški metali su perzistentni onečišćivači okoliša koji se ne mogu kemijski ili biološki uništiti. Dosad korištene metode njihova uklanjanja kao što su toplinski tretmani, iskapanja, enkapsulacije, pokrivanje kontaminiranih mjesta sa čistim tlom pa čak i njihovo recikliranje, često nisu učinkovite, već su i destruktivne te vrlo skupe (Barazani i sur., 2004.).

Iz navedenih razloga tijekom zadnja tri desetljeća javilo se posebno zanimanje za fitoremedijaciju, odnosno upotrebu biljnih vrsta zanimljivih osobina kao jeftinog i efikasnog načina uklanjanja teških metala iz onečišćenog tla. Biljke koje prirodno žive na ovakvim tlima razvile su mehanizme tolerancije na teške metale koji im omogućavaju smanjeni ulazak teških metala u biljku te njihovo zadržavanje i detoksikaciju u korijenu uz minimalni prijenos u listove gdje bi izazvali oštećenja (Rascio i Navari-Izzo, 2011.). Iako su ove osobine ključne za

preživljavanje, rast i razmnožavanje tolerantnih biljaka u neprikladnim uvjetima staništa zagađenih teškim metalima, s aspekta fitoremedijacije nisu idealne jer metali ostaju u korijenskom sustavu što otežava njihovo uklanjanje.

Međutim, obećavajući pristup rješavanju problema zagađenja teškim metalima korištenjem biljaka moguć je zbog fenomena hiperakumulacije metala u biljnim vrstama koje uz toleranciju imaju dodatnu sposobnost nakupljanja teških metala iz tla u biljna tkiva (Verbruggen i sur., 2009.). Takve biljne vrste nazivajmo hiperakumulatori. Hiperakumulatori za razliku od biljaka tolerantnih na teške metale aktivno uzimaju velike količine jednog ili više različitih teških metala, prenose ih u biljne organe iznad zemlje (primjerice u listove) gdje ih pohranjuju u 100-1000 puta većoj koncentraciji nego nehiperakumulirajuće vrste, i to bez ikakvih simptoma toksičnosti (Rascio i Navari-Izzo, 2011.). Tri glavne karakteristike hiperakumulatora koje ih razlikuju od uobičajenih biljnih vrsta su: pojačana stopa unosa teških metala u biljku, njihov brži i uspješniji prijenos iz korijena u izdanak i izrazito veća sposobnost njihove detoksifikacije i odvajanja u listovima (Rascio i Navari-Izzo, 2011.). Prednost ovih osobina je u tome što se, za razliku od korijena, izdanci bogati metalima lako mogu ubrati i zbrinuti, a postoji i mogućnost ekstrakcije metala i njihove ponovne upotrebe (Verbruggen i sur., 2009.).

Da bi neka biljka bila svrstana u hiperakumulatore, mora biti sposobna akumulirati određenu količinu teškog metala: više od 10 mg Mn ili Zn po gramu suhe tvari biljke (1% njezine mase), više od 1 mg As, Co, Cr, Cu, Ni, Pb, Sb, Se ili Tl po gramu suhe tvari biljke (0,1% njezine mase) ili više od 0,1 mg Cd po gramu suhe tvari biljke (0,01% suhe mase) u izdanku bez simptoma fitotoksičnosti (Rascio i Navari-Izzo, 2011.). Do sada je poznato oko 450 hiperakumulatorskih vrsta - što je manje od 0,2% svih poznatih biljnih vrsta - a od toga je većina hiperakumulatora Ni (75%) (Verbruggen i sur., 2009.).

Vrste *Thlaspi careulescens* i *Arabidopsis halleri* su modelne biljke na kojima se istražuju mehanizmi hiperakumulacije na fiziološkoj i molekularnoj razini. Ipak, neka svojstva hiperakumulatorskih biljnih vrsta ograničavaju njihovu upotrebu u fitoremedijaciji: mnoge specifično akumuliraju samo jednu vrstu metala, prilagođene su na točno određene uvijete okoliša što ih geografski ograničava, ne mogu se uzgajati kao konvencionalni usjevi, sporo rastu, korijenski sustav im ne prodire duboko u zemlju, imaju malu biomasu i često vrlo kratak životni ciklus, a za neke metale nisu nađene hiperakumulirajuće vrste. Iz tog razloga se sve više javlja ideja o korištenju nehiperakumulatorskih tolerantnih vrsta koje pokazuju mnoge dobre osobine za fitoremedijaciju i kojima bi se genetičkim inženjerstvom uvele

dodatne osobine (geni) da ih upotpune sa sposobnošću hiperakumulacije (Verbruggen i sur., 2009.).

Idealna biljka fitoremedijator bi trebala imati sljedeće osobine: brz rast, veliku biomasu, toleranciju i akumulaciju visokih koncentracija teških metala te sadržavati spojeve koji odbijaju biljojede kako bi se spriječio ulazak teških metala u hranidbeni lanac. Vrsta *N. glauca* istakla se svojim brojnim osobinama pogodnima za fitoremedijaciju. To je grmovita biljka koja je tolerantna na metale, prilagođena je na široki spektar okolišnih uvjeta pa je geografski široko rasprostranjena, otporna je na sušu, brzo raste, ima veliku biomasu i mali zahtjev za hranidbenim tvarima. Ta vrsta odbija herbivore, lako se vegetativno razmnožava, ima snažan korijenski sustav koji upija metale, pogodna je za uzgoj u monokulturi i jednostavno se uklanja iz tla (Gisbert i sur., 2003.). Zbog svih navedenih prednosti *N. glauca* ima veliki potencijal kao fitoremedijator te je stoga procjena njezine tolerancije na teške metale i genska osnova koja joj to omogućuje glavni predmet istraživanja ovog rada.

### **1.3. Geni uključeni u mehanizme tolerancije i/ili hiperakumulacije teških metala**

Od velike je važnosti istraživanje molekularne osnove tolerancije i hiperakumulacije teških metala u svrhu ostvarenja biotehnološkog poboljšanja hiperakumulatorskih svojstava biljaka koje imaju osobine pogodne za fitoremedijaciju. Mehanizam tolerancije i hiperakumulacije teških metala zasniva se na različitoj regulaciji i ekspresiji gena koji normalno postoje u genomima svih biljnih vrsta što potvrđuju analize usporedbe ekspresije gena između hiperakumulatorskih i nehiperakumulatorskih vrsta. Tako je analiza transkriptoma biljnih vrsta *T. caerulea* i *A. halleri* koje hiperakumuliraju cink i kadmij pokazala konstitutivno pojačanu ekspresiju brojnih gena uključenih u unos i homeostazu metala u odnosu na njima srodne nehiperakumulatorske vrste *T. arvensis* i *A. thaliana* (Maestri i sur., 2010.).

U okviru ovog rada napravljena je analiza razlike u ekspresiji gena potencijalno važnih za mehanizam tolerancije na teške metale između tolerantne biljne vrste dobrog fitoremedijacijskog potencijala - vrste *N. glauca* i njoj srodne netolerantne vrste *N. tabacum*. Neki od gena važnih za mehanizam tolerancije i/ili hiperakumulacije kodiraju za transportere uključene u unos metala preko stanične membrane u biljne stanice, ulazak metala u simplastni prostor prilikom prijenosa iz korijena u izdanak te odjeljivanje metala u specifične organele, na primjer vakuole u stanicama listova. Također, u održavanju homeostaze metala, ali i za toleranciju na njihove veće količine bitna je mogućnost biljaka da heliraju metale, što znači

vezanje metala za proteine i/ili male organske spojeve kako bi se spriječili njihovi negativni učinci u stanici (Maestri i sur., 2010.).

Budući da su dosadašnja istraživanja dala naznake da bi razina ekspresije gena iz porodice (obitelji) *NRAMP* mogla igrati važnu ulogu u mehanizmu tolerancije na teške metale, u ovom radu istražena je ekspresija gena *NRAMP-1* vrsta *N. tabacum* i *N. glauca* kao odgovor na tretman teškim metalima Fe i Cd. Geni *NRAMP* (engl. *natural resistance associated macrophage protein*) koji kodiraju za integralne membranske proteine nađeni su u bakterija, algi, biljaka i životinja te su evolucijski dobro očuvani (Cailliatte i sur., 2009.). Prvi gen iz porodice *NRAMP* pronađen je kod sisavaca gdje kodira za transporter metala u stanicama makrofaga pomoću kojeg se postiže određeni sadržaj iona u fagosomima bitan za ubijanje patogena. Pomoću heterologne ekspresije transportera *NRAMP* u oocitama vrste *Xenopus laevis* pokazano je da ovi transporteri prenose aktivnim transportom širok niz metalnih iona, uključujući  $Fe^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$  i  $Pb^{2+}$ . Članovi porodice *NRAMP* pronađeni su i u brojnim biljnim vrstama, te je pomoću komplementacijskih testova na mutantima kvasca deficitarnim za prijenos metala, za njih također potvrđeno da imaju funkciju transportera metala (Cailliatte i sur., 2009.). Kod vrste *A. thaliana* postoji šest transportera metala *AtNRAMP1–6*, no dosad je opisana fiziološka uloga samo dijela njih. Tako je pokazano da su geni *AtNRAMP3* i *AtNRAMP4* pojačano eksprimirani uslijed uvjeta manjka željeza (Curie i sur., 2000.) i da kodiraju za transportere smještene u membrani vakuola te su stoga bitni za prijenos iona  $Fe^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  i  $Mn^{2+}$  između vakuole i citosola stanice (Thomine i sur., 2000.).

Gen *AtNRAMP-1* kodira za transporter metala čija fiziološka uloga nije još u potpunosti razjašnjena. Dosadašnja saznanja o navedenom genu daju nagovještaj da bi njegova povećana ekspresija mogla biti uključena u mehanizam tolerancije na Fe i Cd. Naime, pokazano je da ekspresija *AtNRAMP-1* komplementira defekt rasta u mutantu DEY1453 vrste *Saccharomyces cerevisiae* deficitarnom za unos Fe (Curie i sur., 2000.) i također dovodi do povećanog unosa Cd u takve stanice (Thomine i sur., 2000.). Iz navedenog se može pretpostaviti da Cd za ulazak u stanice koristi transporter čija je prirodna uloga prijenos Fe. Također je na klijancima vrste *A. thaliana* starim 24 dana utvrđeno da je ekspresija *NRAMP-1* pojačana u uvjetima nedostatka Fe (Curie i sur., 2000.) što bi moglo navesti na zaključak o ulozi ovog transportera u unosu Fe u stanice i njegovoj lokalizaciji na staničnoj membrani. Isto tako, moguće je da u uvjetima manjka Fe dolazi do pojačane ekspresije nekog drugog membranskog transportera za Fe, a povećava se i ekspresija gena *NRAMP-1* kako naglo uneseno Fe ne bi uzrokovalo oštećenja u stanici. Naime, pokazano je da transgenična biljka *A. thaliana*

s pojačanom ekspresijom gena *NRAMP-1* pokazuje veću toleranciju na povišene, inače toksične, koncentracije Fe (Curie i sur., 2000.) što bi govorilo u prilog lokalizacije ovog transportera u nekoj unutarstaničnoj membrani, primjerice membrani vakuole ili plastida, gdje bi njegova uloga bila u prijenosu viška iona teških metala u spomenute organele čime se sprječavaju njihovi negativni učinci.

U istraživanjima mehanizama tolerancije i hiperakumulacije teških metala proučavani su, osim gena koji kodiraju za transportere metala, i geni koji kodiraju proteine za sintezu malih organskih molekula poput gena *NAS* (nikotianamin sintaza). Nikotianamin (NA) je aminokiselina koja se ne ugrađuje u proteine pri translaciji, već služi kao helator metala te kao takva ima ključnu ulogu u homeostazi metala u biljci. Pokazano je kako NA veže metale u komplekse, u kojima se Fe, Cu i Zn mogu prenijeti na veće udaljenosti u biljci, te se Fe tako prenosi iz žila u listove (Maestri i sur., 2010.). Analizom transkriptoma utvrđeno je da hiperakumulator Zn i Cd *A. halleri* ima konstitutivno višu ekspresiju gena *NAS* u korijenu u odnosu na nehiperakumulatora *A. thaliana* (Weber i sur., 2004.). Također, transgenična biljka *N. tabacum* s ugrađenim dodatnim kopijama gena *NAS* iz *A. thaliana* ima 10 puta veće količine NA u odnosu na divlji tip. Povišena količina NA dovodi do: značajno povišene količine Fe u listovima odrasle biljke, akumulacije Zn i Mn te povećane tolerancije na 1 mM Ni (Douchkov i sur., 2005.). Iz navedenih istraživanja jasno je da gen *NAS* ima važnu ulogu u mehanizmu tolerancije i hiperakumulacije Fe i Cd.

## 2. Cilj istraživanja

Predmet ovog rada bio je procjena tolerancije vrste *N. glauca* na teške metale željezo i kadmij te istraživanje molekularne osnove koja joj to omogućuje. Cilj je bio utvrditi u kojoj mjeri ova vrsta može suzbiti stres uzrokovan akumulacijom teških metala na fiziološkoj i genskoj razini. Pokazatelji tolerancije i ekspresija gena bitnih u mehanizmima tolerancije i akumulacije teških metala na konstitutivnoj te inducibilnoj razini kao odgovor na Fe i Cd uspoređeni su u odnosu na srodnu vrstu *N. tabacum*. Iz literature je poznato da *N. glauca* ima pogodne osobine za fitoremedijaciju (Gisbert i sur., 2003.), a poboljšanje njezine sposobnosti tolerancije i akumulacije teških metala sa ciljem dobivanja transgenične biljke ove vrste pružilo bi rješenje problema zagađenja okoliša teškim metalima. Rezultati ovog rada doprinijeli bi novim saznanjima koja bi to omogućila.

### **3. Materijali i metode**

#### **3.1. Materijali**

##### **Kemikalije:**

agaroza (Sigma), dietil-pirokarbonat (DEPC, Sigma), etanol (Kemika), izopropanol (Kemika), kadmij(II) klorid (Sigma), kloroform (Lach-Ner), 2-N-morfolino-etansulfonska kiselina (MES, Roth), m-inozitol (Sigma), natrijev hipoklorit (T.T.T.), Phytigel (Sigma), RNaseZAP reagens (Invitrogen), saharoza (Sigma), tekući dušik, tiamin-HCl (Kemika), TRIzol (Invitrogen).

##### **Boje i enzimi:**

bromfenol plavilo (Serva), ksilencijanol FF (Serva), etidijev bromid (Sigma), *GeneRuler 100 bp DNA Ladder Plus* (Fermentas), Superscript III (Invitrogen), *DreamTaq* DNA polimeraza (Fermentas), *AmpliTaqGold* DNA polimeraza LD (Applied Biosystems).

##### **Biljni materijal:**

Sjemenke biljne vrste *Nicotiana glauca* Graham dobivene su iz Ekološko-botaničkog vrta Sveučilišta u Bayreuthu, Njemačka, a sjemenke vrste *Nicotiana tabacum* sorta Virginia iz Duhanskog instituta Zagreb.



## 3.2. Metode

### 3.2.1. Rad u kulturi biljnog tkiva

Kako ne bi došlo do kontaminacije kulture biljnog tkiva bakterijama, kvascima, gljivicama i virusima prilikom rada, potrebno je raditi u sterilnim uvjetima. Zbog navedenog razloga nasađivanje sjemenki i presađivanje biljaka na hranidbene podloge izvođeno je u laminaru, komori s horizontalnim strujanjem sterilnog zraka. Metalni pribor za rad steriliziran je spaljivanjem na plamenu. Otvori boca i tikvica su pri svakom otvaranju i zatvaranju spaljeni u plamenu. Korišteno stakleno posuđe i hranjive podloge autoklavirane su pri temperaturi od 121 °C i tlaku  $10^5$  Pa u vremenu od 90 min. Također, manipulirali smo biljnim materijalom što pažljivije da sami ne budemo izvorom kontaminacije.

Uzgoj i tretmani klijanaca vrsta *N. glauca* i *N. tabacum*

Klijanci vrsta *N. glauca* i *N. tabacum* uzgojeni su u uvjetima *in vitro* naklijavanjem sjemenki na krutim hranjivim podlogama MS (Murashige i Skoog, 1962), uz dodatak 500 mg/L MES soli, 1,5% saharoze i 2,2 g/L fitagela, pH vrijednost medija 5,6. Hranjiva podloga MS prethodno je pripravljena i autoklavirana, a njezin sastav prikazan je u Tablici 1. Sjemenke su prije nasađivanja na hranjive podloge sterilizirane površinskom sterilizacijom kako ne bi došlo do kontaminacije biljnih kultura patogenima s površine sjemenki. Sjemenke su se miješale na vrtložnoj miješalici minutu u 1 mL 70% etanola, a zatim 15 minuta u smjesi natrijeva hipoklorita i sterilne destilirane vode u omjeru 1:1. U laminaru su sjemenke isprane tri puta sa sterilnom vodom, a zatim nasađene na krute hranjive podloge MS uz dodatak otopina teških metala u konačnim koncentracijama prema Tablici 2. Nasađeno je 20-30 sjemenki po Petrijevoj zdjelici i to u triplikatu za kontrolu i svaki tretman. Kao izvor željeza korištena je otopina željezo(II) sulfata heptahidrata,  $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  (početne  $c = 20$  mM) uz dodatak  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  ( $c = 20$  mM), a kao izvor kadmija otopina kadmij(II) klorida,  $\text{CdCl}_2$  ( $c = 100$  mM). Nakon nasađivanja, sjemenke su inkubirane u klima komori na temperaturi od  $24 \pm 2$  °C pod umjetnom rasvjetom fluorescentnih svjetiljki ( $90 \mu\text{Es}^{-1}\text{m}^{-2}$ ) 28 dana. Nakon toga za kontrolu i svaki tretman određeni su klijavost, masa, dužina korijena i dužina izdanka klijanaca. Eksperiment je ponovljen tri puta te su dobiveni podaci statistički obrađeni u programu Statistica 10 (StatsSoft, USA) pomoću Factorial Anova analize uz Duncanov test sa  $p$  vrijednošću 0,05.

Tablica 1. Sastav hranjive podloge MS. Proizvođač navedenih sastavnica je Kemika, ukoliko nije drugačije navedeno.

<b>MAKROELEMENTI</b>	$\gamma$ (mg/L)	c (mM)
KNO <sub>3</sub>	1900	18,8
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650	20,60
CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	440	2,99
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170	1,25
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	370	1,50
<b>MIKROELEMENTI</b>	$\gamma$ (mg/L)	c ( $\mu$ M)
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,2	100,0
CoCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	0,025	0,1
KI	0,83	5,0
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	0,25	1,0
CuSO <sub>4</sub> x 5 H <sub>2</sub> O	0,025	0,1
MnSO <sub>4</sub> x 4 H <sub>2</sub> O	22,3	100,0
ZnSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	8,6	29,9
<b>ŽELJEZO</b>	$\gamma$ (mg/L)	c ( $\mu$ M)
FeSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	27,8	100,0
Na <sub>2</sub> EDTA	37,3	100,0
<b>ORGANSKI DODACI</b>	$\gamma$ (mg/L)	c ( $\mu$ M)
m-inozitol (Sigma)	50,0	277,5
tiamin-HCl	0,05	0,15
saharoza (Sigma)	1500,0	11,3
MES-kalijeva sol (Roth)	500,0	3,77

Tablica 2. Koncentracije teških metala u podlogama MS.

	<i>K</i>	<i>T1</i>	<i>T2</i>	<i>T3</i>	<i>T4</i>	<i>T5</i>	<i>T6</i>	<i>T7</i>	<i>T8</i>	<i>T9</i>	<i>T10</i>	<i>T11</i>	<i>T12</i>	<i>T13</i>
c (Fe) / $\mu\text{M}$	100	200	300	400	500	100	100	100	100	100	200	200	300	300
c (Cd) / $\mu\text{M}$	0	0	0	0	0	2,5	5	10	15	20	5	15	5	15

Kratice: K - kontrola, T- tretman

Uzgoj i tretmani odraslih biljaka vrsta *N. glauca* i *N. tabacum*

Odrasle biljke obje vrste uzgojene su nasađivanjem sjemenki u Erlenmeyerove tikvice na krute hranjive podloge MS sastava prema Tablici 1., bez dodatka otopina teških metala. U svaku tikvicu stavljeno je 0,11 g fitagela koji služi kao učvršćivač podloge, dodano je po 50 mL tekuće podloge MS te je stavljen vateni čep i aluminijska folija na grlo tikvica. Podloge su sterilizirane autoklaviranjem pri gore navedenim uvjetima. U svaku tikvicu stavljene su 1-3 sjemenke koje su zatim inkubirane u klima komori na temperaturi od  $24 \pm 2$  °C pod umjetnom rasvjetom fluorescentnih svjetiljki ( $90 \mu\text{Es}^{-1}\text{m}^{-2}$ ) u razdoblju od deset tjedana. Obje vrste biljaka starosti deset tjedana presađene su na tekuće hranjive podloge MS bez fitagela uz dodatak otopina teških metala prema Tablici 3.

Tablica 3. Koncentracije teških metala u tekućim podlogama MS za tretmane biljaka starosti deset tjedana.

	<i>kontrola</i>	<i>F</i>	<i>C</i>	<i>FC</i>
c (Fe) / $\mu\text{M}$	100	300	100	300
c (Cd) / $\mu\text{M}$	0	0	15	15

Kratice: F – tretman željezom, C – tretman kadmijem, FC – tretman željezom i kadmijem

Koncentracije teških metala željeza i kadmija navedene u Tablici 3. odabrane su na temelju preliminarnih ispitivanja učinka niza koncentracija ovih teških metala (Tablica 2.) na klijance vrsta *N. tabacum* i *N. glauca*. Biljke su nakon presađivanja vraćene u klima komoru na

temperaturu od  $24 \pm 2$  °C pod umjetnu rasvjetu fluorescentnih svjetiljki ( $90 \mu\text{Es}^{-1}\text{m}^{-2}$ ) te je biljni materijal za eksperimente uziman određenog dana od početka tretmana u razdoblju do 7 dana. Biljke su uzgajane i tretirane u razdoblju tijekom osam mjeseci u više navrata kako bi se priskrbilo dovoljno biljnog materijala za eksperimente.

### **3.2.2. Priprema uzoraka korijena i izdanaka klijanaca za analizu sadržaja metala**

Klijanci vrsta *N. tabacum* i *N. glauca* uzgajani su u svrhu analize sadržaja metala na krutim podlogama MS s dodatkom teških metala u istim koncentracijama kao onima korištenim za tretmane biljaka starosti deset tjedana (Tablica 3.). Nakon nasadivanja, sjemenke su inkubirane u klima komori na temperaturi od  $24 \pm 2$  °C pod umjetnom rasvjetom fluorescentnih svjetiljki ( $90 \mu\text{Es}^{-1}\text{m}^{-2}$ ) 28 dana. Nakon tog vremena, klijancima su odvojeni korijeni od izdanaka te je pažljivo uklonjen hranjivi medij s biljnog materijala. U jedan uzorak su spojeni svi klijanci iz tri replike istog tretmana. Uzorci su smrznuti u tekućem dušiku i čuvani u zamrzivaču na  $-80^\circ\text{C}$  do njihove pripreme za analizu sadržaja metala. Tada su uzorci prenijeti u staklene Petrijeve zdjelice prethodno dobro oprane u destiliranoj vodi, kako ne bi došlo do kontaminacije uzoraka metalima koji ne potječu iz biljnog materijala. Uzorci su ostavljeni preko noći na  $100$  °C u sušioniku kako bi se posušili do konstantne mase, a zatim sastrugani iz Petrijevih zdjelica i prebačeni u epruvete volumena 15 mL. Analiza sadržaja metala u uzorcima korijena, odnosno izdanaka izvršena je tehnikom optičke emisijske spektrometrije uz induktivno spregnutu plazmu (ICP-OES) u Zavodu za Javno Zdravstvo Dr. Andrija Štampar u Zagrebu.

### **3.2.3. Mjerenje fluorescencije lista metodom saturacijskog pulsa**

Fotosintetski pigmenti koji se nalaze u kloroplastima zelenih listova biljaka raspoređeni su u dva fotosistema: fotosistem I (PSI) i fotosistem II (PSII). U okolišnim uvjetima optimalnim za biljke najveći dio energije apsorbirane od strane fotosintetskih pigmenata (oko 95%) se prenosi na susjedne molekule pigmenata i koristi se za fotokemijske reakcije fotosinteze. Ipak, dio energije se gubi u obliku topline, a dio u obliku svjetlosti, emitirane putem fluorescencije klorofila. Ova tri načina oslobađanja energije prilikom povratka pobuđenog elektrona klorofila u osnovno stanje su u međusobnoj kompeticiji, te stoga povećanje udjela jednog od njih dovodi do smanjenja druga dva načina oslobađanja energije. Svjetlost

oslobođena fluorescencijom predstavlja vrlo mali udio u svjetlosti reflektiranoj s listova biljaka pa se može detektirati samo uz pomoć uređaja fluorimetra. Metoda mjerenja fluorescencije koja je primijenjena u ovome radu je metoda saturacijskog pulsa pomoću Qubit sustava, čiji su podatci analizirani programom Logger Pro 3.2. Fluorescencija je mjerena na listovima *N. tabacum* i *N. glauca* starosti deset tjedana koji su uzeti sedmog dana tretmana metalima u koncentracijama prema Tablici 3. Prije početka mjerenja fluorescencije biljke su bile u uvjetima tame sat vremena kako bi se molekule plastokinona oksidirale. Mjerenje je počelo obasjavanjem lista crvenom svjetlošću niskog intenziteta ( $\lambda = 660 \text{ nm}$ ,  $I \sim 40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ,  $\nu = 50 \text{ Hz}$ ) koji je nedovoljan za pokretanje fotokemijske reakcije. U takvim je uvjetima izmjerena minimalna fluorescencija klorofila u listu prilagođenoj na uvjete tame ( $F_0$ ). Zatim je primijenjen saturacijski puls, tj. kratkotrajna svjetlost visokog intenziteta ( $I \sim 4000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) koja je uzrokovala redukciju svih akceptora elektrona s reducirajuće strane PSII i rezultirala maksimalnom fluorescencijom ( $F_m$ ). U tom trenutku nije bilo prisutno fotokemijsko gašenje fluorescencije. Iz izmjerenih vrijednosti  $F_0$  i  $F_m$  izračunata je maksimalna učinkovitost PSII prema formuli  $(F_m - F_0) / F_m$ . Nakon uključivanja bijelog aktiničnog svjetla (engl. *actinic light*) dovoljno visokog intenziteta za pokretanje fotokemijskih reakcija slijedio je kratkotrajni porast vrijednosti fluorescencije. Kad se signal fluorescencije stabilizirao, u intervalima od 30 sekundi primjenjivani su saturacijski pulsevi, pri čemu su bilježene vrijednosti maksimalne fluorescencije ( $F'_m$ ) te fluorescencije ravnotežnog stanja ( $F_s$ ) u listu prilagođenoj na uvjete svjetla. Mjerenje je trajalo dok se vrijednost maksimalne fluorescencije ( $F'_m$ ) nije ustalila. Posljednje mjerenje uzeto je kao relevantno za izračun: maksimalne učinkovitost PSII ( $(F_m - F_0) / F_m = F_v / F_m$ ), efektivne učinkovitosti PSII ( $\Phi_{\text{PSII}} = (F'_m - F_s) / F'_m$ ) koja je mjera udjela energije iskorištene u fotokemijskim reakcijama, stope prijenosa elektrona ( $\text{ETR} = \Phi_{\text{PSII}} \times \text{PFD} \times 0,5$ ), fotokemijskog gašenja ( $q_P = (F'_m - F_s) / (F'_m - F'_0)$ ) koje je udio oksidiranih reakcijskih centara na PSII i nefotokemijskog gašenja fluorescencije ( $\text{NPQ} = (F_m - F'_m) / F'_m$ ) koje odražava gubitak energije u obliku topline. Nakon gašenja aktinične svjetlosti slijedio je kratkotrajni pad signala fluorescencije pri čemu je zabilježena vrijednost minimalne fluorescencije u listu prilagođenoj na uvjete svjetla ( $F'_0$ ). Eksperiment je ponovljen dva puta te su dobiveni podaci statistički obrađeni u programu Statistica 10 (StatsSoft, USA) pomoću Factorial Anova analize uz Duncanov test sa  $p$  vrijednošću 0,05. Iz dobivenih podataka procijenjena je učinkovitost PSII u biljkama *N. tabacum* i *N. glauca* tretiranim željezom i kadmijem.

### 3.2.4. Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu (*Real-time PCR*)

#### Način rada s RNA

Pri postupku izolacije ribonukleinskih kiselina iz tkiva potrebno je biti osobito pažljiv zbog osjetljivosti RNA na sveprisutne ribonukleaze, vrlo aktivne i otporne enzime koji ju mogu razgraditi. Endogene ribonukleaze potječu iz samog tkiva gdje imaju određenu ulogu pa pri razaranju (homogenizaciji) tkiva dolazi do njihova oslobađanja, a postoji opasnost i od kontaminacije egzogenim ribonukleazama s ruku istraživača, radnih površina, posuđa i otopina koje se koriste pri izolaciji. Iz navedenih razloga pri svim koracima postupka izolacije uzorci su držani na hladnom, s njima je radeno na čistim površinama predviđenim za rad s RNA te su pri radu nošene rukavice. Sve otopine i plastično posuđe sterilizirano je i korišteno samo za rad s RNA. Automatske mikropipete prije rada su očišćene s RNaseZAP reagensom za dekontaminaciju ribonukleaza. Uzorci otopine čiste RNA čuvani su pri temperaturi od – 20°C u sterilnoj destiliranoj vodi steriliziranoj autoklaviranjem u prisutnosti DEPC.

#### Izolacija ukupne RNA iz listova

Izolacija RNA rađena je iz listova biljaka obiju vrsta duhana starosti deset tjedana. Biljni materijal uzet je 1. i 3. dana tretmana. Smrznuti materijal čuvan je u zamrzivaču na -80°C do same izolacije u tekućem dušiku. Tijekom postupka izolacije uzorci su držani na ledu ukoliko nije drugačije navedeno. Biljno tkivo mase oko 200 mg je u ohlađenom tarioniku homogenizirano u fini prah u tekućem dušiku, a zatim je u uzorke dodano 0,8 mL TRIzola te je postupak dalje napravljen prema uputama proizvođača. Uzorci su dobro promiješani pomoću vrtložne miješalice i ostavljeni 5 minuta na sobnoj temperaturi, a zatim je u njih dodano po 0,2 mL kloroforma. Nakon ručnog miješanja uzoraka, slojevi su razdvojeni centrifugiranjem pri 16000g pri 4°C u trajanju od 20 minuta. Gornja faza pomiješana je s jednakim volumenom hladnog izopropanola, lagano promiješana i ostavljena preko noći pri – 20 °C kako bi se RNA istaložila. Centrifugiranjem pri 16000g pri 4°C u trajanju od 20 minuta dobiven je talog ukupne RNA koji je ispran dodatkom 1 mL hladnog 96% etanola te centrifugiranjem pri 16000g pri 4°C u trajanju od 5 minuta. Supernatant je uklonjen te je talog ostavljen da se posuši, a zatim je otopljen u 20 µL sterilne destilirane vode.

## Provjera čistoće i kvalitete izolirane RNA

Horizontalna elektroforeza u agaroznom gelu korištena je za razdvajanje RNA molekula s obzirom na veličinu i oblik kako bi se provjerila čistoća i kakvoća izolirane RNA. Agarozni gelovi (1,5% (w/v) agaroz) pripremljeni su otapanjem agaroze u TAE puferu sastava: Tris ( $c = 0,04$  M), octena kiselina ( $c = 0,02$  M), EDTA pH 8,0 ( $c = 1,0$  mM). Uzorci RNA su prije nanošenja na gel pomiješani s bojom za nanošenje sastava: bromfenol plavilo (0,4 % (w/v)), ksilencijanol FF (0,4 % (w/v)) i glicerol (50 % (w/v)). Kao marker molekulskih masa na agaroznim gelovima korišten je *GeneRuler 100 bp DNA Ladder Plus*. Elektroforeza je provedena u kadici za elektroforezu *RunOne Electrophoresis Cell* tvrtke Embi Tec uz korištenje elektrodnog pufera TAE na sobnoj temperaturi pri naponu 100 V 20 min. RNA je vizualizirana nakon bojanja gela u otopini etidijeva bromida u TAE puferu (konačne  $c = 0,5$   $\mu\text{g/mL}$ ) pomoću TAE svjetlosti valne duljine 280 nm. Fotografije elektroforetskih gelova snimljene su pomoću Kodak EDAS 290 kamere.

## Reverzna transkripcija glasničke RNA u cDNA

Kako izolirane molekule RNA ne mogu poslužiti kao kalup u lančanoj reakciji polimerazom, bilo je potrebno napraviti reverznu transkripciju izolirane RNA u njoj komplementarnu DNA (cDNA). Ova reakcija provedena je pomoću enzima reverzne transkriptaze koji na temelju molekule RNA kao kalupa stvara komplementarnu jednolančanu molekulu DNA. Budući da smo u reakciji koristili oligo-dT početnice dužine 15 nukleotida koje prijanjaju na poli-A repove na 3' kraju molekula glasničke RNA (mRNA), enzim je prepisao samo molekule glasničke RNA u komplementarne molekule DNA. Za svaki uzorak postavljena je reakcija dodatkom RNA (konačne  $\gamma = 0,1$   $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) i prvih triju sastavnica prikazanih Tablicom 4. prema uputama proizvođača. Uzorci su zatim inkubirani pri 65°C u vremenu od 5 minuta kako bi se denaturirale sekundarne strukture RNA koje bi smetale u reakciji. Uzorci su ohlađeni u ledu u vremenu od barem 1 minute kako bi se omogućilo prijanjanje oligo-dT početnica na mRNA. Zatim su dodane i preostale sastavnice reakcije prema Tablici 4. Reverzna transkripcija odvijala se inkubiranjem uzoraka pri 50°C u vremenu od jednog sata, a zatim inaktivirala pri 70°C u vremenu od 15 minuta. Za analizu lančanom reakcijom polimerazom u stvarnom vremenu u isti uzorak spojene su cDNA dobivene u 3 odvojena eksperimenta.

Tablica 4. Sastavnice reakcije reverzne transkripcije (uz RNA konačne  $\gamma = 0,1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ ). Ukupni volumen reakcijske smjese iznosi  $30 \mu\text{L}$ .

sastojak	c početna	V / $\mu\text{L}$
oligo dT (15-meri)	$10 \mu\text{M}$	1,5
smjesa dNTP	5 mM	1,5
dH <sub>2</sub> O		do 22,5
5x <i>First strand buffer</i>		6
DTT	0,1 M	1,5
<i>Superscript</i>	200 U/ $\mu\text{l}$	0,25

Provjera uspješnosti reverzne transkripcije lančanom reakcijom polimerazom

Lančana reakcija polimerazom (PCR, engl. *polymerase chain reaction*) je metoda umnažanja specifičnog dijela DNA izvan živog sustava. Za provjeru uspješnosti prepisivanja mRNA u komplementarnu DNA postavljena je PCR reakcija umnažanja gena za aktin čiji su uvjeti optimirani. Za svaki uzorak korišteno je  $5 \mu\text{L}$  sto puta razrijeđene reakcijske smjese reverzne transkripcije kao DNA kalupa. Dodane su i ostale sastavnice prema Tablici 5. Reakcije su postavljene prema uvjetima u istoj tablici. Postojanje PCR produkta ispitano je elektroforezom u agaroznom gelu, na isti način kako je opisano za elektroforezu RNA.

Tablica 5. Sastavnice i uvjeti reakcije PCR za umnažanje gena za aktin.

sastojak	c konačna	volumen
10x <i>DreamTaq Buffer</i>		$2 \mu\text{L}$
smjesa dNTP	$c = 0,25 \text{ mM}$	$2 \mu\text{L}$
početnica F	$c = 100 \text{ nm}$	$0,2 \mu\text{L}$
početnica R	$c = 100 \text{ nm}$	$0,2 \mu\text{L}$
<i>DreamTaq</i> DNA polimeraza	$0,1 \text{ U}/\mu\text{L}$	$0,4 \mu\text{L}$
dH <sub>2</sub> O		do $20 \mu\text{L}$
Uvjeti: $95^\circ\text{C}$ 5 minuta, 35 ciklusa ( $95^\circ\text{C}$ 30 sekundi, $60^\circ\text{C}$ 30 sekundi, $72^\circ\text{C}$ 30 sekundi), $72^\circ\text{C}$ 7 minuta, $4^\circ\text{C}$ $\infty$		



## Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu

Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu (engl. *real-time* PCR) je modificirana metoda klasične PCR reakcije pri kojoj uređaj prati količinu novosintetizirane DNA kroz cikluse što je omogućeno time što novonastala DNA biva obilježena fluorescencijskom bojom specifičnom za dvolančanu DNA. Budući da je količina emitirane fluorescencije proporcionalna količini PCR produkta, mjerenjem fluorescencije mjeri se količina nastale DNA. *Real-time* PCR je stoga metoda kojom se može kvantificirati genska ekspresija odabranog gena pri čemu se prvo iz ciljnog tkiva izolira ukupna RNA, zatim se glasničke RNA molekule koje su mjera ekspresije gena prepisu reverznom transkripcijom u cDNA koja naposljetku služi kao kalup u reakciji *real-time* PCR. Ukoliko u reakciji *real-time* PCR postavljenoj za određeni gen fluorescencijski signal prijeđe određenu razinu detekcije iznad nespecifičnog signala, nazvanu prag fluorescencije (engl. *threshold*), smatra se da taj uzorak sadrži kalup ciljne cDNA koja se u trenutku prelaska praga nakon određenog broja ciklusa umnožila na razinu detekcije. Broj ciklusa reakcije u kojem je neki uzorak prešao postavljeni prag fluorescencije naziva se  $C_T$  (engl. *threshold cycle*). To je podatak koji nam govori o početnoj količini cDNA u uzorku, odnosno količini mRNA iz ciljnog tkiva. Ova metoda je korištena za usporedbu količine ekspresije određenog gena između pojedinih uzoraka što se naziva relativnom kvantifikacijom. Geni čija je ekspresija određena nazivaju se ciljni geni (engl. *target*), a gen koji služi za normalizaciju rezultata interna kontrola (engl. *reference*). Budući da se određuje promjena genske ekspresije u uzorcima koja se normalizira u odnosu na internu kontrolu te da efikasnost PCR reakcije može utjecati na vrijednost  $C_T$ , nužno je pri kvantifikaciji rezultata uzeti u obzir koja je efikasnost PCR reakcija za umnožene gene. Efikasnost PCR reakcije za umnažanje nekog gena izračunata je pomoću nagiba pravca koji prikazuje ovisnost  $C_T$  o logaritmu koncentracije, dobivenog pomoću vrijednosti  $C_T$  reakcija umnažanja ciljnog gena za dva decimalna razrjeđenja kalupa (razrjeđenje 10 i 100 puta). Kao fluorescencijska boja u provedenoj reakciji *real-time* PCR korištena je boja SYBR *Green* I koja se velikim afinitetom nespecifično veže za dvolančanu DNA te ima maksimum apsorpcije pri valnoj duljini od 497 nm u plavom dijelu spektra, a emisije pri valnoj duljini od 520 nm u zelenom dijelu spektra. Budući da ta boja nespecifično veže svaku dvolančanu DNA, jedinstvenost dobivenog PCR produkta u pojedinim reakcijama utvrđena je na temelju izgleda disocijacijske krivulje. Takva krivulja prikazuje fluorescenciju u odnosu na temperaturu te se s nje može očitati temperatura taljenja koja je jedinstvena za određeni PCR produkt s obzirom na njegov nukleotidni sastav i dužinu.

Reakcija *real time* PCR izvedena je u uređaju Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR Systems u *MicroAmp* (Applied Biosystems) optičkim pločicama s 96 bunarića. Kako bi se izvele reakcije umnažanja za sve uzorke, korišteno je nekoliko optičkih pločica. Slika 1. prikazuje shemu jedne takve pločice s postavljenim reakcijama PCR prema uvjetima u Tablici 6. Korišteni *Power SYBR Green PCR Master Mix* je nabavljen od proizvođača Applied Biosystems i sastava: SYBR Green I boja, *AmpliTaqGold* DNA polimeraza LD, smjesa dNTP, ROX pasivna referenca, pufer. U Tablici 7. prikazane su sekvence početnica F (engl. *forward*) i R (engl. *reverse*) dizajniranih na sekvencama cDNA vrste *N. tabacum* pomoću programa *Primer3Plus* ([www.bioinformatics.nl](http://www.bioinformatics.nl)) korištene za umnažanje gena za aktin, *NAS* i *NRAMP-1* te veličine dobivenih PCR produkata. Za sva tri umnažana gena postavljene su negativne kontrole bez dodatka cDNA (NTC, engl. *non template control*). Svaka reakcija za umnažanje pojedinog gena postavljena je u duplikatu za uzorke istog razrjeđenja cDNA istog tretmana. Analiza rezultata napravljena je pomoću računalnih programa 7300 System SDS Software i Microsoft Office Excel.

Tablica 6. Sastavnice i uvjeti reakcije *real-time* PCR.

<b>sastojak</b>	<b>C konačna</b>	<b>V / <math>\mu</math>L</b>
cDNA (razrjeđenja 10 ili 100 puta)		5
početnica F	100 nM	0,2
početnica R	100 nM	0,2
dH <sub>2</sub> O		4,6
<i>Power SYBR Green PCR Master Mix</i>		10
Uvjeti: 95°C 10 minuta, 40 ciklusa (95°C 15 sekundi, 60°C 1 minuta)		

Tablica 7. Sekvence početnica F i R te veličina PCR produkta za gene aktin, *NRAMP-1* i *NAS*.

<b>Gen</b>	<b>Pristupni broj</b>	<b>Počelnica F</b>	<b>Počelnica R</b>	<b>Velčina produkta</b>
<i>AKTIN</i>	AB158612	5'- TGGTTAAGGCTGGATTTGC - 3'	5'- GCATCCTTTTGACCCATACC - 3'	109
<i>NRAMP-1</i>	AB505625	5'- TGGAGTTCCAAGCTATTTGC - 3'	5'- GGCGTATGTCCCAGTTATTG - 3'	97
<i>NAS</i>	AB126258	5'- ATAAGTGCCACGCATACTCG - 3'	5'- GAGACGACCACCATCACATC - 3'	72

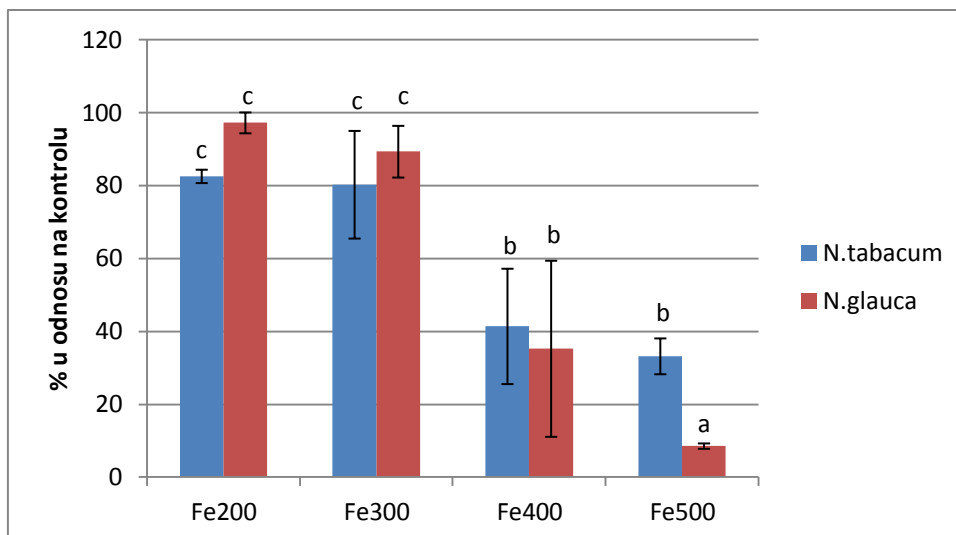
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A			Nt K1 10x akt		Ng K1 10x akt		Nt K1 10x NRAMP		Ng K1 10x NRAMP		Ng K1 10x NAS	
B	NTC akt	NTC akt	Nt K1 100x akt		Ng K1 100x akt		Nt K1 100x NRAMP		Ng K1 100x NRAMP		Ng K1 100x NAS	
C	NTC NRAMP	NTC NRAMP	Nt F1 10x akt		Ng F1 10x akt		Nt F1 10x NRAMP		Ng F1 10x NRAMP		Ng F1 10x NAS	
D	NTC NAS	NTC NAS	Nt F1 100x akt		Ng F1 100x akt		Nt F1 100x NRAMP		Ng F1 100x NRAMP		Ng F1 100x NAS	
E	cDNA pool 1x akt		Nt C1 10x akt		Ng C1 10x akt		Nt C1 10x NRAMP		Ng C1 10x NRAMP		Ng C1 10x NAS	
F	cDNApool 10x akt		Nt C1 100x akt		Ng C1 100x akt		Nt C1 100x NRAMP		Ng C1 100x NRAMP		Ng C1 100x NAS	
G	RNA pool 100x akt		Nt FC1 10x akt		Ng FC1 10x akt		Nt FC1 10x NRAMP		Ng FC1 10x NRAMP		Ng FC1 10x NAS	
H	RNA pool 1000x akt		Nt FC1 100x akt		Ng FC1 100x akt		Nt FC1 100x NRAMP		Ng FC1 100x NRAMP		Ng FC1 100x NAS	

Slika 1. Shema reakcijske pločice za reakcije *real-time* PCR. Kratice: Nt - *N. tabacum*, Ng – *N. glauca*, K1 –kontrola 1. dan, F1 – 1. dan tretmana željezom, C1 - 1. dan tretmana kadmijem, FC1 - 1. dan tretmana željezom i kadmijem

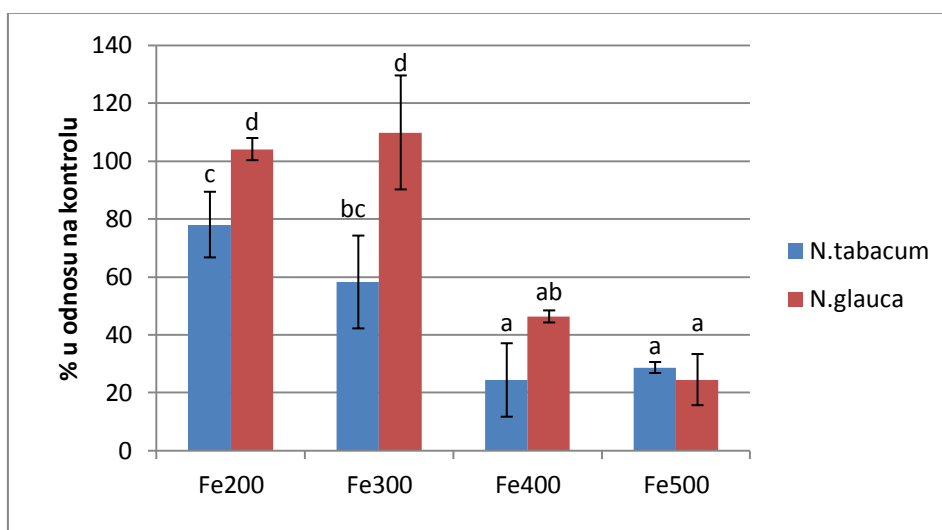
## 4. Rezultati

### 4.1. Određivanje klijavosti, dužine korijena i izdanka te biomase klijanaca starosti 28 dana

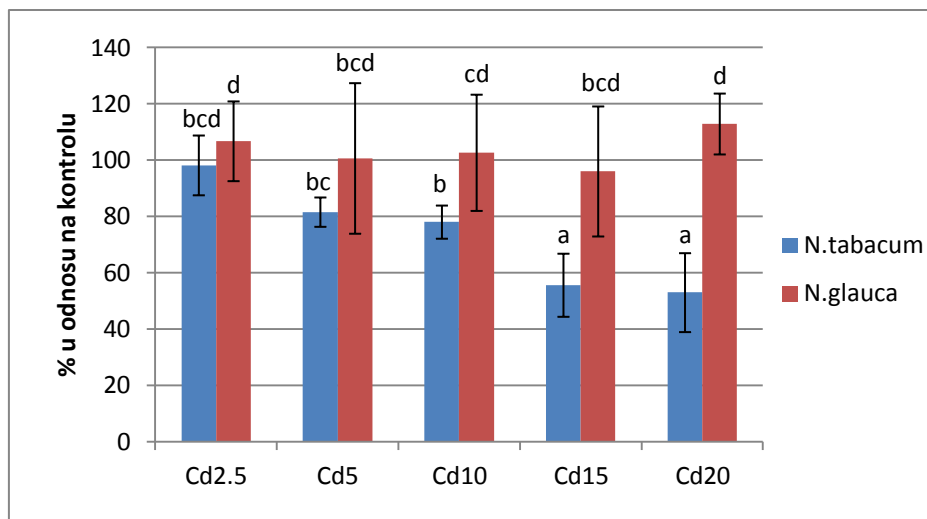
Klijavost sjemenki vrsta *N. tabacum* i *N. glauca* nije pokazala statistički značajne razlike (podaci nisu prikazani). Dužina korijena klijanaca vrste *N. glauca*, odnosno *N. tabacum* raslih na pokusnim podlogama MS izražena je kao postotak dužine korijena kontrolnih klijanaca iste vrste. Isto je napravljeno i za dužinu izdanaka klijanaca te masu klijanaca. Rezultati su pokazali da nema statistički značajne razlike u inhibiciji rasta korijena klijanaca obje vrste na podlogama s koncentracijama Fe 200  $\mu\text{M}$  i 300  $\mu\text{M}$ , dok je kod klijanaca koji su rasli na podlogama s koncentracijama Fe 400  $\mu\text{M}$  i 500  $\mu\text{M}$  utvrđena statistički značajna razlika u inhibiciji rasta korijena u odnosu na koncentracije Fe 200  $\mu\text{M}$  i 300  $\mu\text{M}$  (Slika 2.). Isti rezultat dobiven je i za masu klijanaca tretiranih Fe u odnosu na kontrolu (Slika 3.). Podaci za inhibiciju rasta izdanka klijanaca tretiranih Fe nisu pokazali statistički značajnu razliku (podaci nisu prikazani). Inhibicija rasta korijena klijanaca tretiranih Cd vrste *N. tabacum* pokazala je statistički značajnu razliku za koncentraciju Cd 15  $\mu\text{M}$  u odnosu na niže koncentracije Cd, dok za vrstu *N. glauca* nije došlo do statistički značajne inhibicije rasta korijena u ovisnosti o tretmanu s Cd (Slika 4.). Podaci za inhibiciju rasta izdanka i promjenu mase klijanaca tretiranih Cd nisu pokazali statistički značajnu razliku (podaci nisu prikazani). Općenito, veće koncentracije metala imale su izraženiji učinak na inhibiciju rasta i smanjenje mase, dovodeći do izražene kloroze, nekroze i čak ugibanja klijanaca (Slika 5.). Na temelju dobivenih rezultata za daljnje pokuse su odabrane koncentracije željeza od 300  $\mu\text{M}$ , kadmija od 15  $\mu\text{M}$  i kombinacija oba metala u navedenim koncentracijama.



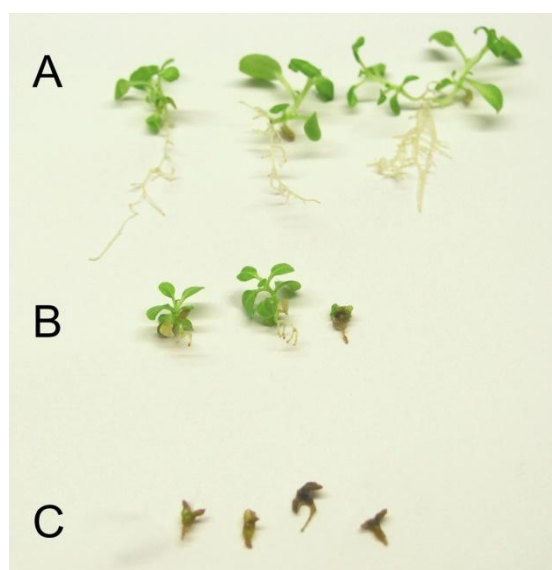
Slika 2. Dužina korijena klijanaca koji su rasli na podlogama MS s Fe izražena kao postotak dužine korijena kontrolnih klijanaca.



Slika 3. Masa klijanaca koji su rasli na podlogama MS s Fe izražena kao postotak mase kontrolnih klijanaca.



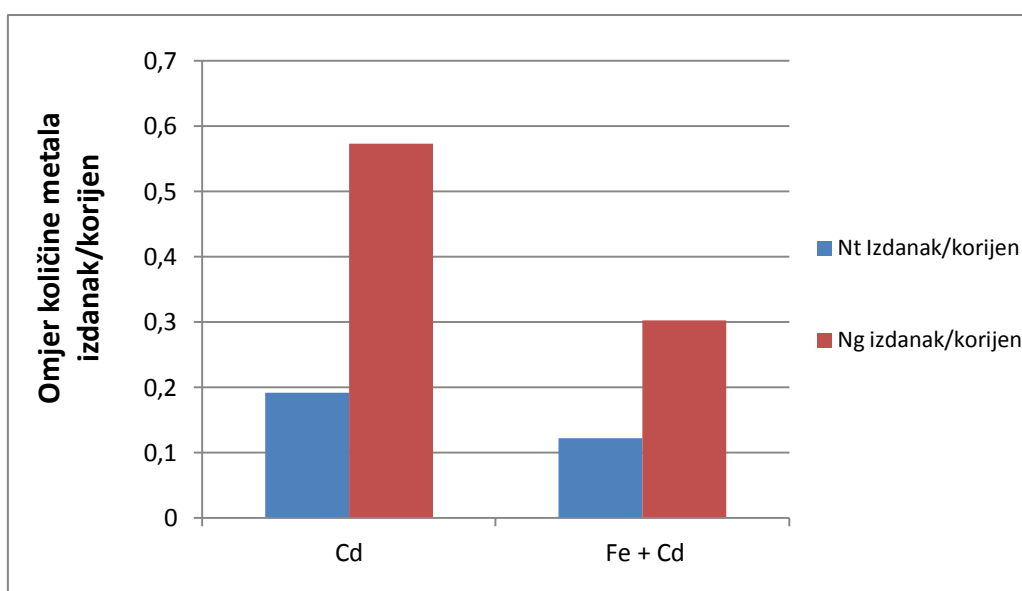
Slika 4. Dužina korijena klijanaca koji su rasli na podlogama MS s Cd izražena kao postotak dužine korijena kontrolnih klijanaca



Slika 5. Usporedba veličine klijanaca vrste *N. glauca* koji su rasli na podlozi MS s različitim koncentracijama željeza: A) 300  $\mu$ M, B) 400  $\mu$ M, C) 500  $\mu$ M.

## 4.2. Određivanje sadržaja metala u izdanku i korijenu klijanaca starosti 28 dana

Sadržaj Fe i Cd određen je tehnikom optičke emisijske spektrometrije uz induktivno spregnutu plazmu (ICP-OES). Rezultati (Slika 6.) su pokazali da je omjer količine Cd u izdanku u odnosu na korijen klijanaca vrste *N. tabacum* tretiranih Cd tri puta manji od omjera količine Cd u izdanku u odnosu na korijen klijanaca vrste *N. glauca* tretiranih Cd, s time da su oba omjera manja od 1. Također je utvrđeno da je omjer zbroja količine oba metala u izdanku u odnosu na korijen klijanaca vrste *N. tabacum* tretiranih s oba metala dva do tri puta manji od omjera zbroja količine oba metala u izdanku u odnosu na korijen klijanaca vrste *N. glauca*. Oba navedena omjera manja su od 1 i manja su od omjera količine Cd u izdanku u odnosu na korijen klijanaca tretiranih Cd.

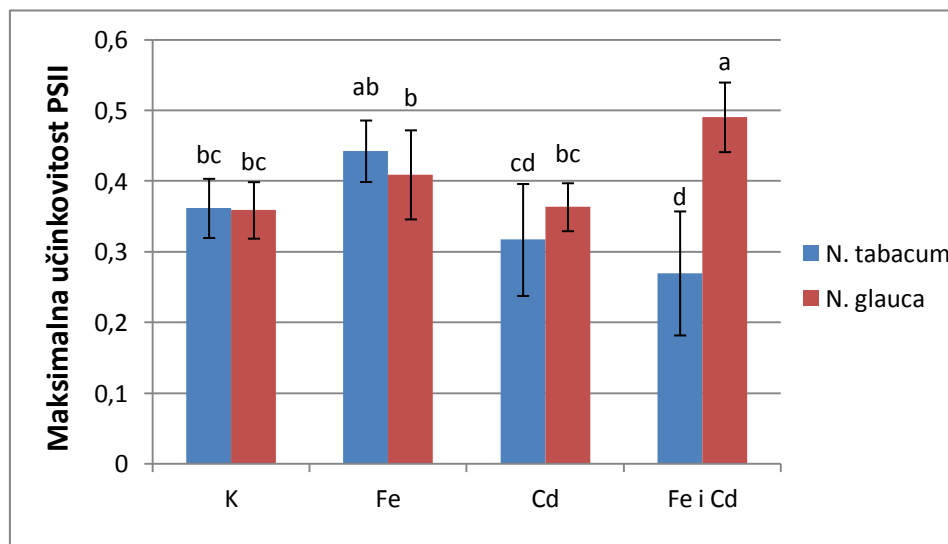


Slika 6. Omjer sadržaja metala u izdanku u odnosu na korijen klijanaca.



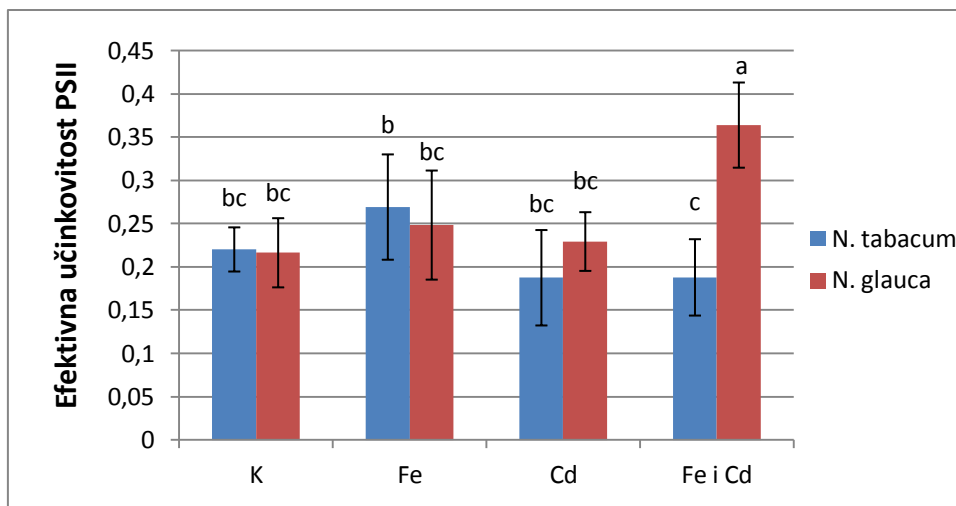
### 4.3. Određivanje parametara fotosinteze biljaka

Iz podataka dobivenih mjerenjem metodom saturacijskog pulsa izračunati su parametri fotosinteze lista u biljkama vrste *N. tabacum* i *N. glauca* starosti 10 tjedana tretiranim Fe i Cd. Maksimalna učinkovitost PSII prikazana je na slici 7. Biljke vrste *N. tabacum* pokazale su statistički značajni pad u maksimalnoj učinkovitosti PSII za tretman Cd u odnosu na tretman Fe. Rezultati također pokazuju da je kod biljaka obje vrste tretiranih kombinacijom Fe i Cd došlo do statistički značajnih promjena u maksimalnoj učinkovitosti PSII koja je kod biljaka *N. tabacum* pala, a kod biljaka *N. glauca* porasla u odnosu na odgovarajuće kontrolne biljke i biljke tretirane Fe. Iznos maksimalne učinkovitosti PSII je u rasponu 0,25 - 0,5.



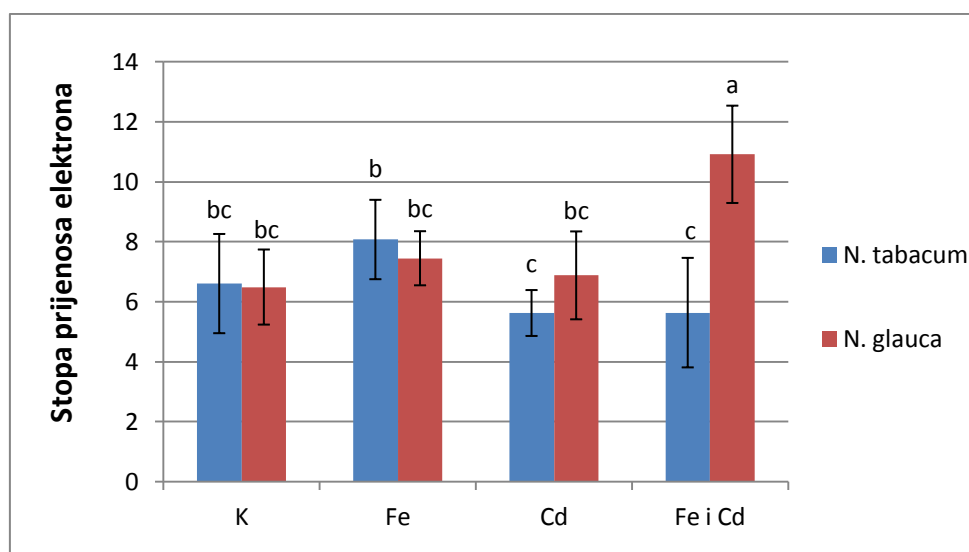
Slika 7. Maksimalna učinkovitost PSII listova kontrolnih i tretiranih biljaka vrsta *N. tabacum* i *N. glauca*.

Efektivna učinkovitost PSII prikazana je na slici 8. Biljke vrste *N. tabacum* pokazale su statistički značajni pad u efektivnoj učinkovitosti PSII za tretman kombinacijom Fe i Cd u odnosu na tretman Fe. Rezultati također pokazuju da je kod biljaka *N. glauca* tretiranih kombinacijom Fe i Cd došlo do statistički značajnog porasta u efektivnoj učinkovitosti PSII u odnosu na kontrolu i ostale tretmane, dok za vrstu *N. tabacum* to nije slučaj. Ovaj parametar pokazuje statistički značajnu razliku u vrijednosti između biljaka *N. tabacum* i *N. glauca* tretiranih kombinacijom oba metala.



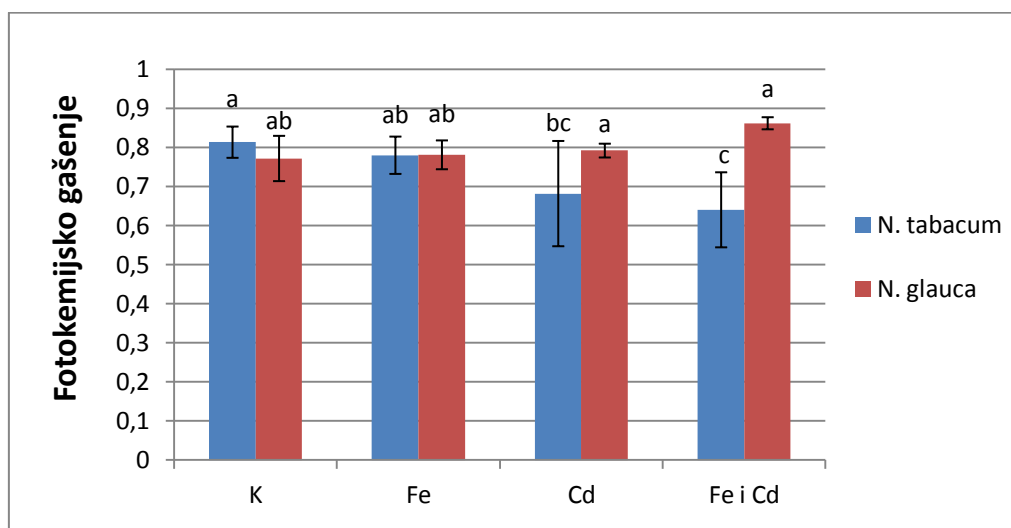
Slika 8. Efektivna učinkovitost PSII listova kontrolnih i tretiranih biljaka vrsta *N. tabacum* i *N. glauca*.

Stopa prijenosa elektrona prikazana je za vrste *N. tabacum* i *N. glauca* prikazana je na slici 9. Biljke vrste *N. tabacum* pokazale su statistički značajni pad u stopi prijenosa elektrona za tretman Cd i kombinacijom Fe i Cd u odnosu na tretman Fe. Također je utvrđeno da je kod biljaka *N. glauca* tretiranih kombinacijom Fe i Cd došlo do statistički značajnog porasta u stopi prijenosa elektrona u odnosu na kontrolu i ostale tretmane. Dobiveno je da ovaj parametar pokazuje statistički značajnu razliku u vrijednosti između biljaka *N. tabacum* i *N. glauca* tretiranih kombinacijom oba metala.



Slika 9. Stopa prijenosa elektrona u listovima kontrolnih i tretiranih biljaka vrsta *N. tabacum* i *N. glauca*.

Fotokemijsko gašenje u listovima kontrolnih i tretiranih biljaka *N. tabacum* i *N. glauca* prikazano je na slici 10. Biljke vrste *N. glauca* nisu pokazale statistički značajne promjene u fotokemijskom gašenju u tretmanima u odnosu na kontrolu, dok su biljke vrste *N. tabacum* tretirane kombinacijom Fe i Cd pokazale statistički značajan pad u fotokemijskom gašenju u odnosu na kontrolu i tretman Fe. Ovaj parametar pokazuje statistički značajnu razliku u vrijednosti između biljaka *N. tabacum* i *N. glauca* tretiranih kombinacijom oba metala.



Slika 10. Fotokemijsko gašenje u listovima kontrolnih i tretiranih biljaka vrsta *N. tabacum* i *N. glauca*.

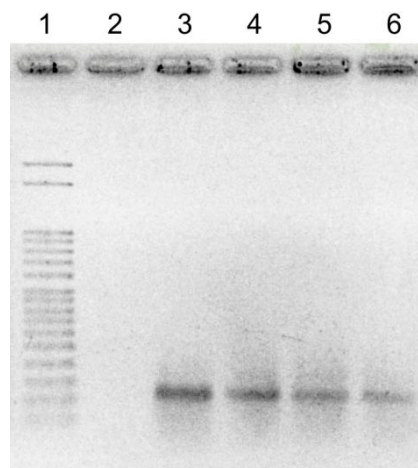
#### 4.4. Izolacija ukupne RNA iz listova biljaka i reverzna transkripcija RNA u cDNA

Listovi vrsta *N. glauca* i *N. uzeti* su 1. i 3. dan nakon presađivanja na kontrolne i pokusne tekuće podloge MS. Postupak izolacije RNA rađen je iz listova dviju biljaka unutar istog tretmana. Izolacija je napravljena prema postupku opisanom u poglavlju 3.2.4., a zatim je čistoća i kakvoća izolirane RNA svih uzoraka provjerena elektroforezom na agaroznom gelu. Cjelovite molekule RNA u uzorcima vidljive su nakon bojanja etidijevim bromidom kao jasni fragmenti uz jače izražena najviša dva fragmenta koji odgovaraju ribosomskoj RNA. Masena koncentracija izolirane RNA te omjeri  $A_{260}/A_{280}$  i  $A_{260}/A_{230}$  izmjereni su pomoću instrumenta NanoVue. Navedeni omjeri govore o čistoći RNA te je omjer  $A_{260}/A_{280}$  iznosio oko 1,9, a  $A_{260}/A_{230}$  iznad 2. Ukoliko bi izolirana RNA bila slabe čistoće, još bi jednom bila ostavljena na taloženju u izopropanolu preko noći te bi se dobiveni talog isprao etanolom, prema opisanom protokolu za izolaciju RNA. Izmjerena masena koncentracija izolirane RNA

korištena je za računanje potrebnog volumena otopine RNA za reakciju reverzne transkripcije.

#### 4.5. Optimiziranje uvjeta lančane reakcije polimerazom za provjeru uspješnosti reverzne transkripcije

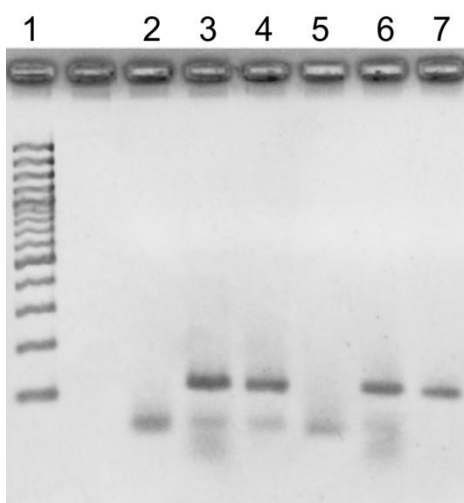
Budući da je mRNA za aktin uvijek eksprimirana u biljnim stanicama u stalnoj količini (tzv. „housekeeping gene“), za provjeru uspješnosti prepisivanja mRNA u cDNA nakon svake reakcije reverzne transkripcije, postavljena je reakcija PCR umnažanja gena za aktin za svaki uzorak. Nastali produkt umnažanja, vidljiv na agaroznom gelu nakon elektroforeze i bojanja etidijevim bromidom kao fragment veličine 109 parova baza (Slika 11.), uzet je kao dokaz uspješne reakcije reverzne transkripcije.



Slika 11. Elektroforeza u agaroznom gelu produkata reakcije PCR za aktin iz *N. tabacum*: 1) marker, 2) negativna kontrola, 3) kontrolni tretman 4) tretman željezom, 5) tretman kadmijem, 6) tretman s oba metala.

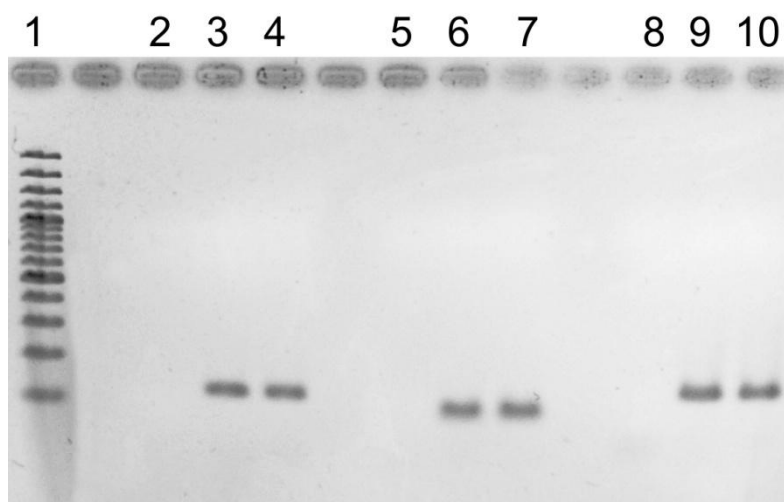
Uvjete ove reakcije trebalo je prethodno optimizirati s obzirom na potrebnu količinu početnica te razrjeđenje i volumen cDNA kao kalupa. U tu svrhu postavljene su reakcije PCR umnažanja gena za aktin prema uvjetima u Tablici 5. u poglavlju 3.2.4., osim za količinu cDNA i početnica. Isprobana su dva razrjeđenja cDNA (10 puta i 100 puta razrijeđena smjesa nakon reverzne transkripcije) te dvije koncentracije početnica R i F (0,2 te 0,5  $\mu$ L svake početnice). Kalup je nakon reakcije reverzne transkripcije potrebno razrijediti kako bi se

razrijedile oligo-dT početnice i mogući inhibitori zaostali iz procesa izolacije RNA. Svrha ove optimizacije bila je uspostaviti minimalne uvjete reakcije PCR koji će umnožiti produkt, a da pritom neželjene sastavnice ne utječu na reakciju. Potencijalna nespecifična umnažanja (primjerice dimeri početnica) mogu dati pogrešan signal u reakciji *real time* PCR, jer se fluorescentna boja *SYBR Green* veže za sve dvolančane molekule DNA. Na slici 12. vidljivo je da se najčišća reakcija umnažanja postiže s 0,2  $\mu$ L početnica konačne koncentracije 100 nM i 5  $\mu$ L 100 puta razrijeđene cDNA kao kalupa. Navedeni uvjeti su stoga korišteni u reakcijama PCR za provjeru uspješnosti reverzne transkripcije za svaki uzorak, te u reakciji *real time* PCR.



Slika 12. Elektroforeza u agaroznom gelu produkata reakcije PCR za aktin: 1) marker, 2) negativna kontrola s 0,5  $\mu$ L početnica F i R, 3) 10 puta razrijeđena cDNA s 0,5  $\mu$ L početnica F i R, 4) 100 puta razrijeđena cDNA s 0,5  $\mu$ L početnica F i R, 5) negativna kontrola s 0,2  $\mu$ L početnica F i R, 6) 10 puta razrijeđena cDNA s 0,2  $\mu$ L početnica F i R, 7) 100 puta razrijeđena cDNA s 0,2  $\mu$ L početnica F i R.

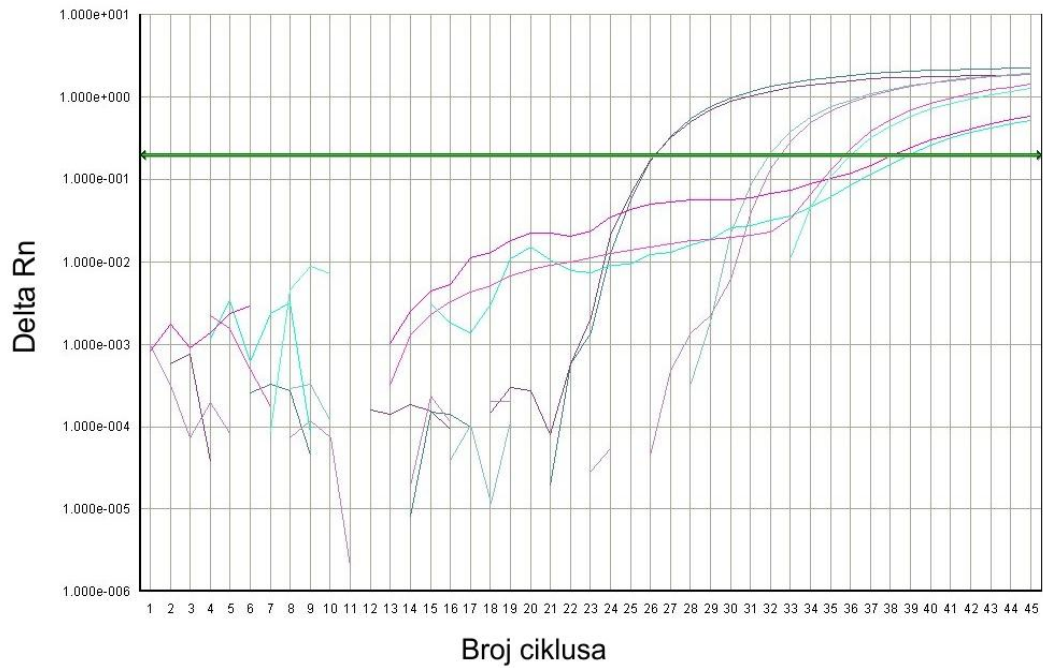
Nakon optimizacije količine kalupa i početnica u reakciji PCR, napravljena je provjera tih uvjeta u reakciji s enzimom koji će biti korišten u reakciji *real time* PCR. U tu svrhu, napravljene su reakcije PCR za gene za aktin, *NAS* i *NRAMP-1* prema uvjetima u Tablici 6. u poglavlju 3.2.4., za provjeru umnažanja sva tri navedena gena prije kvantifikacije njihove ekspresije reakcijom *real-time* PCR. Slika 13. prikazuje produkte umnažanja koji su bili vidljivi nakon elektroforeze na agaroznom gelu i bojanja etidijevim bromidom kao fragmenti veličine prema Tablici 7. u poglavlju 3.2.4..



Slika 13. Elektroforeza u agaroznom gelu produkata reakcije PCR: 1) marker, 2) negativna kontrola za aktin, 3) aktin na kalupu *N. tabacum*, 4) aktin na kalupu *N. glauca*, 5) negativna kontrola *NAS*, 6) *NAS* na kalupu *N. tabacum*, 7) *NAS* na kalupu *N. glauca*, 8) negativna kontrola *NRAMP-1*, 9) *NRAMP-1* na kalupu *N. tabacum*, 10) *NRAMP-1* na kalupu *N. glauca*.

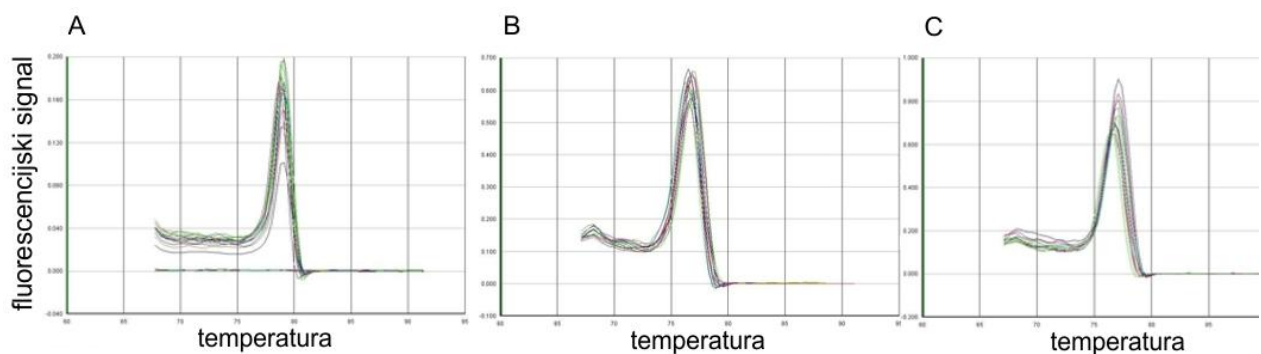
#### 4.6. Određivanje specifičnosti i efikasnosti reakcija *real-time* PCR

U ovom radu određena je promjena u ekspresiji ciljnih gena *NAS* i *NRAMP-1* u listovima vrsta *N. glauca* i *N. tabacum* starosti deset tjedana tretiranih teškim metalima Fe i Cd u trajanju od jednog i tri dana u odnosu na netretirane kontrolne biljke iste vrste uz korištenje gena za aktin kao interne kontrole. Kao rezultat reakcije *real-time* PCR dobivene su amplifikacijske krivulje, odnosno grafički prikazi ovisnosti promjene fluorescencije o broju ciklusa reakcije PCR postavljene u duplikatu za svaki uzorak istog razrjeđenja cDNA istog tretmana. U ovakvim grafičkim prikazima postavljen je prag fluorescencije u linearnom dijelu krivulje te je očitana vrijednost  $C_T$  za svaki uzorak. Pregledan je izgled svih krivulja i utvrđena je ispravnost negativnih kontrola (NTC). Iz amplifikacijske krivulje umnažanja gena za aktin uz korištenje smjese cDNA svih uzoraka kao kalupa i smjese RNA svih uzoraka vidi se da su vrijednosti  $C_T$  udaljene više od 6 ciklusa što znači da uzorci cDNA nisu zagađeni s genomskom DNA (Slika 14.), koja bi u protivnom mogla utjecati na rezultate reakcije.



Slika 14. Amplifikacijska krivulja umnažanja gena za aktin reakcijom *real-time* PCR uz kalup cDNA, odnosno smjese RNA.

Nakon toga je utvrđena jedinstvenost dobivenog PCR produkta za pojedinu reakciju provjerom izgleda disocijacijske krivulje. Disocijacijske krivulje prikazane na slici 15. dokaz su da je produkt dobiven u ovim reakcijama jedinstven jer se vrh svake krivulje nalazi na temperaturi taljenja specifičnoj za produkt reakcije PCR.

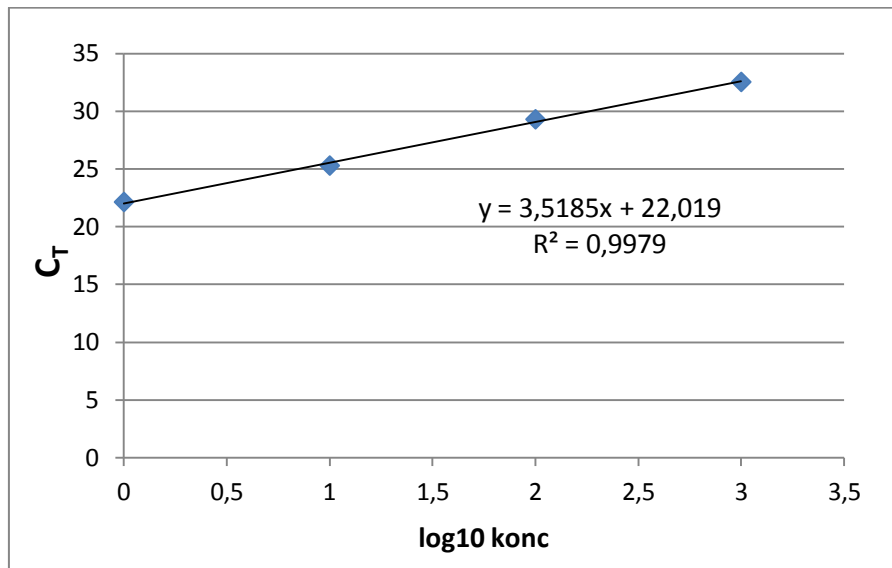


Slika 15. Disocijacijska krivulja za gene A) aktin B) *NAS* C) *NRAMP-1* umnožene uz kalup cDNA iz vrste *Nicotiana tabacum*.

U daljnjoj analizi vrijednosti  $C_T$  su korištene za izračun relativne ekspresije gena *NAS* i *NRAMP-1*. Prvo je izračunata efikasnost reakcije umnažanja gena za aktin koja služi za normalizaciju rezultata. Efikasnost reakcije umnažanja aktina izračunata je iz nagiba pravca koji prikazuje ovisnost vrijednosti  $C_T$  o logaritmu koncentracije smjese cDNA kao kalupa (Slika 16.) prema formuli:

$$E = 10^{-\frac{1}{s}} - 1$$

gdje je E – efikasnost reakcije PCR, s – nagib pravca.



Slika 16. Ovisnost vrijednosti  $C_T$  dobivenih za reakcije umnažanja gena za aktin o logaritmu koncentracije smjese cDNA kao kalupa.

Efikasnost ove reakcije izračunata je i za umnažanje aktina s kalupom cDNA iz kontrolnih i tretiranih uzoraka. Nadalje, iz nagiba pravaca dobivena je efikasnost reakcija PCR za umnažanje pojedinih gena u svim uzorcima. Zatim je izračunata razlika u vrijednostima  $C_T$  između uzorka i pripadajuće kontrole ( $\Delta C_T$ ) te je promjena ekspresije gena *NAS* i *NRAMP-1* u uzorcima u odnosu na njihovu ekspresiju u netretiranoj kontroli dobivena metodom prema Pffaflu (Pffafl, 2001.) uz normalizaciju s obzirom na ekspresiju gena za aktin.



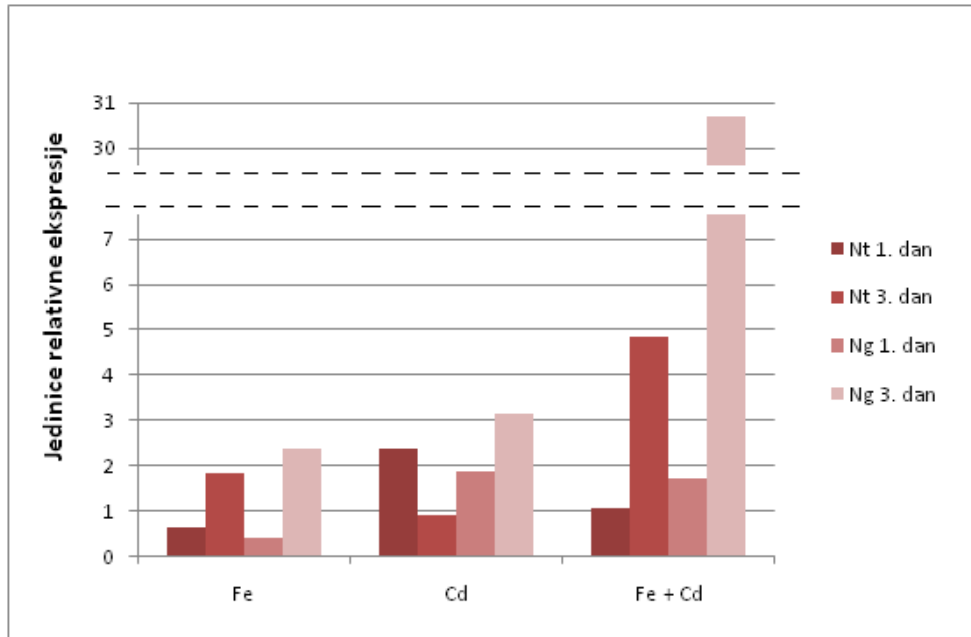
Omjer ekspresije izračunava se prema formuli:

$$omjer = \frac{E_{ciljni}^{\Delta C_T \text{ ciljni gen (kontrola- uzorak)}}}{E_{aktin}^{\Delta C_T \text{ aktin (kontrola- uzorak)}}$$

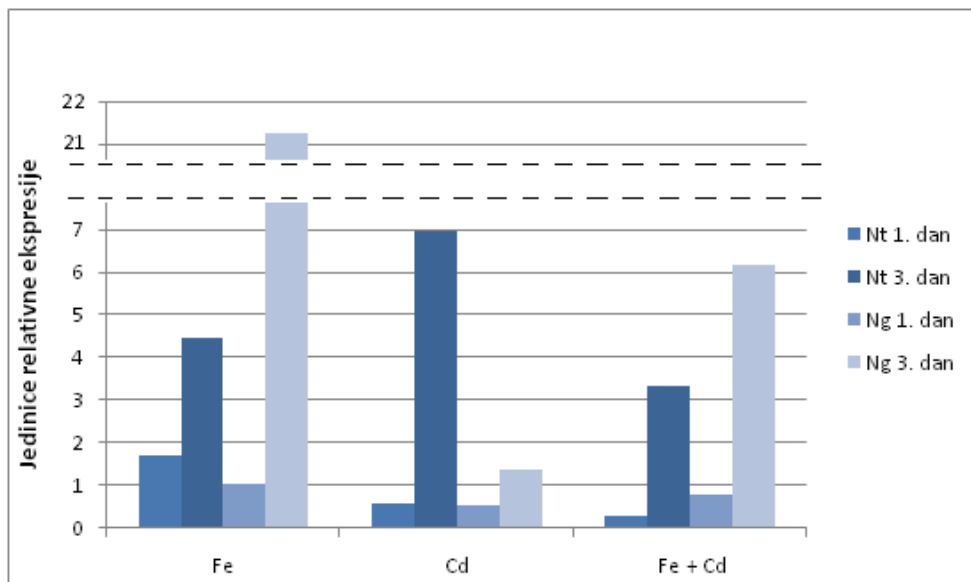
gdje je E - efikasnost reakcije PCR za umnažanje gena,  $\Delta C_T$  – razlika između vrijednosti  $C_T$  za kontrolu i uzorak.

#### **4.7. Određivanje promjene ekspresije gena *NAS* i *NRAMP-1* kao odgovora na tretman teškim metalima Fe i Cd metodom *real-time* PCR**

Dobiveni rezultati promjene ekspresije gena *NAS* i *NRAMP-1* prvog i trećeg dana izloženosti teškim metalima u odnosu na kontrolu prikazani su grafički u obliku histograma. Kako bi se usporedila razina ekspresije dva promatrana gena kao odgovor na Fe i Cd između vrsta *N. tabacum* i *N. glauca*, rezultati su prikazani zajedno (Slika 17. i 18.). Utvrđeno je da biljke obje vrste izložene Fe, Cd i kombinaciji oba metala prvog dana tretmana pokazuju malu promjenu ekspresije gena *NAS* i *NRAMP-1* u odnosu na kontrolu. Također, ekspresija oba gena u odnosu na kontrolu prvog dana tretmana slična je kod obje vrste biljaka. Općenito, trećeg dana tretmana metalima dolazi do izraženijih promjena u ekspresiji gena *NAS* i *NRAMP-1* u odnosu na kontrolu kod obje biljne vrste. Ekspresija gena *NAS* u odnosu na kontrolu trećeg dana tretmana u vrste *N. glauca* znatno je viša nego njegova ekspresija u vrste *N. tabacum* za biljke tretirane Cd i kombinacijom oba metala. Gen *NRAMP-1* znatno je jače ekspresiran trećeg dana tretmana u odnosu na kontrolu u vrste *N. glauca* nego u vrste *N. tabacum* za biljke tretirane Fe i kombinacijom oba metala. Međutim, trećeg dana tretmana njegova je ekspresija u odnosu na kontrolu viša u vrste *N. tabacum* nego u vrste *N. glauca* za biljke tretirane Cd.



Slika 17. Usporedba promjene ekspresije gena *NAS* u odnosu na kontrolu prvog i trećeg dana izloženosti teškim metalima između vrsta *N. tabacum* i *N. glauca*. Nisu prikazane vrijednosti na ordinati od 7 do 30 zbog toga što je vrijednost uzorka Ng 3. dan tretmana Fe + Cd bitno viša od ostalih.



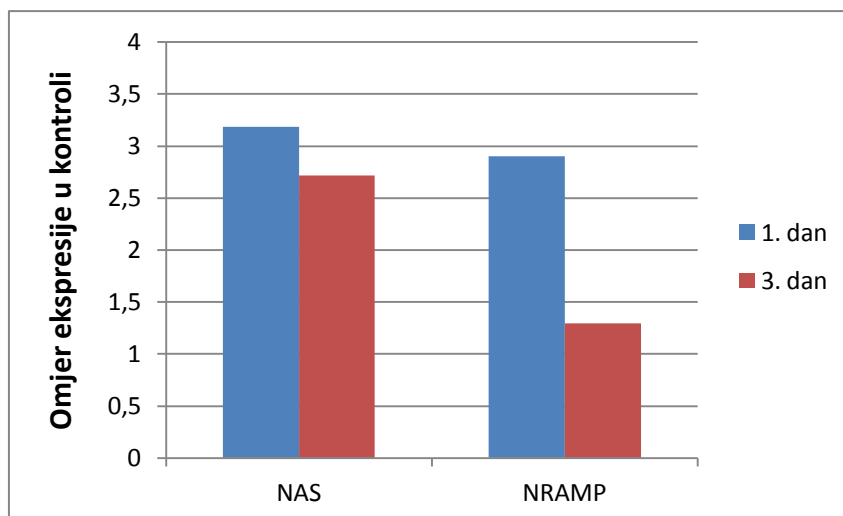
Slika 18. Usporedba promjene ekspresije gena *NRAMP-1* u odnosu na kontrolu prvog i trećeg dana izloženosti teškim metalima između vrsta *N. tabacum* i *N. glauca*. Nisu prikazane vrijednosti na ordinati od 7 do 21 zbog toga što je vrijednost uzorka Ng 3. dan tretmana Fe bitno viša od ostalih.

#### 4.8. Određivanje razlike u konstitutivnoj ekspresiji gena *NAS* i *NRAMP-1* između vrsta *N. tabacum* i *N. glauca*

Izračunata je i ekspresija gena *NAS*, odnosno *NRAMP-1* u kontrolnim biljkama vrste *N. glauca* u odnosu na njihovu ekspresiju u kontrolnim biljkama *N. tabacum* prema formuli:

$$\frac{\frac{E_{Nt\ aktin}^{Ct(Nt\ aktin)}}{E_{Nt\ NAS}^{Ct(Nt\ NAS)}}}{\frac{E_{Ng\ aktin}^{Ct(Ng\ aktin)}}{E_{Ng\ NAS}^{Ct(Ng\ NAS)}}}$$

Omjer ekspresije gena u kontrolnim biljkama prikazan je na slici 19. Uočeno je da biljke vrste *N. glauca* imaju konstitutivno višu ekspresiju oba gena u odnosu na biljke vrste *N. tabacum*, te se taj rezultat pokazao i prvog i trećeg dana eksperimenta.



Slika 19. Ekspresija gena *NAS* i *NRAMP-1* u kontrolnim biljkama *N. glauca* u odnosu na kontrolne biljke *N. tabacum*.

## 5. Rasprava

### 5.1. Učinak Fe i Cd na vrste *N. glauca* i *N. tabacum*

U ovom radu procijenjena je tolerancija vrste *N. glauca* na teške metale Fe i Cd u odnosu na njoj srodnu vrstu *N. tabacum* na temelju većeg broja istraživanih pokazatelja. Dio tih pokazatelja: klijavost, inhibicija rasta korijena, inhibicija rasta izdanaka i pad biomase istražen je nakon tretmana klijanaca obje vrste s Fe i Cd. Klijavost obje vrste nije bila smanjena uslijed tretmana Fe i Cd. Utvrđeno je da klijanci obje vrste tretirani sa Fe u koncentracijama višim od 300  $\mu\text{M}$  pokazuju inhibiciju rasta korijena (Slika 2.) i smanjenje biomase (Slika 3.), dok uslijed tretmana sa Fe nije došlo do inhibicije rasta izdanaka. Klijanci vrste *N. glauca* tretirani Cd nisu pokazali inhibiciju rasta korijena niti na jednoj koncentraciji, dok je kod vrste *N. tabacum* tretirane Cd u koncentraciji od 15  $\mu\text{M}$  i 20  $\mu\text{M}$  uočena značajna inhibicija rasta korijena u odnosu na tretman nižim koncentracijama Cd (Slika 4.). Iako su istraživane koncentracije Fe imale sličan učinak na obje vrste, Cd u koncentracijama od 10  $\mu\text{M}$  i više uzrokovao je značajno smanjenje dužine korijena vrste *N. tabacum* u odnosu na vrstu *N. glauca*. Dobiveni rezultati pokazuju da je vrsta *N. glauca* tolerantnija na Cd.

### 5.2. Procjena tolerancije na Fe i Cd vrsta *N. glauca* i *N. tabacum*

Vrsta *N. glauca* ima sposobnost rasta na tlu onečišćenom teškim metalima uz mogućnost akumulacije metala u korijenski sustav koji se ne prenose u izdanak u većim količinama (Barazani i sur., 2004.), a to ju čini tolerantnom na teške metale, ali ne i hiperakumulatorom teških metala. To je potvrđeno i u našem istraživanju rezultatima analize sadržaja metala u korijenu i izdancima klijanaca *N. glauca* i *N. tabacum* tretiranih Fe i Cd (Slika 6.). Vrijednost omjera količine metala u izdanku u odnosu na korijen kod vrsta *N. glauca* i *N. tabacum* potvrđuje da nijedna od njih nije hiperakumulator jer je taj omjer manji od jedan, to jest količina metala je kod obje vrste veća u korijenu nego u izdanku. Međutim, usporedba ovih omjera pokazuje da, u odnosu na *N. tabacum*, *N. glauca* ima do tri puta veću sposobnost nakupljanja metala u nadzemnim dijelovima biljke što ide u prilog prijašnjim saznanjima o njoj kao potencijalnom akumulatoru teških metala.

Nadalje, u provedenim eksperimentima istražena je sposobnost vrste *N. glauca* da podnese stresne uvjete prisutnosti Fe i Cd u odnosu na *N. tabacum*. Iz literature je poznato da *N. glauca* pri rastu na tlu onečišćenom teškim metalima ne pokazuju simptome stresa kao što

su kloroza, uvenuće i nekroza (Barazani i sur., 2004.). Odsutnost kloroze kod vrste *N. glauca* usmjerila je naše istraživanje prema procjeni učinka Fe i Cd na učinkovitost fotosinteze. Budući da Cd oštećuje fotosisteme I i II koji su ključni u fotosintezi, uzrokujući simptom kloroze, učinkovitost fotosinteze je bitan pokazatelj moguće veće tolerancije na Cd vrste *N. glauca* u odnosu na *N. tabacum*. Dobivene vrijednosti maksimalne učinkovitosti fotosistema II za obje vrste bile su očekivano znatno manje od uobičajenih vrijednosti za autotrofne biljke (0,7-0,8) (Schreiber i sur., 1994.) budući da su biljke uzgajane na hranjivim podlogama MS sa saharozom kao izvorom ugljika. Iako se fotosinteza u biljkama istraživanim u ovom radu ne odvija s uobičajenom učinkovitošću jer su biljke djelomično heterotrofne, ona se svejedno odvija pa je moguće mjerenje pokazatelja fotosinteze.

Svi istraživani pokazatelji fotosinteze pružaju dokaz da ovaj životni proces kod vrste *N. glauca* uopće nije pogođen tretmanom biljaka s Cd. Naime, *N. glauca* tretirana tim metalom nije pokazala promjene u maksimalnoj učinkovitosti PS II, efektivnoj učinkovitosti PS II, stopi prijenosa elektrona i fotokemijskom gašenju u odnosu na kontrolu (Slike 7., 8., 9. i 10.) što govori da komponente fotosintetskog aparata nisu oštećene s Cd. Štoviše, u tretmanu Cd i Fe dolazi do značajnog porasta vrijednosti pokazatelja fotosinteze u odnosu na kontrolne biljke i biljke *N. tabacum*. To se može objasniti time da Fe omogućava veću sintezu klorofila (sudjeluje u biosintezi klorofila). Odsutnost oštećenja fotosistema vrste *N. glauca* s Cd upućuje na postojanje mehanizama tolerancije na ovaj metal te njegove moguće akumulacije. Iz literature je poznato kako biljke koje akumuliraju Cd imaju učinkovit sustav za odjeljivanje tog metala unutar fotosintetski aktivnih dijelova biljke, kako bi onemogućile njegovo štetno djelovanje na fotosintetski aparat (Rascio i Navari-Izzo, 2011.). U svjetlu ovih činjenica, *N. glauca* ima potencijal za pojačanu akumulaciju Cd jer je razvila učinkovit način zaštite svojih fotosintetskih sustava.

S druge strane, pad vrijednosti parametara fotosinteze u vrste *N. tabacum* tretirane Cd govori o osjetljivosti fotosintetskog aparata na Cd što je dodatno došlo do izražaja na tretmanu Cd i Fe gdje su vrijednosti pokazatelja učinkovitosti fotosinteze statistički značajno manje od onih u kontroli. Dakle, dodatak Fe nije kao kod vrste *N. glauca* doveo do povećanih vrijednosti parametara fotosinteze zbog vjerojatno prevelikog oštećenja fotosistema kadmijem budući da *N. tabacum* nije tolerantna na Cd.

Time je u ovom radu utvrđeno da vrsta *N. glauca* ima veću sposobnost zaštite biomolekula fotosistema od štetnog utjecaja Cd od vrste *N. tabacum*.

### 5.3. Uloga gena *NAS* i *NRAMP-1* u mehanizmima tolerancije i akumulacije Fe i Cd kod vrste *N. glauca*

Po uzoru na dosadašnja istraživanja koja se zasnivaju na činjenici da mehanizam tolerancije počiva na različitoj ekspresiji gena prisutnih u svim biljnim vrstama, dio ovog rada usmjeren je i na analizu ekspresije gena *NAS* i *NRAMP-1* koji su povezani s tolerancijom na teške metale i njihovom akumulacijom. Gen *NAS* je već ranije identificiran kao najizraženije eksprimiran gen u hiperakumulatorima u odnosu na nehiperakumulatore (Weber i sur., 2004.), dok je pojačana ekspresija gena *NRAMP-1* kod transgenične vrste *A. thaliana* omogućila povišenu toleranciju na inače toksične koncentracije Fe (Curie i sur., 2000.) U ovom radu je uspoređena ekspresija ovih gena između vrste *N. glauca* i srodne vrste *N. tabacum*, u kontrolnim uvjetima te u tretmanu teškim metalima Fe i Cd. Rezultati istraživanja potvrdili su važnost uloge gena *NAS* i moguće važnosti uloge gena *NRAMP-1* u mehanizmima tolerancije i akumulacije Fe i Cd kod vrste *N. glauca*.

Dobiveni rezultat konstitutivno više razine ekspresije oba istraživana gena kod vrste *N. glauca* u odnosu na *N. tabacum* (Slika 19.) govori o njoj kao vrsti tolerantnoj na metale zbog veće mogućnosti njihove detoksikacije, a konstitutivno viša ekspresija gena *NAS* koja je već utvrđena kod hiperakumulatora (Weber i sur., 2004.) ide u prilog njenom potencijalu za fitoremedijaciju.

Kod obje istraživane vrste ekspresija oba gena se nije bitno promijenila prvog dana tretmana u odnosu na kontrolu što se može objasniti time da je vremensko razdoblje od jednog dana nedovoljno za značajniji prijenos metala iz korijena u izdanak gdje bi oni potaknuli promjenu ekspresije gena. Trećeg dana tretmana uslijed povećanja količine metala u izdancima obje biljne vrste dolazi do izraženijih promjena u ekspresiji oba istraživana gena (Slike 17. i 18.).

Gen *NAS* jače je eksprimiran u listovima biljne vrste *N. glauca* trećeg dana svih tretmana u odnosu na kontrolu, s time da kod tretmana kombinacijom metala dolazi do sinergističkog učinka na povećanje ekspresije navedenog gena. Taj rezultat utoliko je važniji kad se uzme u obzir raniji rezultat da *N. glauca* već konstitutivno ima pojačanu ekspresiju tog gena u odnosu na *N. tabacum*. Dobiveni rezultati objašnjavaju se time da je vrsta *N. glauca* na tretman metalima odgovorila povećanjem količine proteina *NAS* koje dovodi do povećane sinteze helatora metala NA. Budući da je ekspresija ovog gena bila značajno viša kod biljaka vrste *N. glauca* tretiranih s Cd i s oba metala nego kod biljaka vrste *N. tabacum* može se zaključiti o važnosti njegove uloge u mehanizmu detoksikacije ovih teških metala kod vrste

*N. glauca*. Ovaj rezultat pokazuje kako je *N. glauca* i na razini ekspresije gena bolje pripremljena za suzbijanje stresa uzrokovanog teškim metalima.

Izrazito pojačana ekspresija gena *NRAMP-1* u listovima vrste *N. tabacum* tretirane Cd vjerojatno je posljedica pojave nedostatka Fe izazvanog Cd, opisane u poglavlju 1.1.2. Tome u prilog govori i njegova smanjena ekspresija kod vrste *N. tabacum* tretirane kombinacijom metala u odnosu na tretman samo Cd jer je zbog dodatnog Fe u kombiniranom tretmanu učinak nedostatka Fe manji. Smatra se da Cd za ulazak u biljku koristi iste transportere kao Fe (Yoshihara i sur., 2006.) pa bi posljedični manjak Fe u listovima vrste *N. tabacum* mogao potaknuti pojačanu ekspresiju gena *NRAMP-1* koji kodira za transporter Fe čija je lokalizacija još neutvrđena, ali se pretpostavlja da se nalazi u vakuolarnoj membrani (Curie i sur., 2000.). Ukoliko je transporter lokaliziran u vakuolarnoj membrani razlog povećanja ekspresije mogao bi biti u svrhu odjeljivanja Fe koje je naglo unešeno u stanice pomoću nekog drugog, ovdje neistraživanog transportera. Ukoliko se on nalazi u membrani stanice, moguće je da je njegova ekspresija pojačana u svrhu unosa Fe u stanice lista. Povećanje ekspresije gena *NRAMP-1* kod vrste *N. glauca* tretirane Fe i kombinacijom oba metala može ići u prilog objema teorijama, s time da bi prva navedena teorija, već predložena u drugim istraživanjima (Curie i sur., 2000.), značila njegovu bitnu ulogu u detoksikaciji teških metala. Zbog toga bi bilo važno utvrditi subcelularnu lokalizaciju ovog transportera u daljnjim istraživanjima.

Iako je ovo istraživanje tek začetak proučavanja kompleksne genske osnove koja vrsti *N. glauca* omogućava toleranciju na teške metale i potencijalnu akumulaciju istih, ono daje bitne naznake za daljnja istraživanja ekspresije cijelog seta gena čije bi razumijevanje omogućilo stvaranje transgenične biljke ove vrste poboljšanih svojstava tolerancije i/ili hiperakumulacije teških metala. Uzimajući u obzir da vrsta *N. glauca* već posjeduje veliki fitoremedijacijski potencijal, istraživanje ove problematike moglo bi osigurati idealno rješenje problema zagađenja okoliša teškim metalima putem fitoremedijacije.

## 6. Zaključci

1. Vrsta *N. glauca* tolerantnija je na teški metal kadmij u odnosu na *N. tabacum* jer nije pokazala inhibiciju rasta korijena niti smanjenje vrijednosti parametara fotosinteze što upućuje na postojanje mehanizama detoksikacije i zaštite fotosintetskog aparata od štetnog utjecaja Cd.
2. Vrijednost omjera količine metala u izdanku u odnosu na korijen kod vrsta *N. glauca* i *N. tabacum* potvrđuje da niti jedna vrsta nije hiperakumulator. Usporedba ovih omjera pokazuje da *N. glauca* ima do tri puta veću sposobnost nakupljanja metala u nadzemnim dijelovima biljke što govori o njoj kao potencijalnom akumulatoru teških metala.
3. Konstitutivno viša razina ekspresije gena *NAS* i *NRAMP-1* kod vrste *N. glauca* u odnosu na *N. tabacum* pruža dokaz da je i bez prisutnosti teških metala *N. glauca* bolje pripremljena za suzbijanje stresa uzrokovanog teškim metalima na bazalnoj razini ekspresije gena.
4. Kao odgovor na tretman kombinacijom Fe i Cd, *N. glauca* pokazuje višu razinu inducirane ekspresije gena *NAS* i *NRAMP-1* što dodatno ide u prilog njezinoj sposobnosti akumulacije metala.
5. Vrsta *N. glauca* bolje podnosi uvjete stresa uzrokovanog Cd na fiziološkoj razini te pokazuje sličan genski profil kao hiperakumulatorske biljne vrste što svjedoči o njenom fitoremedijacijskom potencijalu. To potvrđuje važnost daljnjih istraživanja ove problematike u svrhu stvaranja transgenične biljke *N. glauca* poboljšanih svojstava kako bi se riješio problem zagađenja okoliša teškim metalima putem fitoremedijacije.



## **7. Zahvala**

*Najiskrenije hvala našim mentoricama prof. dr. sc. Mirjani Pavlica i mag. mol. biol. Kristini Majsec za svo prenijeto znanje, pomoć i korisne savjete koji su uvelike pripomogli nastanku ovog rada, a ponajviše za podršku i stečeno iskustvo koje ćemo ponijeti u daljnji rad.*

*Posebno hvala Kristini na strpljenju, brizi i prijateljskom pristupu te na svim lijepim trenucima.*

## 8. Popis literature

Barazani, O., Sathiyamoorthy, P., Manandhar, U., Vulkan, R., Golan-Goldhirsh, A., Heavy metal accumulation by *Nicotiana glauca* Graham in a solid waste disposal site., *Chemosphere* **54** (2004) 867–872

Cailliatte, R., Lapeyre, B., Briat, J. F., Mari, S., Curie, C., The NRAMP6 metal transporter contributes to cadmium toxicity., *Biochemical Journal* **422** (2009) 217–228

Conte, S. S., Walker, E. L., Transporters contributing to iron trafficking in plants., *Molecular Plant* **4** (2011) 464–476

Curie, C., Alonso, J. M., Le Jean, M., Ecker, J. R., Briat, J. F., Involvement of NRAMP1 from *Arabidopsis thaliana* in iron transport., *Biochemical Journal* **347** (2000) 749–755

Douchkov, D., Gryczka, C., Stephan, U. W., Hell, R., Baumlein, H., Ectopic expression of nicotianamine synthase genes results in improved iron accumulation and increased nickel tolerance in transgenic tobacco., *Plant, Cell and Environment* **28** (2005) 365–374

Gisbert, C., Ros, R., De Haro, A., Walker, D. J., Bernal, M. P., Serrano, R., Navarro-Avino, J., A plant genetically modified that accumulates Pb is especially promising for phytoremediation., *Biochemical and Biophysical Research Communications* **303** (2003) 440–445

Hell, R., Stephan, U. W., Iron uptake, trafficking and homeostasis in plants., *Planta* **216** (2003) 541–551

Hodoshima, H., Enomoto, Y., Shoji, K., Shimada, H., Goto, F., Yoshihara, T., Differential regulation of cadmium-inducible expression of iron-deficiency-responsive genes in tobacco and barley., *Physiologia Plantarum* **129** (2007) 622–634

Kirkham, M. B., Cadmium in plants on polluted soils: Effects of soil factors, hyperaccumulation, and amendments., *Geoderma* **137** (2006) 19–32

Maestri, E., Marmiroli, M., Visioli, G., Marmiroli, N., Metal tolerance and hyperaccumulation: Costs and trade-offs between traits and environment., *Environmental and Experimental Botany* **68** (2010) 1–13

Martinez, M., Bernal, P., Almela, C., Velez, D., Garcia-Agustin, P., Serrano, R., Navarro-Avino, J., An engineered plant that accumulates higher levels of heavy metals than *Thlaspi caerulescens*, with yields of 100 times more biomass in mine soils., *Chemosphere* **64** (2006) 478–485

Murashige, T., Skoog, F., A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures., *Physiologia Plantarum* **15** (1962) 473–497

Pffaf, M. W., A new mathematical model for relative quantification in real time RT-PCR., *Nucleic Acids Research* **29** (2001) 2002–2007

Rascio, N., Navari-Izzo, F., Heavy metal hyperaccumulating plants: How and why do they do it? And what makes them so interesting?, *Plant Science* **180** (2011) 169–181

Schreiber, U., Bilger, W. Neubauer, C. Chlorophyll fluorescence as a non-intrusive indicator for rapid assessment of in vivo photosynthesis. Str. 49–70. U: Schultz E. D. i Caldwell, M.M., Ecophysiology of Photosynthesis. Ecological Studies 100. (1994) Springer, Berlin, Germany.

Suzuki, N., Koizumi, N., Sano, H., Screening of cadmium-responsive genes in *Arabidopsis thaliana*., *Plant, Cell and Environment* **24** (2001) 1177–1188

Thomine, S., Wang, R., Ward, J. M., Crawford, N. M., Schroeder, J. I., Cadmium and iron transport by members of a plant metal transporter family in *Arabidopsis* with homology to *Nramp* genes., *PNAS* **97** (2000) 4991–4996

Verbruggen, N., Hermans, C., Schat, H., Molecular mechanisms of metal hyperaccumulation in plants., *New Phytologist* **181** (2009) 759–776

Weber, M., Harada, E., Vess, C., Roepenack-Lahaye, E., Clemens, S., Comparative microarray analysis of *Arabidopsis thaliana* and *Arabidopsis halleri* roots identifies nicotianamine synthase, a ZIP transporter and other genes as potential metal hyperaccumulation factors., *The Plant Journal* **37** (2004) 269-281

Yoshihara, T., Hodoshima, H., Miyano, Y., Shoji, K., Shimada, H., Goto, F., Cadmium inducible Fe deficiency responses observed from macro and molecular views in tobacco plants., *Plant Cell Reports* **25** (2006) 365–373

<http://www.bioinformatics.nl>

## 9. Sažetak

Ines Kralj i Petra Nižić

### **Molekularna osnova tolerancije na teške metale u vrste *Nicotiana glauca* Graham**

Zagađenje okoliša teškim metalima je rastući ekološki i zdravstveni problem osobito jer još uvijek ne postoji dovoljno učinkovita, jeftina i široko primjenjiva metoda njihovog uklanjanja. Moguće rješenje ovog problema je fitoremedijacija, odnosno upotreba biljnih vrsta koje prirodno žive na tlima onečišćenim teškim metalima, imaju sposobnost hiperakumulacije metala i pri tome ne pokazuju simptome fitotoksičnosti što se pripisuje raznim mehanizmima obrane. Biljna vrsta *Nicotiana glauca* Graham tolerantna je na teške metale i posjeduje brojne osobine pogodne za fitoremedijaciju. Stoga je cilj ovog rada bio istražiti molekularnu osnovu tolerancije vrste *N. glauca* na teške metale Fe i Cd. Tolerancija vrste *N. glauca* procijenjena je na temelju više istraživanih pokazatelja u odnosu na njoj srodnu vrstu *N. tabacum*. Ispitani su: klijavost, inhibicija rasta korijena i izdanka te smanjenje biomase kao i učinkovitost fotosinteze u listovima metodom saturacijskog pulsa. Vrsta *N. glauca* tretirana Cd ne pokazuje inhibiciju rasta korijena niti smanjenje parametara fotosinteze. Analiza sadržaja Fe i Cd u izdanku i korijenu pokazala je da *N. glauca* ima do tri puta veću sposobnost nakupljanja metala u izdanku u odnosu na korijen nego *N. tabacum*. Analiza ekspresije gena *NAS* i *NRAMP-1* povezanih s tolerancijom na teške metale provedena je metodom lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu. Usporedba razine ekspresije ovih gena između vrsta *N. glauca* i *N. tabacum* pokazala je povišenu konstitutivnu ekspresiju oba gena kod vrste *N. glauca*, a kao odgovor na tretman Fe i Cd također je došlo do jače indukcije ekspresije oba gena kod *N. glauca*. Dobiveni rezultati pokazuju da je *N. glauca* u odnosu na *N. tabacum* tolerantnija na Cd zbog sposobnosti detoksikacije metala, zaštite fotosintetskog aparata i suzbijanja stresa uzrokovanog teškim metalima na razini konstitutivne i inducirane ekspresije gena *NAS* i *NRAMP-1* što pridonosi njezinom potencijalu kao akumulatoru metala. Ovaj rad daje bitne naznake za daljnja istraživanja ekspresije gena važnih za toleranciju i akumulaciju teških metala, a u svrhu stvaranja transgenične vrste *N. glauca* poboljšanih svojstava tolerancije i/ili hiperakumulacije kao idealnog rješenja problema zagađenja okoliša teškim metalima putem fitoremedijacije.

**Ključne riječi:** teški metali, fitoremedijacija, *Nicotiana glauca* Graham, tolerancija

## 10. Summary

Ines Kralj and Petra Nižić

### **Molecular basis of tolerance to heavy metals in species *Nicotiana glauca* Graham**

Pollution of the environment caused by heavy metals is a growing ecological and health problem especially since sufficiently effective, inexpensive and widely applicable method of their removal still does not exist. A possible solution for this problem is phytoremediation, i.e. the removal of heavy metals via plant species which naturally live in soils contaminated with heavy metals, have the ability to hyperaccumulate them and at the same time do not exhibit any symptoms of phytotoxicity. Plant species *Nicotiana glauca* Graham is tolerant to heavy metals and possesses many qualities suitable for phytoremediation. The aim of this study was to investigate the molecular basis of tolerance to heavy metals, Fe and Cd, in species *N. glauca*. Tolerance was estimated based on the several indicators examined in comparison to related species *N. tabacum*. Examined indicators were: germinability, inhibition of root and shoot growth and decrease of biomass as well as the efficiency of photosynthesis in the leaves. *N. glauca* treated with Cd does not show inhibition of root growth or decrease in parameters of photosynthesis. Analysis of the content of Fe and Cd in shoot and root showed that *N. glauca* has up to three times greater ability to accumulate metals in shoots compared to the roots than *N. tabacum*. Analysis of gene expression of *NAS* and *NRAMP-1* linked with tolerance to heavy metals was conducted by polymerase chain reaction in real time. Comparison of gene expression levels between species *N. glauca* and *N. tabacum* showed elevated constitutive expression of both genes in *N. glauca* and there was also a strong induction of expression of both genes in *N. glauca* in response to treatment with Fe and Cd. The results show that *N. glauca* is more tolerant to Cd than *N. tabacum* due to the ability of metal detoxification, protection of the photosynthetic apparatus and ability to suppress the stress caused by heavy metals on the level of both constitutive and inducible gene expression of *NAS* and *NRAMP-1* which contributes to its potential as a heavy metal accumulator. This work provides important indications for further research of expression of genes important for heavy metal tolerance and accumulation. Creating a transgenic species of *N. glauca* with improved characteristics of tolerance and/or hyperaccumulation would be an ideal solution to the problem of environmental pollution caused by heavy metals via phytoremediation.

**Key words:** heavy metals, phytoremediation, *Nicotiana glauca* Graham, tolerance