

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Sveučilište u Dubrovniku
Institut Ruđer Bošković
Poslijediplomski interdisciplinarni sveučilišni studij Molekularne bioznanosti

Ida Linić

**ULOGA SPECIJALIZIRANIH METABOLITA U ODGOVORU
KUPUSNJAČA (Brassicaceae) NA SOLNI STRES**

Doktorska disertacija

Osijek, 2021.

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Sveučilište u Dubrovniku
Institut Ruđer Bošković
Poslijediplomski interdisciplinarni sveučilišni studij
Molekularne bioznanosti

Ida Linić

**ULOGA SPECIJALIZIRANIH METABOLITA U ODGOVORU KUPUSNJAČA
(Brassicaceae) NA SOLNI STRES**

**Doktorska disertacija predložena je Sveučilišnom Vijeću za poslijediplomske studije u svrhu
stjecanja akademskog stupnja doktora znanosti na Poslijediplomskom interdisciplinarnom
sveučilišnom studiju Molekularne bioznanosti – modul biologija biljaka**

Osijek, 2021.

Doktorska disertacija izrađena je u Laboratoriju za kemijsku biologiju Zavoda za molekularnu biologiju Instituta Ruđer Bošković pod mentorstvom dr.sc. Branke Salopek Sondi. Laboratorijska istraživanja financirana su projektom Hrvatske zaklade za znanost IP-2014-09-4359 "Fitohormoni u abiotskom stresu kupusnjača: mehanizmi tolerancije i primjena", 2015.-2019. (voditeljica dr.sc. Branka Salopek Sondi). Određeni eksperimenti realizirani su u inozemnim laboratorijima u Češkoj i Španjolskoj zahvaljujući Erasmus+ programu. Pozicija doktoranda financirana je sredstvima Hrvatske zaklade za znanost - Razvoj karijera mladih istraživača – izobrazba novih doktora znanosti, 2016-2021.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Sveučilište u Dubrovniku
Institut Ruđer Bošković
Poslijediplomski interdisciplinarni sveučilišni
studij Molekularne bioznanosti
Znanstveno područje: Prirodne znanosti
Znanstveno polje: Biologija

Doktorska disertacija

ULOGA SPECIJALIZIRANIH METABOLITA U ODGOVORU KUPUSNJAČA (*Brassicaceae*) NA SOLNI STRES

Ida Linić

Disertacija je izrađena u: Laboratorij za kemijsku biologiju, Zavod za molekularnu biologiju, Institut Ruđer Bošković

Mentorica: dr.sc. Branka Salopek Sondi, znanstveni savjetnik u trajnom zvanju

Kratki sažetak doktorske disertacije:

Uloga specijaliziranih metabolita, posebno fenolnih spojeva istražena je u odgovoru kupusnjača (raštike, bijelog kupusa i kineskog kupusa) na solni stres. Kao posljedica solnog stresa dolazi do inhibicije rasta korijena i biomase klijanaca, povećanja razine prolina, omjera Na^+/K^+ te ROS čestica kao glavnih markera stresa ovisno o stupnju tolerancije vrsta na stres; najtolerantnija vrsta je raštika, zatim bijeli kupus te najosjetljiviji kineski kupus. Solni stres utječe na fenilpropanoidni biosintetski put na razini ekspresije gena (npr. povećava razinu transkriptata *PAL*, *COMT*, *CHI*, *F3'H*) kao i aktivnosti enzima (npr. povećava aktivnost *PAL*, *C4H*, *CHS*) te posljedično uzrokuje promjene u akumulaciji polifenolnih spojeva. Tolerantnije vrste uslijed stresa akumuliraju veće količine fenolnih spojeva (flavonoida, flavanola i fenolnih kiselina) u odnosu na osjetljivije. Od fenolnih kiselina, hidroksicimetne kiseline, posebno FA i SiA su značajnije prisutne u tolerantnijih vrsta u stresu tj. raštike i bijelog kupusa u odnosu na kineski kupus, dok se SA (hidroksibenzojeva kiselina) najznačajnije smanjuje u kineskom kupusu u odnosu na ostale. Pred-tretman kineskog kupusa, kao najosjetljivije vrste, sa SA i FA pokazali su jasan pozitivan učinak na biljke uslijed solnog stresa tj. poboljšana je fotosintetska učinkovitost, sadržaj pigmenta, antioksidacijska aktivnost itd. Funkcionalna istraživanja na mutantama *A. thaliana* u genima za fenilpropanoidni put upućuju na njihovu ulogu u odgovoru biljaka na solni stres.

Broj stranica: 158; **Broj slika:** 47; **Broj tablica:** 23; **Broj literaturnih navoda:** 182

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: Brassicaceae, solni stres, specijalizirani metaboliti, tolerancija

Datum obrane: 18. veljače 2021.

Stručno povjerenstvo za obranu:

1. izv. prof. dr. sc. Sandra Radić Brkanac, izvanredna profesorica Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, predsjednica;
2. prof.dr.sc. Vera Cesar, redoviti profesor u trajnom zvanju, Odjel za biologiju, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, član
3. prof.dr.sc. Miroslav Lisjak, izvanredni profesor, Fakultet agrobiotehničkih znanosti Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
4. dr. sc. Brankica Mravinac, viši znanstveni suradnik, Institut Ruđer Bošković, Zagreb, zamjena

Disertacija je pohranjena u: Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici Zagreb, Ul. Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb; Gradskoj i sveučilišnoj knjižnici Osijek, Europska avenija 24, Osijek; Sveučilištu Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Trg sv. Trojstva 3, Osijek

BASIC DOCUMENTATION CARD

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek
University of Dubrovnik
Ruđer Bošković Institute
University Postgraduate Interdisciplinary Doctoral Study of
Molecular biosciences
Scientific Area: Natural Science
Scientific Field: Biology

PhD thesis

THE ROLE OF SPECIALIZED METABOLITES IN SALINITY STRESS RESPONSE IN *Brassica* CROPS (Brassicaceae)

Ida Linić

Thesis performed at: Laboratory for Chemical Biology, Division of Molecular Biology, Ruđer Bošković Institute

Supervisor: Branka Salopek Sondi, PhD, Senior Scientist

Short abstract:

The role of specialized metabolites, especially phenolic compounds, was investigated in the response of Brassicaceae (kale, white cabbage and Chinese cabbage) to salt stress. As a consequence of salt stress, root growth and seedling biomass are inhibited, proline levels, Na^+ / K^+ ratio and ROS are increased as the main markers of stress depending on the degree of stress tolerance of the species; the most tolerant variety is kale, followed by white cabbage and the most sensitive is Chinese cabbage. Salt stress affects the phenylpropanoid biosynthetic pathway at the level of gene expression (eg. increases the level of *PAL*, *COMT*, *CHI*, *F3'H* transcripts) as well as enzyme activity (eg. increases the activity of *PAL*, *C4H*, *CHS*) and consequently causes changes in the accumulation of polyphenolic compounds. Stress-tolerant species accumulate higher amounts of phenolic compounds (flavonoids, flavanols, and phenolic acids) compared to more sensitive ones. Of the phenolic acids, hydroxycinnamic acids, especially FA and SiA, are more significantly present in more tolerant species (kale and white cabbage) under stress compared to more sensitive Chinese cabbage, while SA (hydroxybenzoic acid) is most significantly reduced in Chinese cabbage than others. Pre-treatment of Chinese cabbage, as the most sensitive species, with SA and FA showed a clear positive effect on plants due to salt stress: improved photosynthetic efficiency, higher pigment content, higher antioxidant activity, etc. Functional studies on *A. thaliana* mutants in genes of phenylpropanoid pathway suggest their role in the response of plants to salt stress.

Number of pages: 158; **Number of figures:** 47; **Number of tables:** 23; **Number of references:** 182

Original in: Croatian

Key words: Brassicaceae, salt stress, specialized metabolites, tolerance

Date of the thesis defense: 18. February 2021.

Reviewers:

1. Sandra Radić Brkanac, PhD, Associate Professor, Faculty of Science, University of Zagreb, commission president
2. Vera Cesar, PhD, Full Professor, Department of Biology, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, member
3. Miroslav Lisjak, Associate Professor, Faculty of Agrobiotechnical Sciences, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, member
4. Brankica Mravinac, PhD, senior research associate, Ruđer Bošković Institute, Zagreb, substitute

Thesis deposited in: National and University Library in Zagreb, Ul. Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb; City and University Library of Osijek, Europska avenija 24, Osijek; Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Trg sv. Trojstva 3, Osijek

Veliko hvala mojoj mentorici, dr. sc. Branki Salopek Sondi, na pruženom povjerenju, vodstvu i svim savjetima tokom izrade ovog rada.

Hvala članovima ispitnog povjerenstva izv. prof. dr. sc. Sandri Radić Brkanac, prof. dr.sc. Veri Cesar i prof. dr. sc. Miroslavu Lisjaku na čitanju disertacije, savjetima i sugestijama.

Hvala dr. sc. Jiriu Gruzgu iz Prirodoslovno-matematičkog fakulteta, Palacký University Olomouc & Institute of Experimental Botany AS CR at Laboratory of Growth Regulators, Češka gdje sam uz njegovu pomoć odradila profiliranje fenolnih kiselina putem UPLC-MS/MS metode. Također, hvala i ostalom članovima iz Laboratorija na pristupačnosti i pomoći.

Hvala prof. Rosi Rivero Vargas iz CEBAS-CSIC centra "El Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura", Murcia, Španjolska, gdje sam mjerila razinu ekspresije gena i enzimatsku aktivnosti glavnih enzima fenilpropanoidnog puta biosinteze polifenolnih spojeva. Hvala i ostalim kolegama i kolegicama iz Laboratorija koji su me prihvatili kao svog člana te teške i nepovoljne uvjete u vrijeme pandemije učinili puno lakšim.

Hvala izv. prof. dr. sc. Sandri Radić Brkanac i dr. sc. Valeriji Vujčić Bok na pomoći oko biokemijskih analiza. Hvala dr. sc. Selmi Mlinarić na mjerenjima fotosinteze.

Hvala svim članovima iz LKB-a na savjetima i podršci te svim zajednički trenucima i druženjima.

Hvala mojim roditeljima, sestri i svim meni dragim ljudima na podršci, potpori, nadi, svim savjetima te riječima ohrabrenja i podrške u trenucima kada je bilo teško.

Ida

POPIS KRATICA

ABG	askorbigen
Acs-GSH	askorbat glutation
ACT	aktin
ANOVA	engl. <i>Analysis of variance</i> – analiza varijance
ANS	antocijanidin sintaza
AO	askorbat oksidaza
APX	askorbat peroksidaza
Asc	askorbinska kiselina
ATP	adenozin trifosfat
B1	tiamin
B2	riboflavin
B3	nikotinska kiselina, niacin
B5	pantotenska kiselina
B6	piridoksin
B7	biotin
B9	folna kiselina
BA	benzojeva kiselina
Ba	barij
BA2H	benzoil-2-hidroksilaza
BK	bijeli kupus
BSA	engl. <i>Bovine Serum Albumin</i>
Ca	kalcij
CaA	kava kiselina
CAE	ekvivalent kava kiseline
CAL1	cinamil alkohol dehidrogenaza 1
CAL2	cinamil alkohol dehidrogenaza 2
CAT	katalaza
CCoAOMT	kafeoil-CoA 3-O-metil transferaza

CE	ekvivalent katehina
C4H	cinamat-4-hidroksilaza
C3H	cinamat-3-hidroksilaza
CHI	halkon izomeraza
CHS	halkon sintaza
4CL	4-kumarat koenzim A ligaza
COMT	kava kiselina 3-O-metiltransferaza
Cu	bakar
DCF	2,7-diklorofluorescein
DCHF-DA	2,7-diklorofluorescein diacetat
DHA	dehidro askorbat
DHAR	dehidroaskorbat reduktaza
DHE	dihidroetidij
DMACA	<i>p</i> -dimetilaminocinamaldehyd
DNA	deoksiribonukleinska kiselina
DPPH [•]	2,2-difenil-1-pikril-hidrazil
DTT	ditiotreitol
EC	električna vodljivost
EDTA	etilendiamintetraoctena kiselina
ETC	engl. <i>The electron transport chain</i> – transportni lanac elektrona
F1	slobodne fenolne kiseline
F3	kisela hidroliza
F4	alkalna hidroliza
FA	ferulinska kiselina
FC	Folin-Ciocalten reagens
Fe	željezo
F3H	flavanon-3-hidroksilaza
F3'H	flavonoid-3'-hidroksilaza
F5H	ferulin-5-hidroksilaza
F. KIS.	fenolne kiseline

FLAV.	flavonoidi
FLS	flavonol sintaza
FRAP	engl. <i>Ferric Reducing Antioxydant Power</i>
F_v/F_m	maksimalni kvantni prinos fotosinteze
GaA	galna kiselina
GAE	ekvivalent galne kiseline
GLC	glutamat cistein ligaza
GLUK	glukoziolati
GPX	glutation peroksidaza
GR	glutation reduktaza
GSH	glutation
GST	glutation-S-transferaza
4-HBA	4-hidroksibenzojeva kiselina
HBA	hidroksibenzojeve kiseline
HCA	hidroksicimetne kiseline
HO1	hem oksigenaza 1
H_2O_2	vodikov peroksid
HR-ICP-MS	masena spektrometrija s induktivno spregnutom plazmom visoke rezolucije
ICS	izo-korizmat sintaza
IPL	izo-korizmat-piruvat liaza
KAR	karotenoidi
KCN	kalijev cijanid
KK	kineski kupus
L-Phe	L- fenilalanin
MCB	monoklorbiamin
MDHA	mono-dehidro-askorbatni radikal
MDHAR	monodehidroaskorbat reduktaza
Mg	magnezij
Mn	mangan

mRNA	gasnička ribonukleinska kiselina
NADPH	nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
NQOR1	NAD(P)H kinon-oksidoireduktaza 1
OMT	O-metiltransferaza
PA	protokatehinska kiselina
PAL	fenilalanin–amonij liaza
PCA	<i>engl. Principal Component Analysis</i> –dvodimenzionalna analiza glavnih komponenata
<i>p</i> CoA	4–kumarinska kiselina
Phe	fenilalanin
PPD	polifenol peroksidaza
PPO	polifenol oksidaza
PSI	fotosustav I
PSII	fotosustav II
R	raštika
RNA	ribonukleinska kiselina
ROS	<i>engl. reactive oxygen species</i> – reaktivne kisikove čestice
RT	retencijsko vrijeme
SA	salicilna kiselina
SCE	sinapoilkolin esteraza
SET	<i>eng. Single Electron Transfer mechanism</i>
SiA	sinapinska kiselina
s.m.	suha masa
SMCSO	S-metil-L-cistein sulfoksid
SO	superoksid
SOD	superoksid dismutaza
SOS	<i>engl. The salt overly sensitive signal pathway</i>
Sr	stroncij
SyA	siringinska kiselina
t-CA	trans-cimetna kiselina
TCA	trikloroetna kiselina

TPTZ	2,4,6-tris (2-piridil)-S-triazin
TRI reagens	TRIZol reagens
Trx	tioeredoksin
UK. FEN.	ukupni fenoli
UK. FLA.	ukupni flavanoli
UPLC-MS/MS	engl. <i>Ultra Performance Liquid Chromatography – Tandem Electrospray Mass Spectrometry</i> – tekućinska kromatografija visoke učinkovitosti uz masenu spektrometriju
VA	vanilinska kiselina
WT	divlji tip
Zn	cink

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. PORODICA KUPUSNJAČA (Brassicaceae)	2
1.1.1. Kratka povijest i filogenetska podrijetlo vrsta roda <i>Brassica</i>	3
1.1.2. Uročnjak (<i>Arabidopsis thaliana</i>)- modelni organizam u biljnoj biologiji...	6
1.1.3. Nutritivna vrijednost kupusnjača.....	7
1.2. SPECIJALIZIRANI BILJNI METABOLITI: PODJELA, ULOGA I METABOLIZAM.....	9
1.2.1. Fenolni spojevi.....	10
1.2.1.1. Flavonoidi	11
1.2.1.2. Fenolne kiseline.....	12
1.2.1.3. Sinteza fenolnih spojeva u biljkama: fenolnih kiselina i flavonoida.....	17
1.3. KLIMATSKE PROMJENE I ČIMBENICI ABIOTSKOG STRESA.....	20
1.3.1. Povećani salinitet tla i utjecaj solnog stresa na rast i razvoj biljaka.....	21
1.4. OBRAMBENI MEHANIZMI BILJAKA PROTIV NEPOVOLJNIH OKOLIŠNIH UVJETA... 23	
1.4.1. Utjecaj solnog stresa na fotosintetski aparat.....	25
1.4.2. Ionska homeostaza u biljkama u odgovoru na solni stres.....	26
1.4.3. Osmoprotektant prolin u odgovoru na solni stres.....	29
1.4.4. Antioksidacijski odgovori biljaka, enzimatski i ne-enzimatski, na solni stres.....	30
1.4.5. Uloga specijalizirani metabolita u odgovoru kupusnjača na solni stres.....	32
1.5. CILJ I SVRHA ISTRAŽIVANJA.....	34
2. MATERIJALI I METODE.....	35
2.1. BILJNI MATERIJAL	36
2.2. HRANIDBENE PODLOGE ZA UZGOJ KLIJANACA I TRETMA NE.....	37
2.3. UZGOJ BILNOG MATERIJALA I APLIKACIJA STRESA.....	38
2.3.1. Uzgoj i tretman klijanaca kineskog kupusa, bijelog kupusa i raštike solnim stresom.....	38
2.3.2. Hidroponski uzgoj i tretman biljaka kineskog kupusa, bijelog kupusa i raštike solnim stresom.....	38

2.3.3. Pred-tretman biljaka kineskog kupusa fenolnim kiselinama u svrhu poboljšanja tolerancije na stres.....	40
2.3.4. Uzgoj uročnjaka <i>A. thaliana</i> u svrhu funkcionalnih istraživanja.....	40
2.4. Analize odgovora kupusnjača na solni stres.....	40
2.4.1. Morfološki markeri stresa.....	41
2.4.2. Biokemijski markeri stresa.....	41
2.4.2.1. ICP-MS analiza kationa.....	41
2.4.2.2. Određivanje sadržaja prolina.....	41
2.4.2.3. Određivanje fotosintetske učinkovitosti.....	42
2.4.2.4. Određivanje reaktivnih kisikovih čestica (ROS) i glutaciona.....	42
2.4.2.5. Određivanje antioksidacijske aktivnosti.....	43
2.5. ANALIZA SPECIJALIZIRANIH METABOLITA U KUPUSNJAČA USLIJED SOLNOG STRESA.....	44
2.5.1. Mjerenje ukupnih polifenolnih spojeva.....	44
2.5.2. Mjerenje pigmenata: klorofila i karotenoida.....	45
2.5.3. Mjerenje glukozinolata.....	45
2.5.4. Identifikacija i kvantifikacija pojedinačnih fenolnih kiselina UPLC -MS/MS metodom.....	46
2.6. ANALIZA TRANSKRIPATA GENA FENILPROPANOIDNOG PUTA USLIJED SOLNOG STRESA.....	48
2.6.1. Izolacija RNA.....	48
2.6.2. Analiza transkripata gena fenilpropanoidnog biosintetskog puta.....	48
2.7. MJERENJE AKTIVNOSTI ENZIMA FENILPROPANOIDNOG BIOSINTETSKOG PUTA USLIJED SOLNOG STRESA.....	49
2.7.1. Mjerenje aktivnosti PAL enzima.....	49
2.7.2. Mjerenje aktivnosti C4H enzima.....	50
2.7.3. Mjerenje aktivnosti CHS enzima.....	51
2.7.4. Mjerenje aktivnosti CHI enzima.....	51
2.7.5. Mjerenje aktivnosti ANS i FLS enzima.....	51
2.8. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA.....	52
2.9. PCA analiza.....	53

3. REZULTATI.....	54
3.1. Odgovor klijanaca kineskog kupusa (<i>B. rapa</i> spp. <i>pekinensis</i>), bijelog kupusa (<i>B. oleracea</i> var. <i>capitata</i>) i raštike (<i>B. oleracea</i> var. <i>acephala</i>) na povišeni salinitet.....	55
3.1.1. Fiziološki odgovor.....	55
3.1.2. Biokemijski odgovor.....	57
3.1.2.1. Sadržaj iona.....	57
3.1.2.2. Sadržaj prolina.....	59
3.1.2.3. Reaktivne kisikove čestice (ROS) i glutation određeni <i>in situ</i> ...60	
3.1.2.4. Antioksidacijski odgovor klijanaca.....	62
3.1.2.5. Sadržaj specijaliziranih metabolita i korelacije u donosu na vrste kupusnjača u tretmanima solnog stresa.....	63
3.1.2.6. Profil i sadržaj fenolnih kiselina.....	66
3.2. Odgovor biljaka kineskog kupusa (<i>B.rapa</i> spp. <i>pekinensis</i>), bijelog kupusa (<i>B. oleracea</i> var. <i>capitata</i>) i raštike (<i>B. oleracea</i> var. <i>acephala</i>) na povišeni salinitet.....	73
3.2.1. Sadržaj prolina.....	74
3.2.2 Antioksidacijski odgovor biljaka kupusnjača.....	75
3.2.3. Sadržaj specijaliziranih metabolita.....	76
3.2.4. Profil i sadržaj fenolnih kiselina u listu i korijenu biljaka kupusnjača.....	80
3.2.5. Pred-tretmani kineskog kupusa (<i>B. rapa</i> spp. <i>pekinensis</i>) fenolnim kiselinama u svrhu povećanja tolerancije na na solni stres.....	83
3.2.5.1. Pred-tretmani salicilnom kiselinom (SA).....	84
3.2.5.1.1. Fotosintetska efikasnost.....	84
3.2.5.1.2. Sadržaj i omjeri fotosintetskih pigmenata.....	85
3.2.5.1.3. Sadržaj prolina i antioksidacijski odgovor.....	86
3.2.5.1.4. Sadržaj specijaliziranih metabolita.....	88
3.2.5.2. Pred-tretmani sinapinskom kiselinom (SiA).....	90
3.2.5.2.1. Fotosintetska efikasnost.....	90
3.2.5.2.2. Sadržaj i omjeri pigmenata.....	91
3.2.5.2.3. Sadržaj prolina i antioksidacijski odgovor.....	91

3.2.5.2.4. Sadržaj specijaliziranih metabolita.....	93
3.2.5.3. Predtretmani ferulinskom kiselinom (FA).....	95
3.2.5.3.1. Fotosintetska efikasnost.....	95
3.2.5.3.2. Sadržaj i omjeri pigmenata.....	96
3.2.5.3.3. Sadržaj prolina i antioksidacijski odgovor.....	96
3.2.5.3.4. Sadržaj specijaliziranih metabolita.....	98
3.3. Molekularna i funkcionalna istraživanja u kupusnjača uslijed solnog stresa.....	100
3.3.1. Analiza transkripata gena fenilpropanoidnog biosintetskog puta.....	100
3.3.2. Mjerenje aktivnosti enzima fenilpropanoidnog biosintetskog puta.....	101
3.3.3. Funkcionalna istraživanja provedena na uročnjaku (<i>Arabidopsis thaliana</i>).....	103
4. RASPRAVA.....	106
4.1. Vrste roda <i>Brassica</i> i otpornost na solni stres.....	108
4.1.1. Fiziološki pokazatelji odgovora na stres.....	108
4.1.2. Biokemijski pokazatelji odgovora na solni stres.....	109
4.2. Uloga specijaliziranih metabolita u solnom stresu.....	111
4.2.1. Glukozinolati u solnom stresu.....	111
4.2.2. Polifenolni spojevi u solnom stresu.....	112
4.2.3. Fenolne kiseline u solnom stresu.....	113
4.2.4. Potencijalna primjena fenolnih kiselina za poboljšanje tolerancije na stres.....	115
4.3. Kako solni stres djeluje na fenilpropanoidni biosintetski put, na razini transkripcije gena i aktivnosti enzima?.....	117
4.4. Funkcionalna istraživanja na mutantama uročnjaka (<i>A. thaliana</i>) u fenilpropanoidnom putu.....	119
5. ZAKLJUČCI.....	121
6. LITERATURA	123
7. SAŽETAK	140
8. SUMMARY	143
9. ŽIVOTOPIS.....	146
10. PRILOZI.....	149

1. UVOD

Kupusnjače (Brassicaceae) uključuju mnoge ekonomski važne vrste koje se uzgajaju širom svijeta, a mnoge od njih koriste se u prehrani kao povrće. Interesantne su i zbog zdravstvenog potencijala s obzirom da sadrže "zdrave fitokemikalije" (karotenoide, polifenole, glukozinolate) (Šamec i Salopek-Sondi 2018), tj. spojeve koji pokazuju protuupalno, antioksidativno, anti-mutageno i anti-kancerogeno djelovanje. To podupiru epidemiološke studije koje pokazuju da konzumacija povrća iz porodice kupusnjača ima preventivnu ulogu protiv različitih kroničnih bolesti (Raiola i sur. 2018).

S obzirom da se kupusnjače uglavnom uzgajaju u suhom i polusuhom području Mediterana, njihova je proizvodnja potencijalno ugrožena nepovoljnim klimatskim promjenama. Poznavanje fiziologije stresa i mehanizama odgovornih za toleranciju biljaka važna je predispozicija za selekciju biljnih kultura koje će se uspješnije nositi s izazovima često nepovoljnih okolišnih uvjeta. Biljke su razvile složene mehanizme za primanje okolišnih signala i reagiraju u skladu s tim. Najčešći odgovor biljaka na nepovoljne okolišne uvjete je usporavanja rasta i metabolizma kako bi se povećala mogućnost preživljavanja u nepovoljnim uvjetima. To podrazumijeva širok raspon procesa, kao što su prilagodba fotosinteze, aktiviranje antioksidacijskih odgovora, akumulacija specijaliziranih metabolita, promjene u ekspresiji gena itd.

Jedan od odgovora biljaka na nepovoljne okolišne uvjete je i sinteza specijaliziranih metabolita kao što su polifenoli, karotenoidi i glukozinolati koji su često identificirani u vrstama porodice Brassicaceae (Del Carmen Martínez-Ballesta i sur. 2013). Spojevi iz skupine polifenola kao što su fenolne kiseline i flavonoidi smatraju se ključnim obrambenim spojevima koji mogu neutralizirati ROS i spriječiti njihov negativan učinak (Bartwal i sur. 2012). Poznato je da uslijed povećanog saliniteta kupusnjače akumuliraju polifenole i glukozinolate, što varira ovisno o razvojnom stadiju biljke, intenzitetu stresa i vrsti/varijetetu (Del Carmen Martínez-Ballesta i sur. 2013.). Komparativne analize između halofita i glikofita pokazale su da halofiti (vrste tolerantne prema slanosti) imaju veću koncentraciju karotenoida od glikofita (vrsta osjetljivih na salinitet) pod kontrolnim uvjetima i pokazuju manje smanjenje koncentracije karotenoida uslijed solnog stresa (Bose i sur. 2016).

Posebna skupina polifenolnih spojeva koja može sudjelovati u odgovoru na čimbenike abiotskog stresa posebno zbog svojih antioksidativnih svojstava su fenolne kiseline. Postoje izvješća o pozitivnim učincima egzogene primjene nekih fenolnih kiselina npr. salicilne, sinapinske, kava, ferulinske i *p*-kumarinske kiseline na biljke pod stresom (Gawlik-Dziki, 2008). Također, endogena ferulinska i *p*-kumarinska kiselina uključene su u mehanizme tolerancije biljaka na solni stres (Hwan Kim i sur. 2019). Na osnovu dosadašnjih literaturnih navoda, jasno je da polifenolni spojevi tj. fenolne kiseline kao posebna skupina fenolnih spojeva igraju važnu ulogu u prilagodbi biljaka na solni stres iako su mehanizmi tolerancije za sada nejasni i predmet su istraživanja.

1.1. PORODICA KUPUSNJAČA (BRASSICACEAE)

Porodica Brassicaceae ili kupusnjače je porodica cvjetnica koja se sastoji uglavnom od zeljastih jednogodišnjih, dvogodišnjih ili višegodišnjih biljaka. Stari naziv krstašice ili Cruciferae su dobile prema krstastom rasporedu latica u cvjetovima. Porodica uključuje 372 roda i 4060

identificiranih vrsta. Ova porodica, uključuje dobro poznate komercijalne vrste, kao što su *Brassica oleracea* (brokule, kupus, kelj, karfiol i druge), *Brassica rapa* (kineski kupus), *Brassica napus* (uljana repica), *Raphanus sativus* (obična rotkvica), *Armoracia rusticana* (hren) i mnoge druge, te poznati modelni organizam koji se koristi u modernoj biljnoj biologiji *Arabidopsis thaliana* (uročnjak) (Batley i sur., 2012).

1.1.1. Kratka povijest i filogenetska podrijetlo vrsta roda *Brassica*

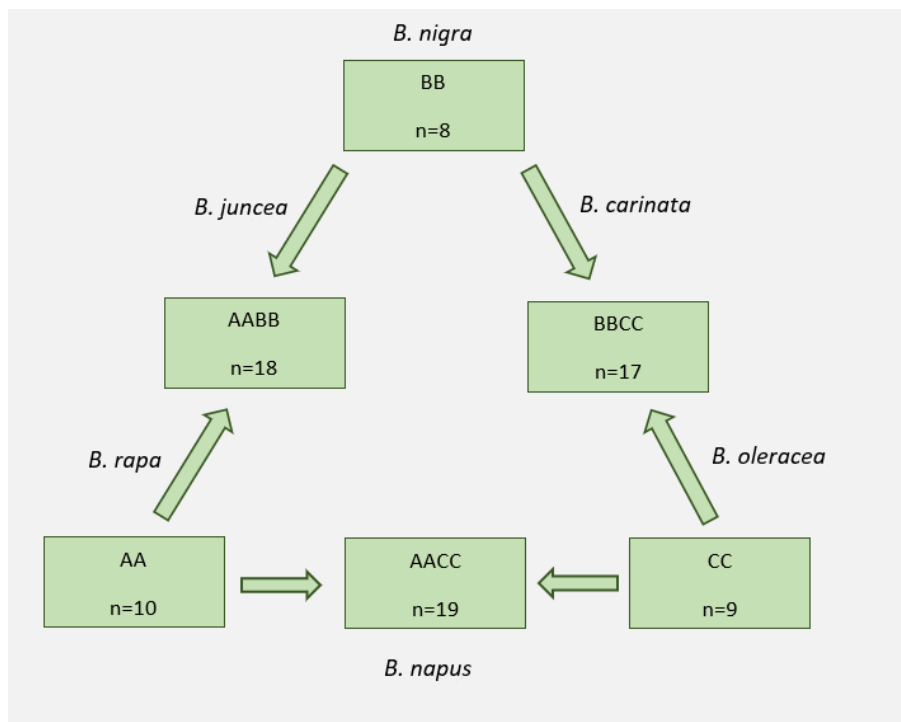
Mnoge komercijalno važne vrste porodice Brassicaceae pripadaju rodu *Brassica*. Većina ih potječe iz Sredozemlja, Kine i Japana. Vrste su dvogodišnje, iznimno jednogodišnje zeljaste biljke, vjerojatno nastale mutacijama, prilagodbama ekološkim uvjetima i djelovanjem čovjeka.

Rod *Brassica* uključuje mnoge ekonomski važne vrste koje se uzgajaju širom svijeta, a mnoge od njih koriste se u prehrani kao povrće. Podrijetlo kupusnjača datira još iz vremena Eocena (prije 56 – 33.9 milijuna godina) te potječu iz Iransko - Turanske regije, odakle su se proširile širom svijeta. Postoje mnogi zapisi i dokumenti o vrstama roda *Brassica* iz Indije i obalnog dijela Europe stari između 5000 i 8000 godina. Danas su kupusnjače široko rasprostranjene na području Europe, Azije i Sjeverne Amerike. Najčešće uzgajano povrće je *B. oleracea* i *B. rapa* koje su gotovo u potpunosti jestive (lišće, cvatnje, korijen, stabljika i sjeme), dok se sjemenke *B. nigra*, *B. carinata* i *B. juncea* koriste i kao začini (Šamec, 2019).

Poznato je da su kupusnjače u svojoj prehrani koristili stari Egipćani, Rimljani i Grci. U doba ranog Rima kupus je postao uobičajena hrana u Egiptu zajedno s ostalim povrćem. Teophrastus (371. - 287. pr. Kr.), koji se smatra „ocem botanike”, u svojim zapisima spominje kupus, pa znamo da su Grci za njega znali barem još u 4. stoljeću prije Krista. Kupus se smatrao luksuzom i mnogi su ga smatrali boljim od svih ostalih vrsta povrća. Također su ga koristili u ljekovite svrhe kao što je liječenje gihta, glavobolje te simptoma trovanja. U doba ranog Rima konzumirali su mokraću ljudi koji su u svojoj prehrani koristili kupus jer su vjerovali u ljekovita svojstva. Osim prehrane, stari Egipćani i Rimljani jeli su veće količine kupusa dan prije različitih slavlja jer su vjerovali da im pomaže u liječenju mamurluka (Bottema i Sarpaki, 2003).

Šest najvažnijih vrsta iz roda *Brassica* (*B. oleracea*, *B. rapa*, *B. napus*, *B. nigra*, *B. carinata* i *B. juncea*) genomski je povezano i objašnjeno teorijom U trokuta (1935) (**Slika 1**). Tri vrste su diploidne: *B. nigra* ($2n=16$, genom BB), *B. oleracea* ($2n=18$, genom CC) i *B. rapa* ($2n=20$, genom AA), dok su preostale tri alotetraploidi: *B. carinata* ($2n=34$, BBCC), *B. juncea* ($2n=36$, AABB) i *B. napus* ($2n=38$, AACC) dobivene hibridizacijom i poliploidizacijom iz dva diploidna taksona (Warwick, 2011).

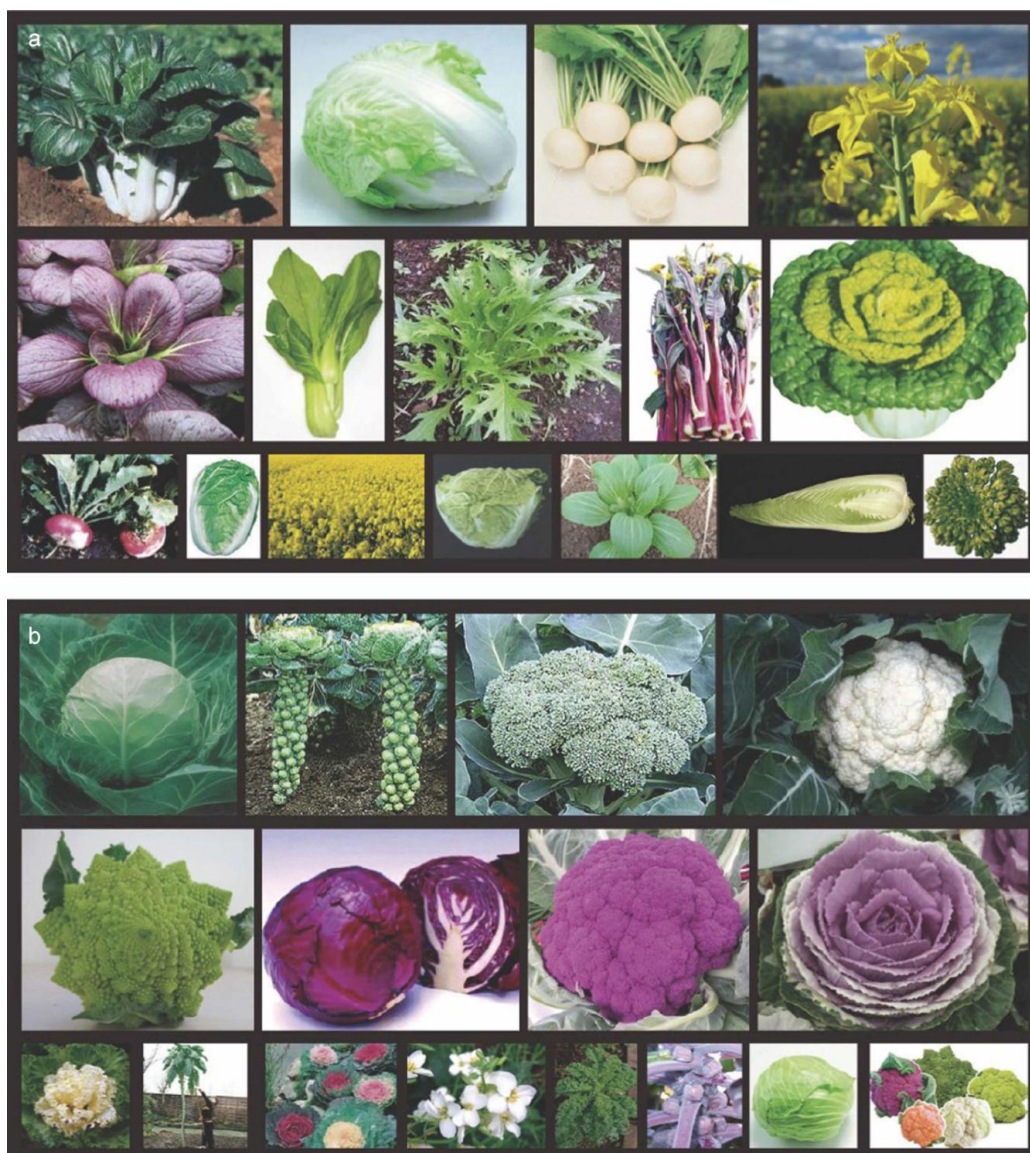
B. oleracea, *B. rapa* i *B. juncea* morfološki su veoma raznovrsne vrste što se vidi u brojnim podvrstama, varijetetima i sortama koje su se povijesno razvijale vrlo sličnom linijom. Primjeri različitih morfoloških tipova pripadnica vrsta *B. rapa* i *B. oleracea* su prikazani na **Slici 2**. Gotovo svi dijelovi ovih biljaka su jestivi, u prehrani se koristi korijenje, stabljike, lišće, pupoljci, cvjetovi i sjeme.



Slika 1. Genetska povezanost šest kultiviranih vrsta *Brassica* prema teoriji U trokuta (1935) preuzeto i modificirano iz Schmidt i Bancroft, 2011).

B. oleracea ima veliki značaj u čovjekovoj prehrani jer uključuje veliki broj kultivara ili varijeteta kao što su brokula, kelj, cvjetača, prokulice te različiti tipovi glavatog kupusa. Varijeteti se razlikuju morfološki i po različitom jestivom dijelu biljke. Prema tome razlikujemo: bijeli i crveni kupus (*B. oleracea* var. *capitata*) forma *alba* i *rubra*; kelj (*B. oleracea* var. *sabauda*); lisnati kelj u koji spada i raštika (*B. oleracea* var. *acephala*); kelj pupčar (*B. oleracea* var. *gemmifera*); cvjetača (*B. oleracea* var. *botrytis*); brokula (*B. oleracea* var. *botrytis*, sub-var. *cymosa*, subvar. *italica*); kineski kupus (*B. oleracea* var. *chinensis*); pekinški kupus (*B. oleracea* var. *pekinensis*); korabica (*B. oleracea* var. *gongylodes*).

Raštika (*B. oleracea* var. *acephala*), tradicionalno se uzgaja u Hrvatskoj. Njezin je uzgoj najzastupljeniji uz šire obalno područje istočne strane Jadranskog mora, otocima te u Bosni i Hercegovinu i Crnoj Gori te je ograničen na mala obiteljska gospodarstva. Spada u skupinu Acephala tj. neglavatih kupusnjača roda *Brassica*. Raštika je bogata vlaknima, malo tvrdih listova i specifičnog okusa. Tamnozeleni listovi su bogati beta karotenom, vitaminom C te kalijem, čime se može usporediti i sa zdravstvenom vrijednosti kupusa i kelja. Bogata je fitokemikalijama s antioksidativnim djelovanjem iz skupine polifenola, koje sudjeluju u prevenciji različitih vrsta tumora i srčanih bolesti (Emebu i Anyika, 2011).



Slika 2. Morfološka raznovrsnost roda *Brassica*: **a)** Morfo tipovi *B. rapa*; **b)** Morfo tipovi *B. oleracea* (preuzeto iz Cheng i sur., 2014).

Minimalna temperatura klijanja sjemena raštike je od 1 do 5°C, dok su optimalne od 15 do 20°C. Može podnijeti ljetne visoke, kao i zimske niske temperature te većinu vrsta tla, ali najuspješnije raste na dubokim, strukturnim tlima uz pH od 6 do 7,2. Suša zaustavlja rast raštike, te joj listovi u to vrijeme otvrdnu i postanu kožasti, no nakon kiše, stvara se novo i kvalitetno lišće (Koch i sur. 2019).

Glavati kupus (*B. oleracea* var. *capitata*) je dvogodišnja zeljasta biljka koja razvija glavicu nastalu savijanjem lišća. Prve godine stvara vegetativne organe, a druge godine cvjetno stablo, cvijet i sjeme. Korijenov sistem se sastoji od glavnog i bočnih korijenovih izdanaka. Nadzemni dio, tj. glavica ovisi o sorti te može biti od 30-50 cm. U Hrvatskoj se prosječno proizvede 35 000 tona glavatog kupusa pa se time smatra najzastupljenijim povrćem. Područja gdje je uzgoj najzastupljeniji su prvenstveno okolica Ogulin, Varaždinska i Zagrebačka županija, Podravina,

Sinjsko polje, Ravni Kotari, područje Neretve te Zadarska i Splitsko-dalmatinska županija (Vincek i sur. 2014).

Kupus sadrži u prosjeku 6-10 % suhe tvari, 4-10 % ugljikohidrata, 1-2 % bjelančevina te 3-50 mg C vitamina, po čemu ima iznimnu važnost u ishrani tijekom zimskih mjeseci (Koch i sur. 2019). Prehrambenu vrijednost kupusa i njegovu ljekovitost poznavali su još i Rimljani. Danas se smatra da kupus smanjuje rizik od raka debelog crijeva te da općenito dobro djeluje na imunološki sustav (Emebu i Anyika, 2011). Posebno je bogat vitaminom C koji se uništava kuhanjem, pa ga je najbolje jesti sirovog ili fermentiranog (kiseli kupus).

Osim navedenih vrsta *B. oleracea* u ljudskoj prehrani često su zastupljeni varijeteti vrste *B. rapa*. Varijeteti vrste *B. rapa* obuhvaćaju repe, uljane i krmne repice, kineski kupus i Pak-Choi kupus. Podvrste i varijeteti ove vrste poznati su i po ljekovitim svojstvima, velikom udjelu vitamina C, antikancerogenom, antiviralnom i protubakterijalnom (Koch i sur. 2019). Kineski kupus sadrži karotenoide i tokoferole i prirodni je izvor antioksidanasa. Unutrašnje žuto lišće kineskog kupusa sadrži lutein i karoten a potrošači preferiraju žute sorte, jer upravo one imaju visoku hranjivu vrijednost. Kineski kupus također je važan izvor i glukozinolata, koji mogu smanjiti rizik od raka debelog crijeva, mokraćnog mjehura, pluća, raka dojke i prostate (Jung i sur. 2015).

Važno je napomenuti da je sekvencioniran cijeli genom vrste *B. rapa* spp. *pekinensis* te je do danas otkriveno više od 40 000 proteina (Zhang i sur., 2018). Genom kineskog kupusa i uročnjaka vrlo je sličan te *A. thaliana* i dalje predstavlja referentnu vrstu za komparativne studije genomike. Zbog umnožavanja genoma mogu se pojaviti varijacije u broju članova u genskim obiteljima. Oni mogu pridonijeti širokom rasponu fenotipske plastičnosti i povećanoj toleranciji na okolišne ekstreme. U konačnici, uz upotrebu transgene tehnologije mogu se razviti varijeteti iz roda *Brassica* s povećanom tolerancijom na različite štetne utjecaje okoliša (Hou i sur., 2013). Ovi mehanizmi nisu u potpunosti razjašnjeni te su potrebna daljnja istraživanja ali predstavljaju dobar temelj za stvaranje kultivara iz roda *Brassica* otpornijih na različite stresore i okolišne promijene.

1.1.2. Uročnjak (*Arabidopsis thaliana*)- modelni organizam u biljnoj biologiji

Pored mnogih komercijalno važnih kultura u porodicu Brassicaceae spada i uročnjak (*Arabidopsis thaliana*), mala cvjetnica porijeklom iz Euroazije. To je jednogodišnja, rijetko dvogodišnja biljka i najčešće naraste u visinu do oko 20–25 cm. Na dnu stabljike, listovi formiraju rozete, uz nekoliko listova i na cvjetajućoj stabljici. Bazni listovi su zelene do blago ljubičasto boje, dugi oko 1,5–5 cm i široki 2–10 mm. Grubo su nazubljeni, a na stabljici se nalaze manji listovi. Obično imaju cjelovite rubove prekrivene s malim, jednostaničnim dlačicama zvanim trihomi (Flora of NW Europe: *Arabidopsis thaliana*, 2007). Uročnjak je mala biljka koja je pogodna za održavanje i u kontroliranim uvjetima. Kao modelni organizam za istraživanja u biljnoj biologiji odabrana je zbog niza eksperimentalno pogodnih karakteristika kao što su kratko generacijsko vrijeme, proizvodnja velikog broja sjemenki, samooplodnost te veličina biljke. Zbog tih karakteristika zahtjevi uzgoja nisu veliki. Istraživanja ove biljke su ostvarila značajan napredak u razumijevanju procesa rasta i razvoja biljaka, fokusirajući se na molekularnu genetiku ove jednostavne angiosperme. Genom

veliĉine 120 Mb je organiziran u pet kromosoma i sadrži, kako se procjenjuje, oko 20 000 gena. Za prouĉavanje ovog organizma osnovana je genetska banka GenBank konzorcij s više laboratorija u Europi, Japanu i SAD-u. Ćitav genom je sekvencioniran do kraja 2000. godine (Meinke i sur., 1998).

1.1.3. Nutritivna vrijednost kupusnjaĉa

Kupusnjaĉe su izuzetno nutritivno bogato povrće koje pored primarnih metabolita (ugljikohidrata, proteina, vitamina itd.) obiluje i specijaliziranim metabolitima (polifenoli, glukozinolati, karotenoidi itd.)

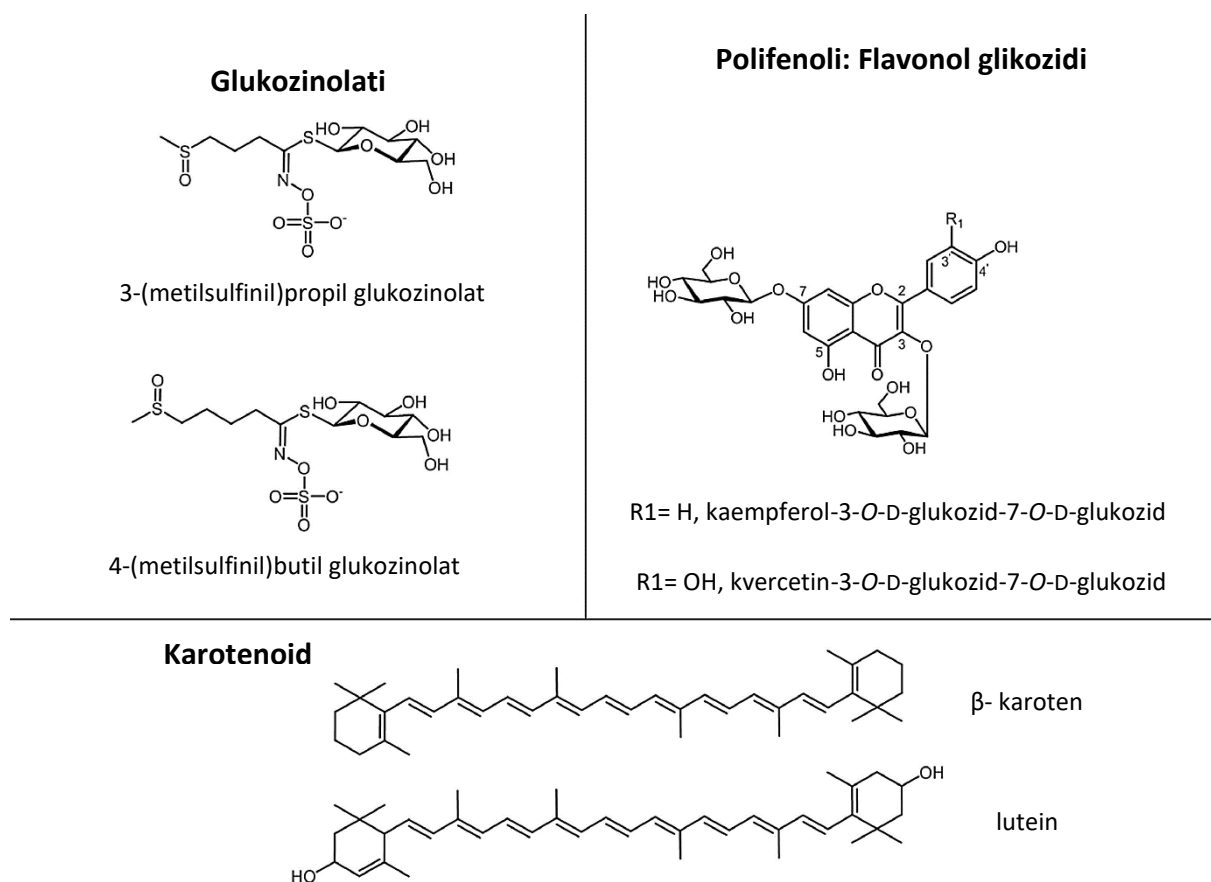
Fruktoza, glukoza i saharoza predstavljaju dominantne šećere u jestivim dijelovima kupusnjaĉa. Fruktosa ĉini preko 50% ukupne koliĉine šećera u nekim sortama brokula. Kupus sadrži veći sadržaj monosaharida niske molekulske mase u odnosu na cvjetaĉu i raštiku, dok raštika sadrži najmanju koliĉinu spomenutih šećera (Jahangir i sur., 2009). U biljkama su prisutni u manjoj koliĉini i šećerni alkoholi sorbitol i inozitol, uz relativno nizak sadržaj saharoze. Pored ugljikohidrata, ovo povrće sadrži i sve esencijalne aminokiseline neophodne za biosintezu proteina. Do sada je utvrđeno da brokula sadrži 17 aminokiselina: L- alanin, L- ariginin, L- asparagin, L-aspraginska kiselina, glicin, L-glutaminska kiselina, L-glutamin, L- histidin, L-leucin, L-izoleucin, L-metionin, L-fenilalanin, L-serin, L-treonin, L-tripotofan, L- tirozin i L-valin kao i neproteinogene aminokiseline, S-metil-L-cistein sulfoksid (SMCSO) koja je prisutna i u drugim vrstama kupusnjaĉa (Jahangir i sur., 2009). Dominantne aminokiseline u svježoj brokuli su glutaminska i asparaginska kiselina, dok je sadržaj aminokiselina koja sadrže sumpor, metionina i cisteina minimalan. Metionin i cistein su aminokiseline od posebnog znaĉajna jer sudjeluju kao donori tiolne grupe u biosintezi ĉitave grupe biološki vaŹnih organosumpornih spojeva - glukozinolata (Volden i sur., 2009).

Visok sadržaj vitamina C karakteristiĉan je za Pak-Choi, brokule, cvjetaĉu i kupus. U biljkama roda *Brassica* ovaj vitamin prisutan je i u oksidiranoj formi kao dehidro-askorbinska kiselina (DHA) i u obliku askorbigena (ABG) koji su proizvod reakcije askorbinske kiseline i degradiranih oblika indol-3-ilmetilglukozinolata. Smatra se da se 30-60% indolnih glukozinolata transformira u askorbigene, pri ĉemu sadržaj vitamina C uslijed spomenute pretvorbe ne opada više od 10% prilikom obrade povrća (Hrncirik i sur., 2001). Pored vitamina C, zeleno lisnato povrće poput kelja, raštike i repe sadrži i vitamine B kompleksa koji ukljuĉuju: B1 (tiamin), B2 (riboflavin), B3 (nikotinska kiselina, niacin), B5 (pantotenska kiselina), B6 (piridoksin), B7 (biotin) i B9 (folna kiselina) vitamine. Znaĉajne koliĉine karotenoida, vitamina A i razliĉitih tokoferola, odnosno vitamina E također su prisutne u kupusnjaĉama.

Cvjetaĉa, Pak- Choi, brokule i raštika su kulture bogate mineralima. Generalno je prihvaćeno da kupusnjaĉe predstavlja dobar izvor kalcija i Źeljeza a najviši udio minerala, u odnosu na ostalo tamnozeleno povrće, ima raštika. Kulture iz roda *Brassica* sadrže znaĉajne koliĉine fosfora, sumpora, klora, kalija, kalcija i stroncija.

Nadalje kupusnjaĉe su bogate specijaliziranim metabolitima koji su ĉesto i antioksidansi kao npr. fenolni spojevi, karotenoidi, glukozinolati (**Slika 3**) pa ih se iz tog razloga smatra izuzetno znaĉajnim povrćem u oĉuvanju ljudskog zdravlja. Dokazana je pozitivna korelacija između

konzumacije kupusnjača i prevencije degenerativnih kardiovaskularnih bolesti te različitih vrsta raka (Cartea i Velasco 2008).



Slika 3. Kemijska struktura najzastupljenijih glukozinolata, polifenola i karotenoida koji se javljaju u kupusnjača (Neugart i sur., 2018).

Kupusnjače su bogate fenolnim spojevima tj. flavonoidima, (posebno flavonolima) i derivatima hidroksicimne kiseline (**slika 3**). Prisutan je veliki broj flavonoidnih glikozida, kao što su glikozidi kempferola i kvercetina, njihovih derivata u kombinaciji s hidroksicimetnom kiselinom, ali i derivati sinapinske kiseline koji su najvažniji fenolni spojevi u vrstama roda *Brassica* (Martinez-Sanchez i sur. 2008). Ti spojevi su posebno zanimljivi zbog antioksidacijskog djelovanja, kao i protuupalnih i antikancerogenih učinaka kod ljudi (Zietz et al., 2010).

Kupusnjače su bogate i spojevima sa sumporom, npr. metilcisteinsulfoksid i glukozinolati (**slika 3, Tablica 1**) koji su odgovorni za oštar i gorak okus karakterističan za kupusnjače. Glukozinolati u rodu *Brassica* posebno su zanimljivi zbog njihovih poznatih pozitivnih utjecaja na ljudsko zdravlje. Glukozinolati igraju ključnu ulogu u obrambenom sustavu biljke, uglavnom u obrani od herbivora i patogena. Prilikom ozljede biljne stanice, glukozinolati se enzimski razgrađuju endogenim enzimom mirozinazom u razne produkte razgradnje, poput nitrila i epitionitrila te dolazi do sinteze izotiocijanata (Hanschen i sur., 2017). Valja napomenuti da su izotiocijanati odgovorni za karakteristično gorkast okus ovog povrća za koje se pokazalo da imaju

antikancerogeno, protuupalno djelovanje kao i anti-diabetički učinak (Guzmán-Pérez i sur., 2016). U tom smislu, brokula je najbolje proučena vrsta kupusnjača do danas (Moreno i sur., 2016).

Vrste iz roda *Brassica*, poput kelja (*B. oleracea* var. *sabellica*) ili Pak Choi (*B. rapa* ssp. *pekinensis*) bogati su izvori karotenoida, posebice luteina i zeaksantina (Mageney i sur., 2016). Također, pokazalo se da karotenoidi iz talijanskog kelja i crvenog kupusa pozitivno utječu na razinu lipida u krvi tj. da snižavaju razinu LDL kolesterola. Konzumacija karotenoida pokazala se pozitivnom u smislu prevencije kardiovaskularnih bolesti i nekih vrsta karcinoma zbog antioksidativnih svojstava ovih spojeva (Bacchetti i sur., 2014). Štoviše, lutein i zeaksantin su pigmenti koji imaju važnu ulogu u zaštiti vida. Točnije, zeaksantin smanjuje rizik bolesti oka povezanih sa starenjem (Seddon i sur., 1994).

1.2. SPECIJALIZIRANI BILJNI METABOLITI: PODJELA, ULOGA I METABOLIZAM

Pored primarnih metabolita koji su neophodni za život, biljke sintetiziraju i tzv. sekundarne ili specijalizirane metabolite. Dok su primarni metaboliti prisutni u svim biljkama, specijalizirani metaboliti imaju specifične uloge u biljnom rastu i razvitku kao i obrani od nepovoljnih biotskih i abiotskih čimbenika i često su vrsno specifični. Fenolni spojevi su npr. uključeni u sintezu lignina, koji je prisutan u svim biljnim vrstama, dok se alkaloidi, koji imaju puno specifičnije uloge, sintetiziraju u specifičnim uvjetima i samo u pojedinim vrstama ili kultivarima. Naziv sekundarni metaboliti je tradicionalno uvriježen i mnogi znanstvenici ga i danas koriste iako se sve više koristi naziv specijalizirani metaboliti koji je dogovorno prihvaćen u Laboratoriju za kemijsku biologiju te će biti korišten u ovom doktoratu.

Specijalizirani metaboliti se dijele na tri velike skupine: fenole, terpene te spojeve s dušikom (alkaloide, glukozinolate i cijanohidrate) (Crozier i sur., 2007) (**Tablica 1**).

Mjesto sinteze specijaliziranih metabolita u biljci nije ujedno i mjesto njihovog nakupljanja. Tako se hidrofilni spojevi najčešće akumuliraju u vakuolama dok su lipofilni pretežno prisutni u smolnim kanalima, uljnim stanicama, trihomama te kutikuli (Crozier i sur., 2007). Iako detaljni procesi biosinteze specijaliziranih metabolita u biljkama još uvijek nisu razjašnjeni, poznato je da biosinteza većine metabolita proizlazi iz putova šikiminske kiseline, acetilkoenzima A, mevalonske kiseline te deoksiksiluloze 5-P (Crozier i sur., 2007).

Kako je ovaj doktorski rad fokusiran na ulogu fenolnih spojeva, posebno fenolnih kiselina u odgovoru kupusnjača na stres, detaljnije ću obraditi te spojeve.

Tablica 1. Podjela specijaliziranih metabolita na skupine i podskupine (Crozier i sur., 2006)

Polifenoli	Flavonoidi	Flavonoli
		Flavoni
		Flavan-3-oli
		Antocijani
		Flavanoni
		Izoflavoni
	Neflavonoidi	Fenolne kiseline
		Hidroksicinamati
Stilbeni		
Spojevi sa sumporom	Glukozinolati	
	Izotiocijanati	
Terpeni	Monoterpeni	
	Diterpeni	
	Triterpeni	
	Seskviterpeni	
	Karotenoidi	
Alkaloidi	Benzilizokvinolini	
	Tropan alkaloidi	
	Nikotin	
	Terpenoid indol alkaloidi	
	Purinski alkaloidi	
	Pirolizidinski alkaloidi	
	Kvinolizidinski alkaloidi	
	Steroidni glikoalkaloidi	
	Konini	
Betalaini		

1.2.1. Fenolni spojevi

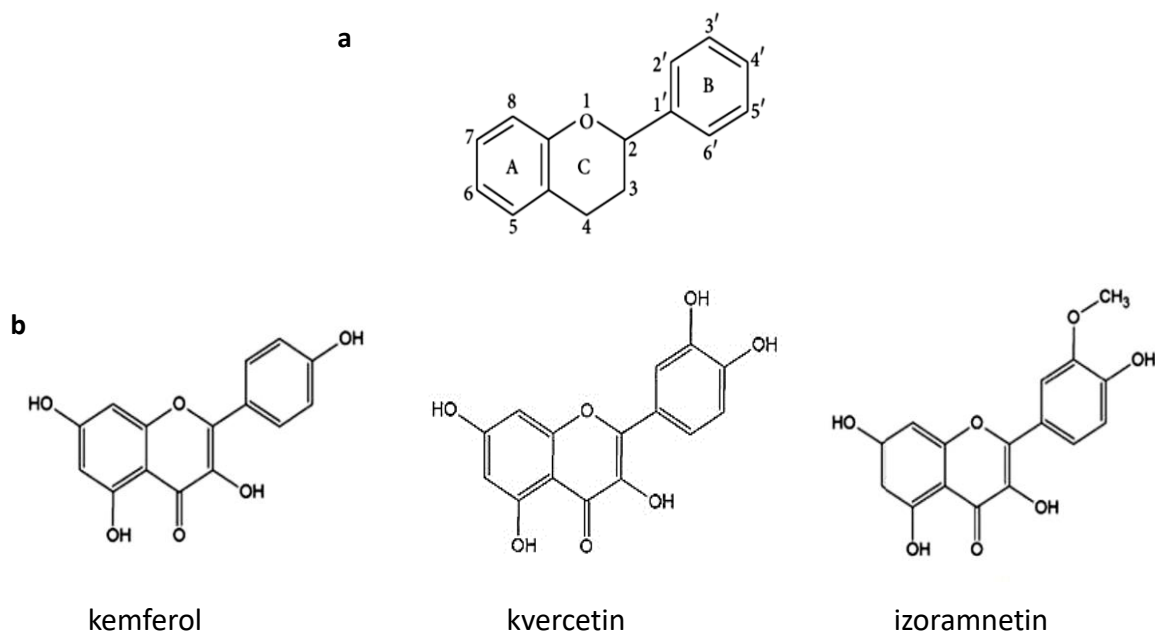
Fenolni spojevi su najveća skupina specijaliziranih metabolita. Do sada ih je otkriveno oko 8000, a obuhvaćaju jednostavne spojeve poput fenolnih kiselina, ali i velike polimerizirane spojeve kao što su kondenzirani tanini. Sastoje se od jednog ili više aromatskih prstenova koji posjeduju jednu ili više hidroksilnih grupa (Dai i Mumper, 2010).

Voće, povrće, cjelovite žitarice kao i druge vrste hrane i pića, kao što su čaj, čokolada i vina bogat su izvor fenolnih spojeva. Raznolikost i široka distribucija fenolnih spojeva u biljkama doveli su do različitih načina kategorizacije ovih spojeva. Klasificiraju se prema izvorima podrijetla, biološkim funkcijama i kemijskoj strukturi. Prema kemijskoj strukturi fenolne spojeve dijelimo na: fenolne kiseline, flavonoide, polifenolne amide i ostale polifenole (Tsao i McCallum, 2009). Najrasprostranjenija i najraznolikija skupina fenolnih spojeva u vrstama roda *Brassica* su flavonoidi (uglavnom flavonoli, ali i antocijani) i hidroksicimetne kiseline (Cartea i

sur. 2011). U biljkama fenolni spojevi se pojavljuju u topivom obliku, kao i u kombinaciji s komponentama stanične stijenke - vezani polifenoli.

1.2.1.1. Flavonoidi

S više od 10 000 izoliranih i identificiranih spojeva (Agati i sur. 2012) flavonoidi čine jednu od najbrojnijih skupina polifenolnih spojeva. Često su odgovorni za plavu, ljubičastu, žutu, narančastu i crvenu boju biljaka. Flavonoidi imaju višestruko djelovanje poput sposobnosti sparivanja elektrona slobodnog radikala, vezivanja iona prijelaznih metala (Fe^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} , aktiviranja antioksidacijskih enzima i inhibiranja oksidaza (Cos i sur. 1998). Povezanost između pojedinih flavonoida i svojstva hvatanja radikala i stvaranja kompleksa omogućuje razumijevanje antioksidacijskog djelovanja flavonoida (Kazazić 2004.). Osnovna kemijska struktura flavonoida je kostur od petnaest ugljikovih atoma raspoređenih u dva aromatska prstena (A i B prsten) povezana heterocikličnim piranskim prstenom (C prsten) (**Slika 4**).



Slika 4. a) Osnovna kemijska struktura flavonoida (Kumar i Pandey 2013); **b)** Kemijske strukture najzastupljenijih flavonoidnih aglikona u mnogim biljnim vrstama uključujući i vrste roda *Brassica* (Cartea i sur. 2011).

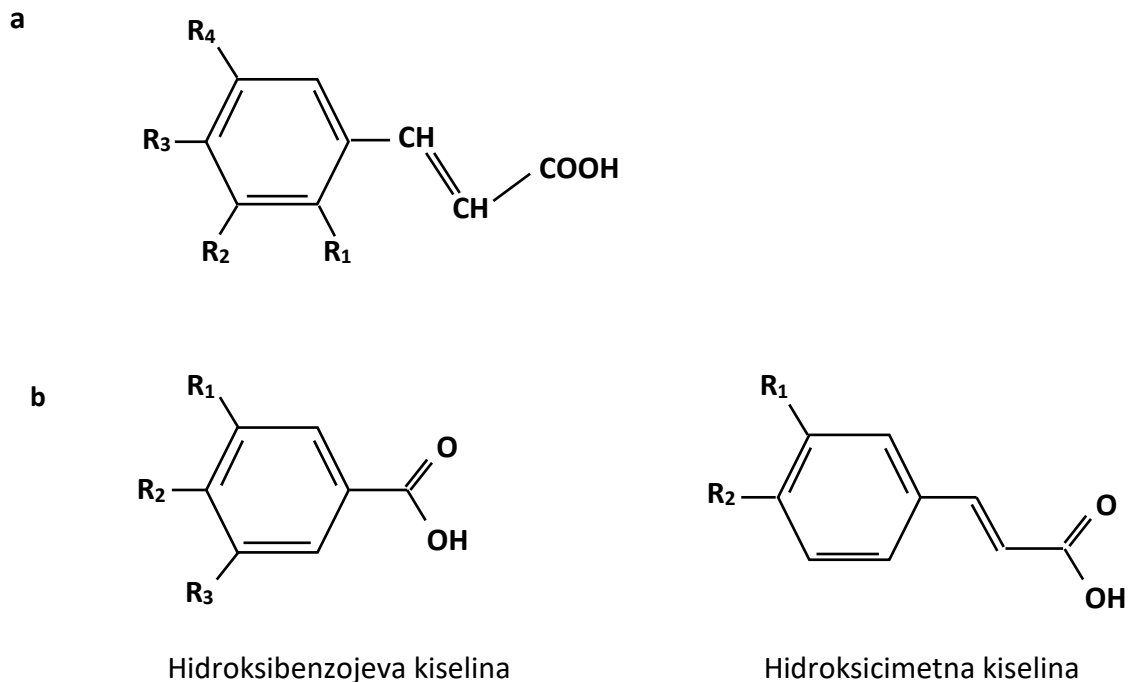
Flavonoidi se mogu podijeliti u različite kategorije kao što su flavoni, flavonoli, flavanoli, izoflavoni, antocijanidi. Strukturna raznolikost flavonoida rezultat je brojnih modifikacija osnovne skeletne strukture, koje uvjetuju reakcije hidrogenacije, hidroksilacije, O-metilacije hidroksilnih grupa, dimerizacije, vezanja neorganskog sulfata i glikozilacija hidroksilnih grupa (O-glikozidi) ili flavonoidne jezgre (C-glikozidi). Flavonoidi se pojavljuju kao glikozidi, aglikoni i metilirani derivati. Oko 90% flavonoida biljaka nalazi se u obliku glikozida (Swain i sur. 1979). Šećer koji se najčešće javlja jest glukoza, no javljaju se i galaktoza, ramnoza i ksiloza (Kazazić 2004). Osim što djeluju antibakterijski, protuupalno, antialergijski, antivirusno i antikancerogeno, flavonoidi doprinose boji i okusu hrane (Kazazić 2004).

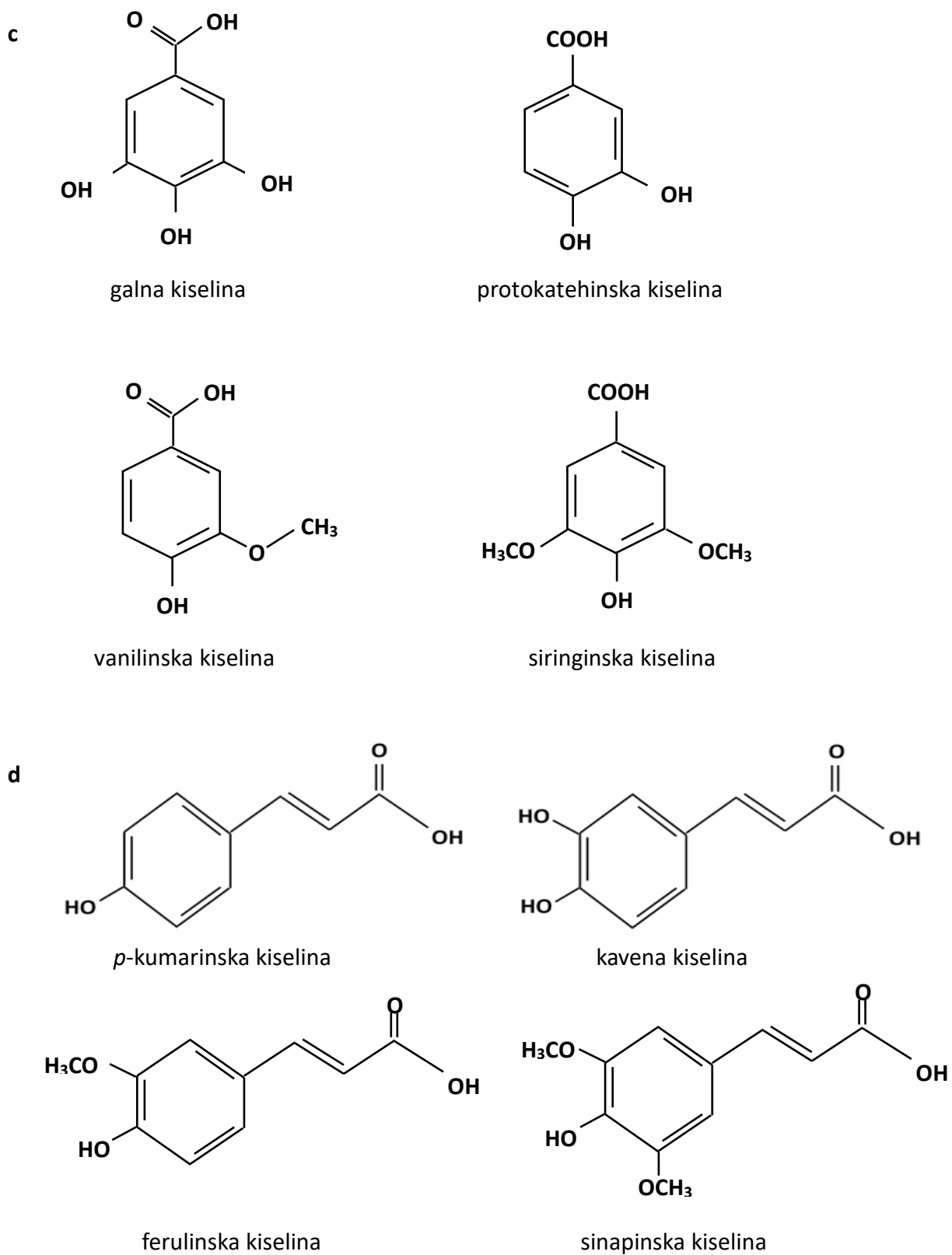
1.2.1.2. Fenolne kiseline

Struktura i podjela

Fenolne kiseline su velika skupina polifenolnih spojeva u biljnom carstvu, a javljaju se u obliku estera, glikozida ili amida, rjeđe u slobodnom obliku. Slobodne fenolne kiseline najčešće se nalaze u voću i povrću, a fenolne kiseline u vezanom obliku najčešće su u žitaricama i sjemenkama (Tsaio 2010). Varijacije unutar fenolnih kiselina rezultat su broja i lokacije hidroksilnih skupina na aromatskom prstenu. Razlikujemo dvije glavne skupine fenolnih kiselina: derivate hidroksibenzojeve i derivate hidroksicimetne kiseline (**Slika 5**). Hidroksibenzojeve kiseline su galna, vanilinska, siringinska, salicilna i protokatehinska kiselina, a hidroksicimetne kiseline su ferulinska, kavena, p-kumarinska, sinapinska i klorogenska kiselina. Ove kiseline pripadaju različitim biosintetskim putevima; hidroksibenzojeve pripadaju aminobenzoatnom putu, a hidroksicimetne kiseline fenilpropanoidnom putu biosinteze zbog čega imaju sličnosti s flavonoidima.

Hidroksicimetne kiseline (HCA) s osnovnom strukturnom jedinicom C6-C3 su hidroksilirani derivati cimetne kiseline (Crozier, 2007).





Slika 5. a) Osnovna kemijska struktura fenolnih kiselina; **b)** Struktura hidroksibenzojeve i hidroksicimetine kiseline (Ignat i sur., 2011); **c)** Primjer hidroksibenzojevih kiselina; **d)** Primjer hidroksicimetnih kiselina.

Početni spoj u biosintezi hidroksicimetnih kiselina je aromatska aminokiselina L-fenilalanin koja nastaje iz korizmata kao konačnog produkta biosintetskog puta šikiminske kiseline (**Slika 8a**). Dodatnim reakcijama dekarboksilacije, transaminacije i deaminacije nastaju cimetna (3-fenil propenska) kiselina i hidroksicimetne kiseline. Naknadnim reakcijama hidroksilacije, metoksilacije i dr., nastaju derivati cimetine kiseline: *p*-kumarinska kiselina (*p*-hidroksicimetna kiselina), kavena kiselina (2,3-dihidroksicimetna kiselina), ferulinska kiselina (2-metoksi-3-hidroksicimetna kiselina) i sinapinska kiselina (2,4-dimetoksi-3-hidroksicimetna kiselina) (Dixon i sur. 2005).

Hidroksibenzojeve kiseline (HBA) i njihovi derivati su fenolni spojevi opće strukture C6-C1, sintetizirane direktno iz benzojeve kiseline. Varijacije u osnovnoj strukturi HBA uključuju hidroksilaciju i metoksilaciju aromatskog prstena. Neki od predstavnika HBA prikazani su na **slici 5c**.

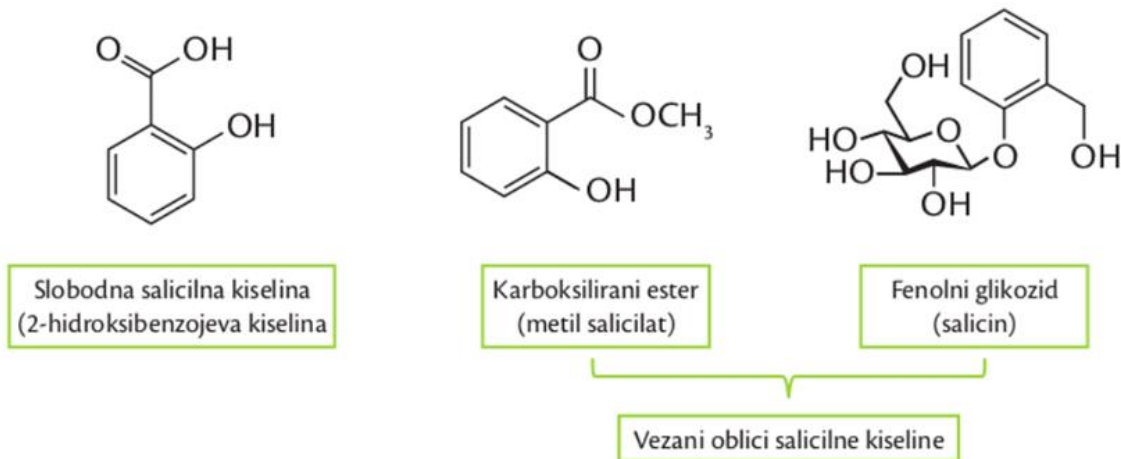
Fiziološka uloga fenolnih kiselina u biljkama

Uloga fenolnih kiselina u biljkama uglavnom je vezana uz različite funkcije, uključujući apsorpciju hranjivih tvari, sintezu proteina, aktivnost enzima, fotosintezu i aleopatiju (Robbins, 2003). Derivati hidroksibenzojeve i hidroksicimetne kiseline prisutni su u gotovo svim biljnim tkivima i organima tj. u sjemenu, lišću, korijenu i stabljici (Shahidi i sur., 1995). Manji dio kiselina prisutan je kao "slobodne kiseline" jer su većinom vezane preko esterske, eterske ili acetatne veze za strukturne komponentne biljnih stanica kao što su celuloza, proteini, lignin, ili na veće polifenole (flavonoide), na manje organske molekule ili na ostale vrste spojeva u stanicama (Ghasemzadeh i sur., 2011). Upravo su te veze razlog velikom broju derivata fenolnih kiselina, a ta raznolikost jedan je od glavnih čimbenika zaslužnih za složenosti njihovih analiza. Fenolne kiseline nisu homogeno rasprostranjene u biljnim tkivima jer je poznato da okolišni uvjeti, kao što su na primjer temperatura, lokacija, način uzgoja i ostali čimbenici utječu na profil i sadržaj fenolnih kiselina u biljci (Chen i sur., 2016).

Hidroksicimetne kiseline i njihovi derivati u prirodi uglavnom dolaze u različitim konjugiranim oblicima te kao esteri. Posebno zastupljena hidroksicimetna kiselina u kupusnjača je sinapinska kiselina koja stvara široki spektar konjugata O-estera. Ti topljivi esteri sinapinske kiseline čine dobro poznatu metaboličku mrežu i stvaraju se u različitim razvojnim fazama biljke. Akumulacija estera sinapinske kiseline i topljivih fenilpropanoida također pruža zaštitu od ultraljubičastog UV-B zračenja i sudjeluje u obrambenom odgovoru na patogene poput *Verticillium longisporum* u vrsti *Arabidopsis thaliana* (Martinović i Abramović, 2019).

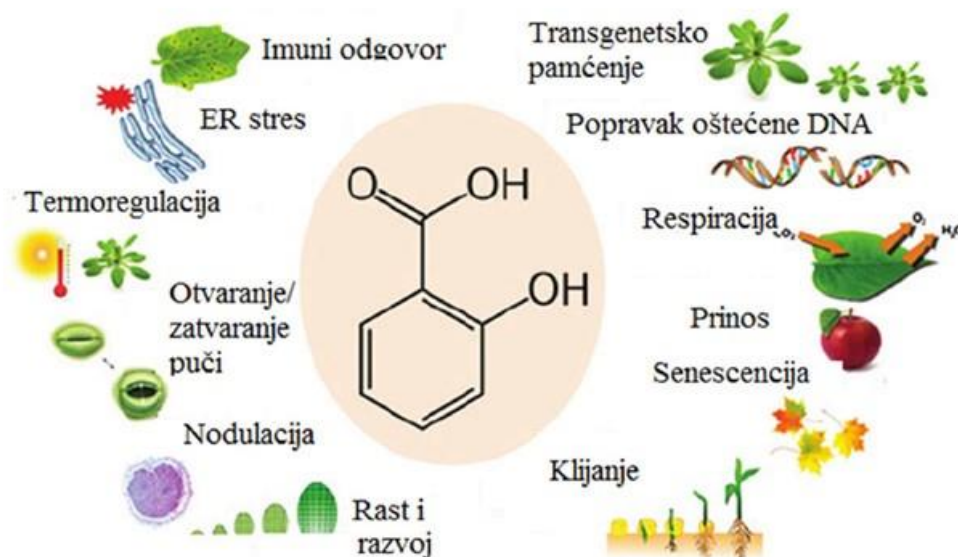
Razlikujemo tri glavna estera sinapinske kiseline: sinapoilglukoza, sinapoilmalat i sinapoilkolin koji se akumuliraju u *A. thaliana* i ostalim članovima porodice Brassicaceae. Sinapoilkolin igra važnu ulogu tijekom klijanja sjemena. Kad sjeme počne klijati, sinapoilkolin se hidrolizira djelovanjem sinapoilkolin esteraze (SCE), čime se oslobađa sinapinska kiselina i kolin, potom se kolin oksidira u glicin betain koji djeluje kao sredstvo za zaštitu od stresa stabilizirajući proteine i membrane.

Jedna od bitnih hidriksibenzojevih kiselina koja je inače i signalna molekula i smatra se hormonom stresa je salicilna kiselina (SA) (2-hidroksibenzojeva ili orto-hidroksibenzojeva kiselina), prisutna u biljnim tkivima u količinama od nekoliko ng do nekoliko mg/g svježje mase (Malakar, 2017). U biljkama se pojavljuje u dva glavna oblika: slobodna salicilna kiselina i vezani oblik (karboksilirani ester (metil salicilat) i fenolni glikozid (salicin)) (Malakar, 2017.) (Slika 6).



Slika 6. Slobodni i vezani oblik salicilne kiseline (prilagođeno prema Malakar, 2017.)

SA sudjeluje u brojnim razvojnim procesima biljaka, od klijanja, termoregulacije, regulacije otvaranja puči, starenja itd. (Slika 7). Učinak salicilne kiseline na ove procese može biti direktan ili indirektan, jer je salicilna kiselina uključena u sintezu i/ili signalizaciju regulacije drugih biljnih hormona (Hernández i sur., 2018).



Slika 7. Biološke uloge salicilne kiseline u biljaka (Preuzeto i modificirano iz Liu i sur., 2018)

Njezina se razina znatno povećava u biljkama izloženim različitim stresnim uvjetima. Pošto salicilna kiselina ima ključnu ulogu kao signalna molekula u abiotičkom i biotičkom odgovoru na stres, uključena je u endogenu signalizaciju, posredujući u obrani biljaka od patogena

inducirajući proizvodnju proteina povezanih s patogenezom. Uključuje sustavnu stečenu otpornost u kojoj patogeni napad na jedan dio biljke inducira otpornost na drugim dijelovima, a prevođenjem salicilne kiseline u metil salicilat, hlapljivi ester, omogućuje se prijenos signala na obližnje biljke (Hernández i sur., 2018).

Nadalje salicilna kiselina ima ulogu i u odgovoru na abiotske stresove. Utvrđeno je da salicilna kiselina u uvjetima primjerice visoke zaslanjenosti tla zapravo utječe na smanjenje oksidativnog oštećenja (Liu i sur., 2018). Poboljšanje vodnog statusa u listovima sprječavanjem dehidracije kod vodnog deficita i ograničavanje redukcije provodnosti puči primjenom salicilne kiseline ima pozitivnu ulogu u održavanju fotosintetskih aktivnosti i smanjenju oštećenja (Liu i sur., 2018). Također, pored gore navedenih učinaka, egzogena primjena salicilne kiseline povećava otpornost biljaka i na druge abiotske stresne uvjete kao što je suša, smrzavanje, UV zračenje, izloženost teškim metalima i sl. (Hernández i sur., 2018).

Fenolne kiseline i ljudsko zdravlje

Na fenolne kiseline otpada trećina od ukupnih biljnih fenolnih spojeva te se zbog toga razvija sve veće zanimanje i za ove spojeve u službi ljudskog zdravlja. Fenolne kiseline djeluju kao antikancerogena sredstva, stimulansi imunološkog sustava te reguliraju hormone metabolizma a dobro su poznate po svojoj antioksidativnoj aktivnosti (El-Seedi i sur., 2019). Antioksidansi su specifični spojevi koji štite ljudske, životinjske i biljne stanice od štetnih učinaka slobodnih radikala i sprječavaju procese oksidacije. Neravnoteža između antioksidansa i slobodnih radikala rezultira oksidativnim poremećajem i stanjem koje se naziva oksidativni stres koje dovodi do staničnih oštećenja i razvoja bolesti kao što su kardiovaskularne bolest i različiti oblici raka. **Tablica 2** prikazuje neke od pozitivnih učinaka odabranih fenolnih kiselina, tj. hidroksicimetnih kiselina na ljudsko zdravlje. Kao što je vidljivo mnoge od njih djeluju kao antioksidansi, imaju protuupalno, antikancerogeno djelovanje itd.

Od hidroksibenzojevih kiselina, dvije glavne supstance iz grupe salicilata koriste se u terapijske svrhe, a to su: salicilna kiselina i metil salicilat (EMA, 1999). Salicilna se kiselina koristi prvenstveno za pripremu aspirina i drugih farmaceutskih proizvoda (Brown, 2016). Salicilna kiselina je jaki antiseptik zbog karboksilirane fenolne baze. Sastavni je dio pripravaka koji se koriste za suzbijanje raznih kožnih bolesti (El-Seedi i sur., 2019).

Tablica 2. Primjer hidroksicimetnih kiselina (HCA), njihovi pozitivni učinci na zdravlje, dnevne preporučene doze te biljke koje ih sadrže u većim količinama (preuzeto i prilagođeno El-Seedi i sur., 2019).

Fenolne kiseline HCA	kava kiselina	<i>p</i> -kumarinska kiselina	klorogenska kiselina	ferulinska kiselina	Reference
Povijest	Zabilježena je njena upotreba još od 400 pr. Kr.	Alfred Vogel ju je izolirao 1820. godine, A prvi ju je sintetizirao William Henry Perkin 1868. godine	Otkrivena je 1932. godine ali je pronalazitelj nepoznat	Prvi puta je izolirana u ranim 1900-tim godinama a o upotrebi prije ima vrlo malo poznatih informacija	Egan i sur., 1990; Chen i sur., 1997
Učinak na zdravlje	Protuupalno, antioksidativno djelovanje, prevencija u razvoju karcinoma i dijabetesa	Analgetik, protuupalno djelovanje te se koristi u prevenciji aritmije, različitih vrsta karcinoma, osteoporoze, i hipertenzije. Ima pozitivne učinke u zaštiti kapilara od oštećenja i u liječenju astme	Antioksidans, pomaže u gubitku tjelesne mase, prevencija karcinoma i dijabetesa, smanjuje razinu LDL kolesterola te smanjuje rizik od srčanih bolesti	Blagotvorni učinci na kožu gdje se koristi kao antioksidans u zaštiti kože protiv (UV) oštećenja. Prevencija degradacije kostiju i različitih vrsta karcinoma, ublažava negativne simptome menopauze	Ou i sur., 2004; Van Duyn i sur., 2000; Boyer i sur., 2004; Sirota i sur., 2015
Preporučena dnevna doza	100-500 mg	0.1 mg	60-185 mg	100 mg	Clifford i sur., 1999; Radtke i sur., 1998
Biljke bogate pojedinim fenolnim kiselinama	Kava, jabuke, artičoke, bosiljak, kupus, cvjetača, kelj, origano, kruške, rotkvice, timijan i repa	Marelice, trešnje, cimet, jagode	Kava, jabuke, borovnice, kruške, sjemenke suncokreta, čaj, i rajčice	Jabuke, šparoge, mrkva, kava, naranča, grašak, ananas i cjelovite žitarice	Manach i sur., 2004; Ou i sur., 2004; Clifford i sur., 1999; Sproll i sur., 2008

1.2.1.3. Sinteza fenolnih spojeva u biljkama: fenolnih kiselina i flavonoida

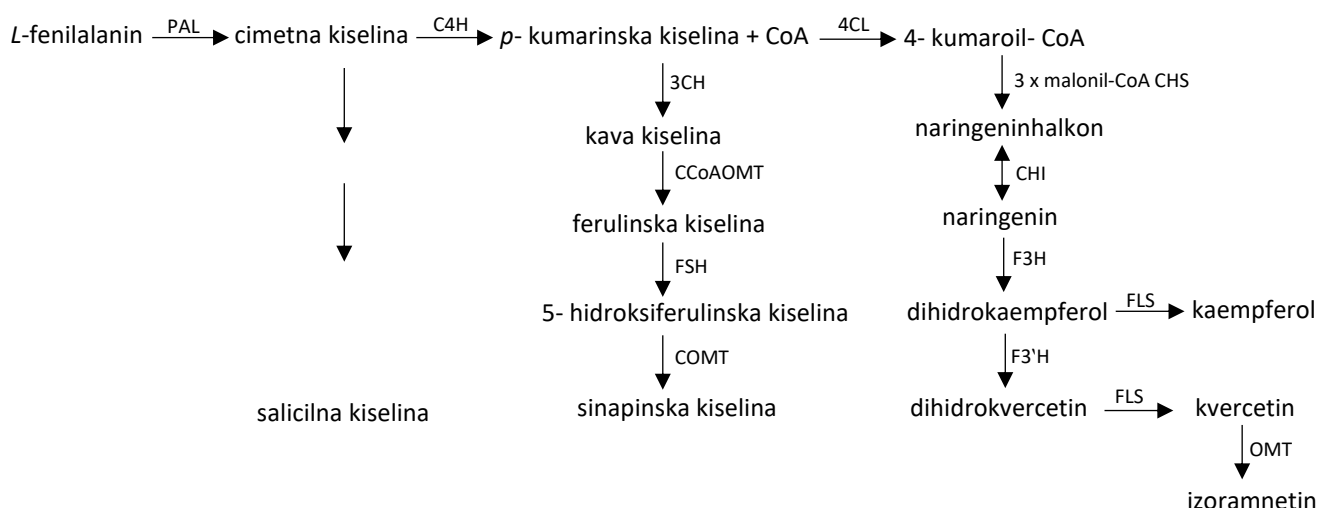
Biosintetski put fenolnih spojeva u biljci uključuje putove šikiminske kiseline, fenilpropanoida i flavonoida. Iako se u posljednjih nekoliko godina intenzivno istražuju, detaljni koraci biosintetskih putova nisu još uvijek potpuno razjašnjeni te se u literaturi često nailazi na oprečne rezultate. Većina fenolnih kiselina su derivati trans-cimetne kiseline formirane deaminacijom L-fenilalanina uz pomoć L-fenilalanin amonij-liaze (PAL). Enzim PAL povezuje primarni (biosintetski put šikiminske kiseline) sa sekundarnim metabolizmom (fenilpropanoidni biosintetski put), te ima ključnu ulogu u regulaciji sinteze fenolnih specijaliziranih metabolita zbog čega je godinama upravo PAL bio najviše istraživani biljni enzim (Morant i sur., 2007). U biosintetski put fenolnih spojeva uključeno je više od šesnaest enzima iz skupine citokroma P450 monooksigenaza. Prva među njima je izolirana cinamat 4-hidroksilaza (C4H), a njezina inaktivacija u transgenim biljkama uzrokuje smanjenje količine klorogenske kiseline, flavonoida i lignina. Enzimi 3-hidroksilaze su uključene u sintezu kava kiseline iz *p*-kumarinske kiseline (Franke i sur., 2002), a važne su kod sinteze klorogenske i ružmarinske kiseline. Među 5-hidroksilazama važna je ferulat 5-hidroksilaza

(F5H) koja ima centralnu ulogu u sintezi lignina (Morant i sur., 2007). Također, u sintezi lignina sudjeluju i *p*-kumarat-CoA ligaze (4CL), a enzimi iz te porodice sudjeluju i u biosintezi flavonoida (Hu i sur., 1998) (**Slika 8a**). U biosintetskom putu polifenola važnu ulogu imaju i dvije cinamil alkohol dehidrogenaze: CAL1 i CAL2 koje su uključene u biosintezu lignina i lignana (Hu i sur., 1998). Nadalje, polifenol-oksidaza (PPO) i polifenol-peroksidaza (PPD), dva su enzima važna za regulaciju razine fenolnih spojeva u biljci zbog uloge u oksidativnoj degradaciji fenolnih spojeva, što je bitno kod uporabe biljaka bogatih fenolnim spojevima u prehrambenoj industriji (Tomas-Barberan i Espin, 2001). PPO je lokalizirana u plastidima viših biljaka te uz prisutnost kisika katalizira hidroksilaciju monofenola u *o*-difenole i oksidaciju *o*-difenola u *o*-kinone koji zatim spontano bez djelovanja enzima polimeriziraju u heterogene crne, smeđe ili crveno pigmentirane spojeve poznate pod nazivom melanini. Takvi procesi su bitni kod ozljede biljnog tkiva gdje dolazi do aktivacije PPO koja stvarajući spomenute pigmente zatvara mjesto ozljede te na taj način sprečava daljnje oštećenje tkiva ili ulazak insekata (Tomas-Barberan i Espin, 2001). PPO može djelovati i kao promotor PPD koji u prisutnosti vodikova peroksida katalizira oksidaciju polifenolnih spojeva. Aktivnost PAL, PPO i PPD ovisi o različitim vanjskim čimbenicima koji utječu na razinu polifenolnih spojeva u biljci (Tomas-Barberan i Espin, 2001).

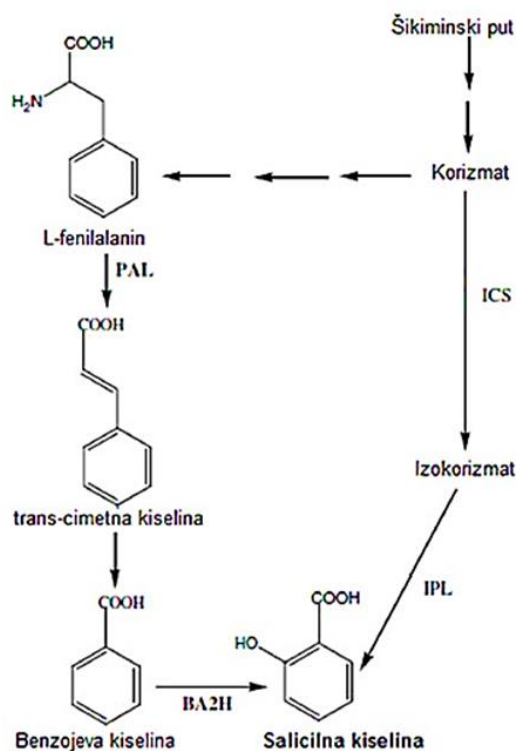
Salicilna kiselina je prirodni derivat cimetne kiseline, međuprodukta u putu šikiminske kiseline u kojem nastaju fenolne komponente. U biljkama se sintetizira kroz dva različita enzimska puta, koja zahtijevaju korizmat kao primarni metabolit (El-Seedi i sur., 2019; **Slika 8b**). Prvi put se odnosi na sintezu salicilne kiseline lokalizirane u kloroplastu iz korizmata, putem izokorizmata u reakciji s dva koraka koja je katalizirana izokorizmat sintazom i izokorizmat-piruvat lijazom (El-Seedi i sur., 2019). Taj put je izuzetno bitan za biljke jer im omogućava obranu od patogena.

Alternativni put biosinteze salicilne kiseline je put fenilalanina koji je lokaliziran u citoplazmi. Fenilalanin (Phe) preko korizmata daje trans-cimetnu kiselinu (t-CA) pomoću enzima PAL. Zatim slijedi dekarboksilacija bočnog lanca t-CA i stvaranje benzojeve kiseline (BA) koja podliježe hidroksilaciji aromatskog prstena na ugljikovom atomu C-2 te uz benzoil-2-hidroksilazu (BA2H) nastaje salicilna kiselina (**Slika 8b**). Jednom sintetizirana salicilna kiselina u biljkama prolazi kroz niz biološki relevantnih kemijskih modifikacija uključujući glukoziliranje, metiliranje i konjugaciju aminokiselina (El-Seedi i sur., 2019).

a



b

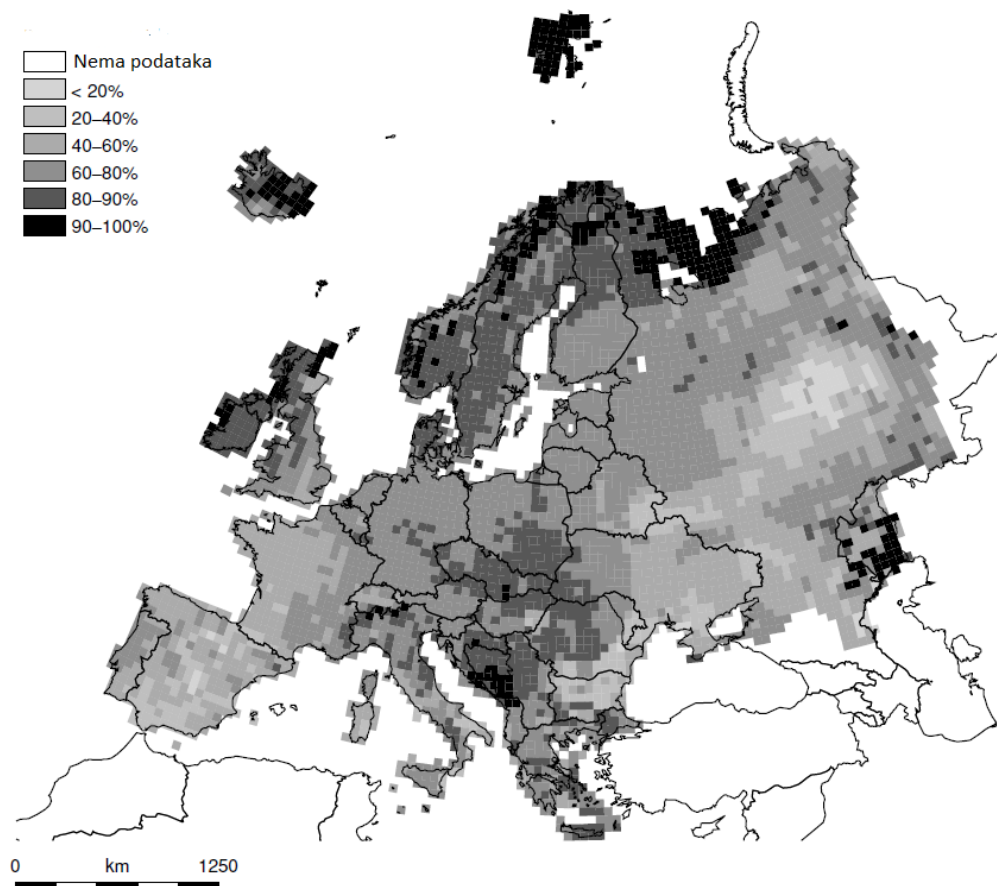


Slika 8. a) Biosintetski putevi fenolnih kiselina i flavonoida (preuzeto i prilagođeno iz Kutchan i sur, 1998.); **b)** Pojednostavljeni shematski prikaz biosintetskog puta salicilne kiseline (SA) (Preuzeto i modificirano iz Bandurska i Stroiński, 2005). **PAL**- fenilalanin amonij-liaza, **C4H**- cinamat-4-hidroksilaza, **C3H**- p-kumaroil-šikimat/kvinat-3-hidroksilaza, **CCoAOMT**- kafeoil-CoA 3-O-metil transferaza, **F5H**- ferulin- (koniferil aldehid/alkohol) 5-hidroksilaza, **COMT**- O-metiltransferaza kavene kiseline, **4CL**- 4-kumaroil-CoA-liaza, **CHS**- halkon-sintaza, **CHI**- halkon-izomeraza, **F3H**- flavanon-3-hidroksilaza, **F3'H**- flavonoid-3'-hidroksilaza, **FLS**- flavonol-sintaza, **OMT**- O-metiltransferaza, **ICS**- izo-korizmat sintaza, **IPL**- izo-korizmat-piruvat liaza, **BA2H**- benzoil-2-hidroksilaza.

1.3. KLIMATSKE PROMJENE I ČIMBENICI ABIOTSKOG STRESA

Posljednjih desetljeća svjedoci smo sve izraženijih nepredvidivih klimatskih promjena kao što su ekstremne temperature, suše, povećani salinitet tla itd. Oko 7% ukupne površine zemlje zahvaćeno je povećanim salinitetom tla, 64% sušom, 13% poplavama, i oko 57% ekstremnim temperaturama (Zhang i sur., 2019).

Biljke su tokom perioda vegetacije izložene različitim stresnim utjecajima sredine u kojoj se nalaze. Oni mogu nepovoljno djelovati na biljni rast i razvoj te dovesti do smanjenog prinosa i kvalitete proizvoda. Procjenjuje se da su značajni gubitci u poljoprivrednoj proizvodnji (preko 50%) uzrokovani čimbenicima abiotskog stresa (suša, povećani salinitet, ekstremne temperature) čime je ugrožena sigurnost hrane diljem svijeta. Takve promjene mogu u velikoj mjeri utjecati i na raznolikost i rasprostranjenost vrsta, a samim time i na ekosustave i bioraznolikost. Höglind i sur. (2013) su razvili model, tzv. Euro model kako bi procijenili utjecaj klimatskih promjena na bioraznolikost. Prema tom modelu predviđa se da će posljedice klimatskih promjena na biološku raznolikost biti prilično velike do 2050. Oko 32% europskih biljnih vrsta koje su bile prisutne 1990-ih godina moglo bi nestati (**Slika 9**).



Slika 9. Procjena o biljnim vrstama (u postotcima) koje bi se održale do 2050. u odnosu na ukupni broj vrsta u 1990-tim godinama izračunata prema Euro modelu s obzirom na postojeće i predstojeće klimatske promjene (Höglind i sur. 2013).

Također, prema proračunima, najsjevernije i zapadnije obalne regije, Baltičke države te Hrvatska zajedno sa susjednim zemljama potencijalno su najstabilnija mjesta i tako se suočavaju s najmanje dramatičnim gubitcima vrsta. Navedene regije sadrže oko 80% značajnih biljnih vrsta. Najveći gubitci do 2050. godine predviđaju se za područja Španjolske, jugozapadne Francuske, područje Crnog mora te Bjelorusije. Na tim područjima zastupljeno je oko 50% biljnih vrsta koje bi mogle biti ugrožene. U konačnici, zemlje Benelux-a (Belgija, Nizozemska i Luksemburg), Njemačka i nizine oko Baltičkog mora pokazuju osrednji odgovor na klimatske promjene a imaju između 70 i 80% biljnih vrsta važnih za ljudsku konzumaciju.

Prirodno okruženje biljaka sastoji se od složenog niza abiotskih i biotskih čimbenika. Reakcije biljaka na okolišne uvjete i promjene složene su, dinamične te mogu biti reverzibilne i ireverzibilne (Höglind i sur. 2013). Odgovori na stres su tkivno i stanično specifični te taj odgovor ovisi o razini i trajanju stresa (akutni ili kronični stres) te kao takav može imati značajan učinak u smislu složenosti biljnog odgovora (Höglind i sur. 2013). U prirodi biljke su obično pod utjecajem složenih stresnih utjecaja, npr. period suša je usko povezan s povišenim temperaturama, a to je u mediteranskim područjima često povezano i s povećanim salinitetom tla.

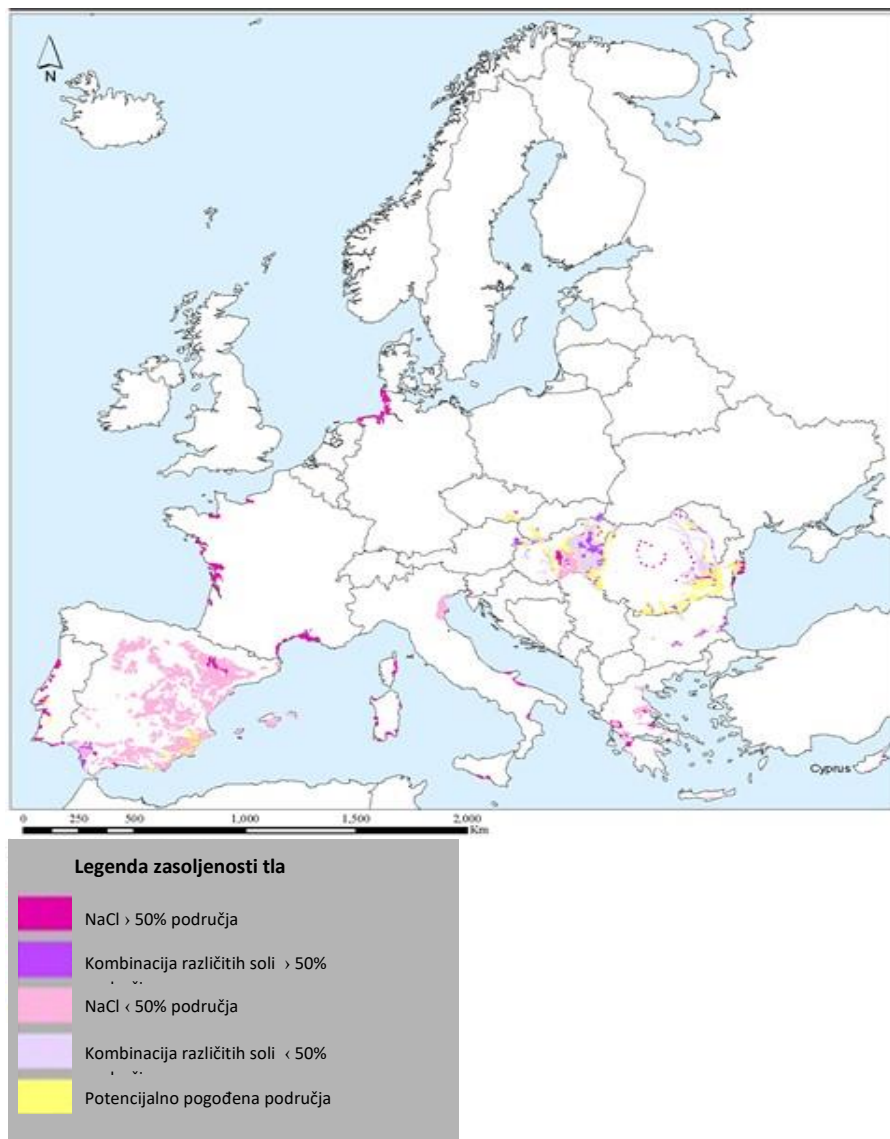
1.3.1. Povećani salinitet tla i utjecaj solnog stresa na rast i razvoj biljaka

Povećani salinitet tla je sve veći problem u mnogim područjima širom svijeta, osobito u polusušnom i sušnom Mediteranu (Munns i sur. 2015) (**Slika 10**). Više od 7% ukupne svjetske površine tla i oko 20% navodnjavanih tala je pod utjecajem visokog saliniteta. Buduće projekcije ukazuju na daljnje postupno povećanje suše i zasoljenosti tla, posebno u mediteranskoj regiji (Munns i sur. 2015).

Visoki salinitet tla je stanje koje karakterizira visoka koncentracija topivih soli u tlu, a NaCl je najtopljivija i najrasprostranjenija sol. Tla se klasificiraju kao slana kada je električna vodljivost (EC) 4 dS/m, što odgovara koncentraciji od 40 mM NaCl, ili viša. Pri ovoj koncentraciji soli u tlu, rast i prinos biljnih kultura su značajno reducirani.

Problem saliniteta tla, posebno u mediteranskim zemljama je prisutan odavno, ali je uvođenjem poljoprivredne prakse i navodnjavanja usjeva problem saliniteta tla postao još izraženiji (Zhu, 2001) te predstavlja jedan od najozbiljnijih ograničavajućih čimbenika za rast i razvoj biljaka kao i proizvodnju usjeva. Prema Szabolcs (1990), razlikujemo dva tipa tla s obzirom na prisutnost soli: (1) slana tla koja sadrže topive soli, uglavnom NaCl i Na₂SO₄, a mogu također imati i značajne količine Cl⁻ i SO₄²⁻ kao i Ca²⁺ i Mg²⁺, sadrže dovoljno neutralnih topivih soli koje mogu negativno djelovati na rast i razvoj većine usjeva; (2) natrijeva tla su tla koja sadrže Na⁺ soli sposobne za alkalnu hidrolizu, a najzastupljeniji je Na₂CO₃. Nadalje, razlikujemo primarni ili prirodni salinitet te sekundarni ili ljudski uvjetovan salinitet (Parihar i sur., 2015). Primarni salinitet rezultat je nakupljanja soli tijekom dužeg perioda kroz prirodne procese u tlu ili putem podzemnih voda. Uzrokuju ga dva prirodna procesa: (1) je ispiranje prirodnih materijala koji sadrže topive soli, gdje uslijed vremenskih (ne)prilika dolazi do razbijanja stijena i otpuštanja topivih soli raznih vrsta, a najzastupljeniji su kloridi, natrij, kalcij i magnezij, te u manjoj mjeri sulfati i karbonati; (2) prijenos morske soli putem vjetera ili oborina, gdje je najzastupljeniji NaCl. Sekundarni salinitet je rezultat ljudskih aktivnosti koje mijenjaju hidrološku ravnotežu tla, a odnosi se na omjer prirodne količine oborina i navodnjavanja

(Parihar i sur., 2015). Najčešći uzroci su: (1) čišćenje zemlje i zamjena višegodišnjih usjeva s jednogodišnjim kulturama i (2) sheme navodnjavanja koje koriste vodu bogatu solju ili nema dovoljno drenaže.



Slika 10. Zasoljenost tla u Europi (preuzeto iz European Soil Database, 2008).

Štetan učinak viška minerala, kao što su Na^+ i Cl^- , na biljke naziva se solni stres (Munns i sur., 2015). Solni stres je složeni abiotički stres koji generira tri nepovoljna uvjeta za rast i razvoj biljaka: osmotski stres zbog povezanog smanjenja unosa vode, ionski stres uzrokovan toksičnim koncentracijama iona (uglavnom Na^+) i oksidativni stres uglavnom potaknut povećanim razinama ROS (Liang i sur. 2018).

Kod osmotskog stresa, biljke pri negativnom vodnom potencijalu tla ne mogu primati vodu niti održati balans između apsorpcije vode i transpiracije. Soli smanjuju osmotski potencijal vode iz tla, zbog čega, kako bi se nastavio dotok vode u biljku, njeni listovi moraju imati još niži osmotski potencijal. Taj problem biljaka, kada u zemlji ima vode a biljke ju ne mogu apsorbirati u dovoljnoj količini, zove se fiziološka suša.

Za ionski stres je karakteristično da biljke ne mogu spriječiti pasivno primanje soli, naročito Na^+ . Povećana ukupna količina soli u stanicama i poremećen odnos Na^+ i K^+ inaktivira mnoge enzime i inhibira pojedine metaboličke procese. Na^+ ioni mogu zamijeniti Ca^{2+} ione u membrani, mijenjajući tako propusnost membrane i uzrokujući "curenje" K^+ iona iz stanice.

Nadalje oksidativni stres praćen je povećanim stvaranjem ROS-eva koji štetno djeluju na rast i razvoj biljke. Oksidativni stres uzrokuje različita oštećenja staničnih struktura, uključujući lipide, proteine i nukleinske kiseline, što u konačnici može dovesti i do smrti stanice.

Solni stres nepovoljno utječe na sve glavne procese u biljaka kao što je klijanje, rast, proces fotosinteze, ravnoteža hranjivih sastojaka, i u konačnici razvoj plodova i prinosa. Utvrđeno je da salinitet štetno djeluje na procese klijanja u raznim biljkama, uključujući i kupusnjače (Parihar i sur., 2015). Bordi (2010) je objavio da se postotak klijavosti u kupusnjača značajno smanjio pri koncentraciji od 150 i 200 mM NaCl. Također, dobro je poznato da povećani salinitet negativno utječe na nutritivnu opskrbu biljke. Takvi negativni utjecaji mogu biti posljedica djelovanja saliniteta na dostupnost hranjivih tvari, njihov transport te distribuciju unutar biljke. Brojna istraživanja pokazala su da povećani salinitet smanjuje unos i nakupljanje hranjivih tvari u biljaka. Sve te promjene u konačnici dovode do značajnih ekonomskih gubitaka u proizvodnji različitih poljoprivrednih kultura uključujući i kulture iz porodice Brassicaceae (Zhang i sur. 2019).

Na temelju dosadašnjih istraživanja može se zaključiti da solni stres ima veliki utjecaj na brojne procese kod biljaka kao i na njihov prinos. Iz toga razloga postoji izuzetna potreba za detaljnim istraživanjima utjecaja solnog stresa na rast biljaka kao i mehanizme tolerancije s ciljem povećanja produktivnosti usjeva u uvjetima povećanog saliniteta.

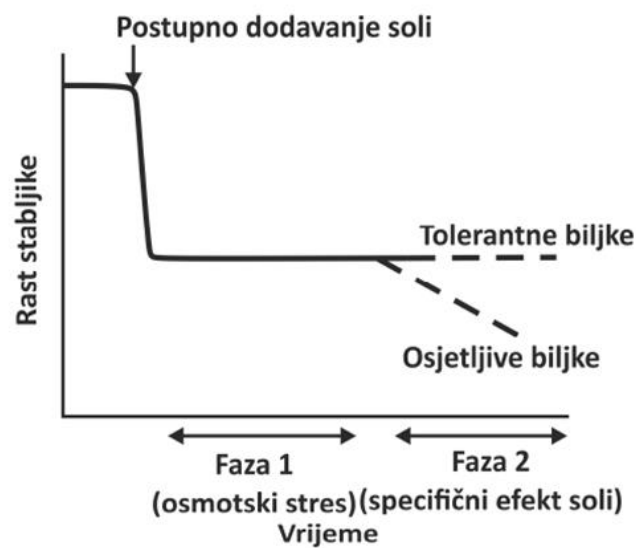
1.4. OBRAMBENI MEHANIZMI BILJAKA PROTIV NEPOVOLJNIH OKOLIŠNIH UVJETA

Biljke koriste različite strategije kako bi izbjegle negativne učinke različitih čimbenika abiotskog stresa uključujući i solni stres. Najčešći odgovor biljaka na nepovoljne okolišne uvjete je usporavanja rasta i metabolizma kako bi se povećala mogućnost preživljavanja u nepovoljnim uvjetima. Promjene koje se mogu sažeti kao odgovor biljaka na solni stres su:

- usporeni rast
- smanjeni rast u dužinu, a pojačano zadebljavanje organa biljke
- ubrzana diferencijacije i starenje stanica
- smanjenje suhe tvari nadzemnog dijela biljke
- pogoršana homeostaza iona uz moguć nedostatak K^+ uslijed antagonizma s Na^+
- povećanje mehaničkog i žilnog tkiva
- smanjenje broja puči na jedinicu površine, smanjenja površine lista (list je deblji)
- promjene sadržaja fotosintetskih pigmenata, antocijana, nukleinskih kiselina.

Dosadašnja istraživanja pokazala su da postoji dvofazni odgovor biljaka na osmotski i ionski efekt solnog stresa (**Slika 11**). U fazi I, uslijed osmotskog stresa, povećava se koncentracija soli oko korijena i dolazi do brze redukcije rasta (prvenstveno se inhibira rast novih izdanaka i listova jer su oni znatno osjetljiviji na osmotski stres). U toku faze II, redukcija rasta je rezultat akumulacije soli u listovima, što dovodi do toksičnog efekta ili ionskog stresa. Tokom ove faze

produkcija biomase, kao i efikasnost fotosintetskog aparata uvelike su smanjeni a ubrzan je proces starenja biljnog organizma (Serrano i Rodriguez-Navarro, 2001).



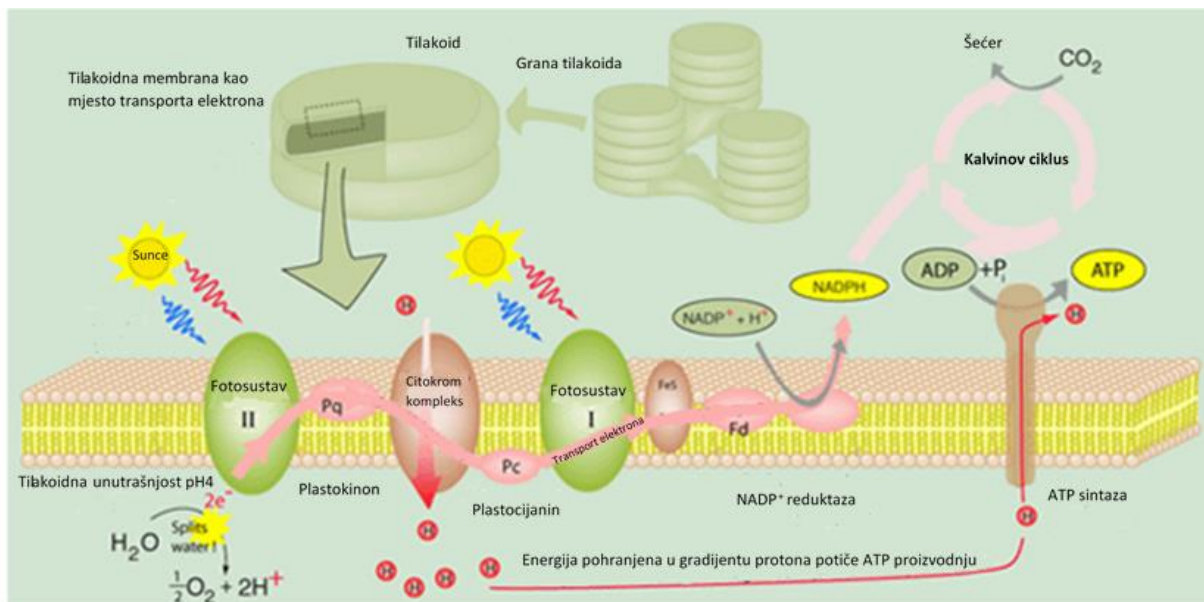
Slika 11. Dvofazna reakcija biljaka na toksičnost soli u tlu: primjer rasta stabljike (Munns, 2015.)

Na **slici 11** također je prikazan primjer rasta stabljike kod tolerantnijih i osjetljivijih vrsta na solni stres s obzirom na dvije faze odgovora biljaka. U obje vrste smanjuje se rast stabljike u fazi I tj. uslijed djelovanja osmotskog stresa. Kod osjetljivih vrsta dolazi do dodatne inhibicije rasta stabljike u fazi II s obzirom na tolerantnije vrste (Munns, 2015).

Prema mogućnostima toleriranja visoke koncentracije soli u tlu, biljke se mogu podijeliti u dvije velike skupine: 1. halofiti – rastu na zaslanjenim tlima (završavaju svoj životni ciklus na zaslanjenim tlima); 2. glikofiti ili nehalofiti – ne mogu tolerirati visoke koncentracije soli. Biljke posjeduju različite mehanizme koji im omogućuju toleriranje visokih koncentracija soli. Enzimi izolirani iz halofita i glikofita jednako su osjetljivi na visoke koncentracije soli, što upućuje na to da halofiti ne posjeduju metabolizam tolerantan na soli, nego je riječ o posebnim mehanizmima izbjegavanja oštećenja uslijed povišenog saliniteta. Tolerantne biljke posjeduju tzv. Casparyeve pruge koje služe kao morfološka prepreka koja onemogućuje apoplastni prolazak vode i otopljenih tvari u ksilem. Biljke umanjuju stres uzrokovan visokim koncentracijama soli tako što sprečavaju ulazak soli u meristeme, osobito u vršni meristem izdanka te u listove koji intenzivno rastu i vrše fotosintezu. Kod biljaka osjetljivih na soli tolerantnost ovisi o stupnju do kojeg korijen može spriječiti ulazak soli i njegov transport do nadzemnih dijelova. Te biljke nemaju ili imaju manji broj Casparyevih pruga, što može biti jedan od razloga veće osjetljivosti na povećanu koncentraciju soli (Lazarević i Poljak, 2019). Odgovori biljaka na solni stres su složeni i uključuju širok raspon procesa gdje dolazi do prilagodbe fotosintetskog sustava, aktiviraju se antioksidacijski odgovori te također dolazi do akumulacija specijaliziranih metabolita, promjene u ekspresiji gena kao i promjene enzimske aktivnosti.

1.4.1. Utjecaj solnog stresa na fotosintetski aparat

Fotosinteza je jedan od najvažnijih metaboličkih procesa u biljkama. Fotosintetski procesi sastoje se od dvije odvojene grupe reakcija: svjetlosnih ili primarnih reakcija i sekundarnih reakcija, neovisnih o svjetlosti. U primarnim reakcijama fotosinteze nastaju NADPH i ATP te molekularni kisik fotokemijskom oksidacijom vode. Transport elektrona od vode do NADP^+ događa se djelovanjem četiri proteinska kompleksa uklopljena u tilakoidne membrane: fotosustav II (PSII), citokrom *b6f* kompleks, fotosustav I (PSI) i ATP-sintaza (**Slika 12**).



Slika 12. Shematski prikaz fotosintetskog lanca transporta elektrona i strukturalne organizacije proteinskih kompleksa koji su uključeni u prijenos elektrona i protona preko tilakoidnih membrana (preuzeto iz Karp, 2008).

PSI i ATP-sintaza nalaze se na stroma tilakoidima i rubnim dijelovima grana tilakoida, a PSII na grana tilakoidima dok je citokrom *b6f* kompleks jednoliko raspoređen između stroma i grana tilakoida (Mlinarić i sur., 2017).

Kod biljaka koje su izložene solnom stresu dolazi do smanjenja fotosintetske učinkovitosti, prvenstveno zbog osmotskog stresa ali i zbog toksičnog djelovanja iona Na^+ i/ili Cl^- . Spomenuti ioni se akumuliraju u kloroplastima što direktno utječe na klorofile, biljne pigmente, koji imaju važnu ulogu u procesu fotosinteze i samim time dolazi do inhibicije fotosintetskog sustava. Smanjenje sadržaja klorofila u solnom stresu navedeno je u raznim studijama kao indikator staničnog metaboličkog stanja (Chutipaijit i sur., 2012). Amirjani (2012) objavio je da je sadržaj klorofila *a* i klorofila *b* značajno smanjen prilikom izlaganja biljaka 200 mM koncentraciji NaCl. Saha i sur. (2010) zabilježili su linearni pad razine pigmenta prilikom tretmana biljaka s rastućim koncentracijama NaCl. Obično postoji dominacija klorofila *a* nad klorofilom *b* u biljkama, ali njihove vrijednosti postaju sve bliže kako se povećava koncentracija soli.

Fotosustav II (PS II) je osjetljiv na solni stres te je primijećeno značajno smanjenje njegove učinkovitosti kao i transportnog lanca elektrona (ETC) i stope asimilacije CO₂ (Piotr i Grazyna 2005). Demetriou i sur. (2007) povezali su promjene u fotosintetskoj učinkovitosti u biljaka izloženih solnom stresu, a koje su rezultirale smanjenjem produkcije biomase. Brojna istraživanja potkrepljuju činjenicu da solni stres utječe na fotosintetski aparat a time i na rast i razvoj biljaka te na njihove prinose, uključujući i kupusnjače. Također, objavili su da solni stres kod kupusnjača utječe na učinkovitost PSII i na D1 protein. Točnije, D1 protein ima važnu ulogu u reakcijama prijenosa elektrona i cijepanja vode gdje zajedno s proteinom D2 čini dimer i kao takvi predstavljaju jezgru reakcijskog središta PSII. Također, postoje i drugi faktori koji smanjuju učinkovitost fotosinteze kod biljaka izloženima uvjetima solnog stresa, kao što su: dehidracija staničnih membrana čime se smanjuje njihova propusnost za CO₂, toksični učinak soli, ubrzano starenje biljnih stanica, promjene u aktivnosti enzima izazvane oštećenjima citoplazmatske strukture i sl. (Iyengar i Reddy 1996).

1.4.2. Ionska homeostaza u biljkama u odgovoru na solni stres

Prisustvo topljivih soli u tlu uz unos i metabolizam mineralnih hranjivih tvari je od esencijalnog značaja za biljke. Odgovarajući omjeri iona predstavljaju fiziološki alat odgovora biljaka vezan uz njihov rast i razvoj (Wang i sur., 2003).

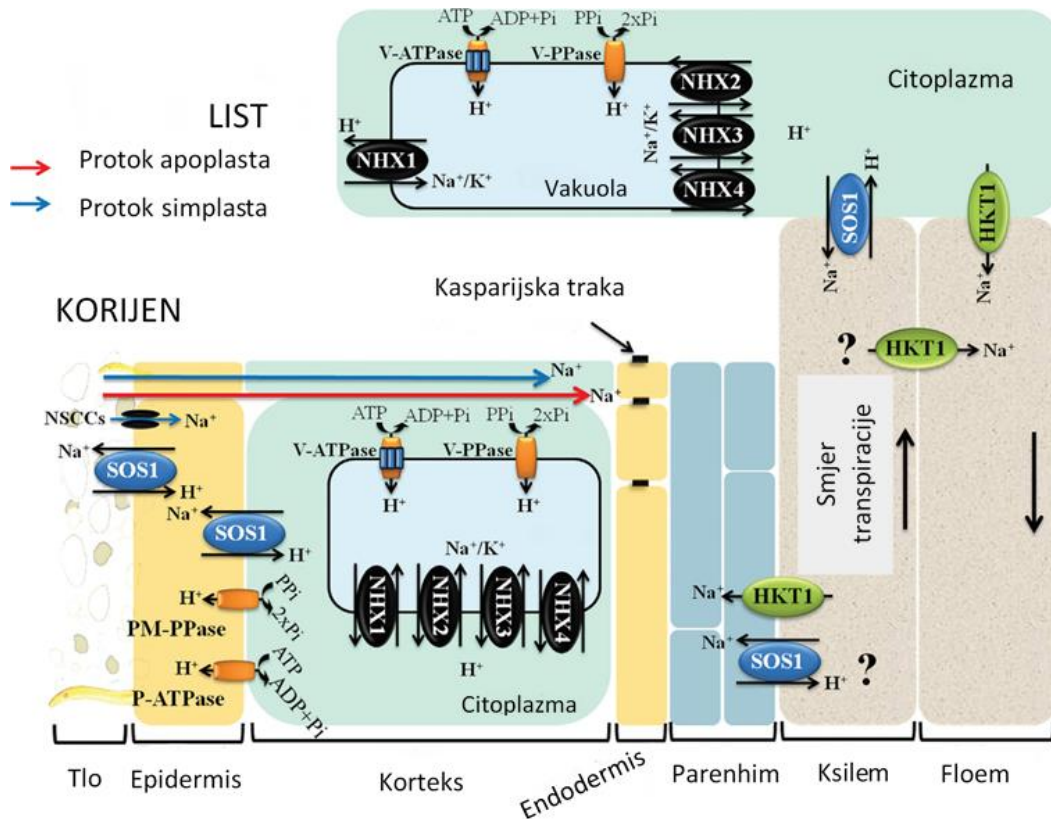
Povećani salinitet uzrokovan visokim koncentracijama Na⁺, Cl⁻ ili sulfata (SO₄²⁻), izaziva tzv. specifične toksične učinke iona čime dolazi do smanjenog unosa esencijalnih hranjivih tvari poput fosfora (P), kalija (K⁺), dušika (N), i kalcij (Ca²⁺). Salinitet uzrokuje povećanje koncentracije Na⁺ u biljkama dok je omjer Na⁺/K⁺ povećan čime se stvara negativan odnos između Na⁺ i K⁺. Pored toga, mnogi štetni učinci Na⁺ vezani su uz strukturni i funkcionalni integritet membrana (Kurth i sur., 1986). Pri visokim koncentracijama Na⁺ dolazi do poremećaja rada enzima i sinteze proteina. Na⁺ može istisnuti ione Ca²⁺ iz stanične membrane te promijeniti njenu permeabilnost. Nakupljanjem Cl⁻ i Na⁺ u kloroplastima dolazi do inhibicije fotosinteze (Khan i sur., 2014).

Tavakkoli i sur. (2017) istraživali su toksični efekt akumulacije Na⁺ i Cl⁻ iona u biljkama uzgajanima pri različitim koncentracijama soli te su pokazali da visoka akumulacija Na⁺ i Cl⁻ iona odvojeno inhibira rast biljaka. Činjenica je da biljke koje rastu na tlima s povećanom koncentracijom soli akumuliraju Na⁺ i Cl⁻ te toksični efekt Cl⁻ iona uzrokuje inhibiciju rasta.

Ioni natrija ulaze u korijen pasivno, zbog čega stanice korijena moraju uložiti energiju (aktivni transport) žele li izbaciti Na⁺ ponovno u otopinu tla. S druge strane, stanična membrana zbog svog negativnog električnog potencijala slabo je propusna za ione klorida. Daljnje smanjenje ulaska, odnosno transporta Na⁺ u nadzemne organe odvija se u ksilemu, gdje se ioni natrija apsorbiraju u stanice koje okružuju ksilem i tako smanjuju koncentraciju Na⁺ u transpiracijskom toku (Khan i sur., 2014). Neke biljne vrste posjeduju solne žlijezde, koje se najčešće nalaze na listovima. Kod tih se biljaka ioni apsorbiraju iz ksilemskog toka i transportiraju u takve žlijezde. Žlijezde izlučuju višak soli na površinu organa (listova), gdje dolazi do kristalizacije soli. Osim tih mehanizama, kao što je već navedeno, da bi biljke mogle normalno usvajati vodu iz zaslanjenih tala, njihove stanice moraju proći osmotsku prilagodbu. Osmotska prilagodba predstavlja snižavanje osmotskog potencijala kako bi se snizio vodni

potencijal stanice. Padu osmotskog potencijala doprinose dva procesa u stanicama: povećanje koncentracije iona u vakuolama i sinteza kompatibilnih osmotski aktivnih tvari u citosolu (Manchanda i Garg, 2011).

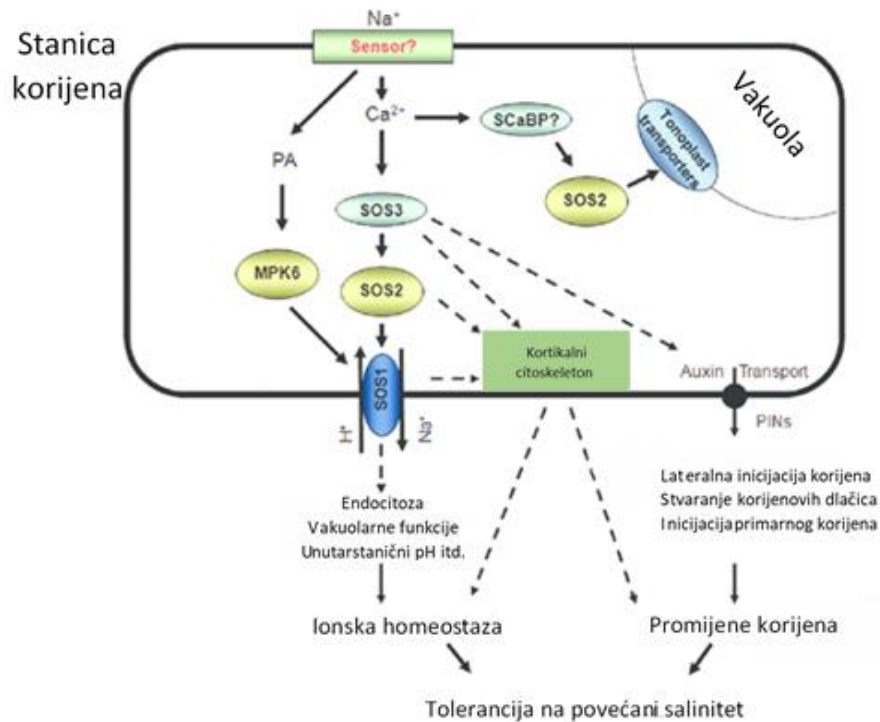
Visoke koncentracije Na^+ smanjuju unos K^+ i Ca^{2+} te je smanjena učinkovitost fotosintetskog sustava zbog smanjene stomatalne provodljivosti, dok visoka koncentracija Cl^- iona smanjuje fotosintetsku sposobnost zbog degradacije klorofila (Tavakkoli i sur. 2017). Mehanizam održavanja homeostaze i nadvladavanje ionske toksičnosti uslijed solnog stresa, prikazan je na **Slici 13**.



Slika 13. Shematski prikaz ključnih membranskih transportera, kanala i pumpa koji posreduju u Na^+ i K^+ homeostazi u biljkama izloženima solnom stresu (prilagođeno prema Roy i sur., 2014).

Prema prikazanoj shemi, Na^+/H^+ antiporter SOS1 izbacuje Na^+ na površinu korijenja, smanjujući na taj način priljev Na^+ . U parenhimskim stanicama ksilema nalaze se HKT1-slični proteini. Upravo ti proteini reguliraju translokaciju Na^+ u korijen i izdanke, te sprečavaju akumulaciju Na^+ u izdancima. Također, HKT-1 slični proteini omogućuju prijenos Na^+ iz ksilema u floem. U uvjetima visoke koncentracije soli SOS1 posreduje u izbacivanju Na^+ iz ksilema. U korijenu i izdancima Na^+ je pohranjen u središnjoj vakuoli putem tonoplast-lokaliziranih NHX izmjenjivača (NHX1-4). Permeabilna membrana (PM) sa svojim enzimskim komponentama H^+ -ATPase (P-ATPase), PM H^+ -PPase (PM-PPase), tonoplast H^+ -ATPase (V-ATPase) i tonoplast H^+ -PPase (V-PPase) stvaraju elektrokemijski potencijal za sekundarni aktivni transport (**Slika 13**).

Od svih do danas poznatih molekularnih komponenti i signalnih putova najbolje je proučen SOS (The Salt Overly Sensitive) signalni put. Prema ovom modelu, kao odgovor na porast Na^+ , dolazi do povećanja količine slobodnog Ca^{2+} u citoplazmi (**Slika 14**). Izvorno se smatralo da se SOS signalni put, kao i drugi signalni putevi, bazira na linearnom sustavu gdje se od nepoznatog Na^+ senzora prenosi signal preko SOS3 i SOS2 kako bi se aktivirao SOS1 i time omogućio prijenos Na^+/H^+ u stanicu.



Slika 14. Model SOS signalizacije u korteksu korijena tj. epidermalnoj stanici za održavanje ionske homeostaze. Pune strelice označavaju uspostavljene, poznate regulacije, dokisprekidane linije označavaju predložene veze između prikazanih komponenti na temelju dosadašnjih istraživanja (preuzeto i modificirano iz Pardo i sur., 2013).

Međutim, istraživanja tijekom godina pokazala su da je SOS put razgranat, uključuje dodatne funkcije i predstavlja unakrsnu točku s drugim signalnim putovima. Prijenos SOS signala više podsjeća na mrežu signalnih komponenti, omogućujući sudjelovanje brojnih senzora stresa koji se modificiraju od strane nekoliko komponenti istovremeno. Takve signalne mreže funkcioniraju tako da omogućuju velike promjene u stanicama, tkivima, organima ali utječu i na razvojna obilježja biljaka (Pardo i sur., 2013). Tolerancija na ionski stres podrazumijeva redukciju soli koja dopijeva u biljku ili dolazi do povećanja tolerancije na prisutnu količinu soli kako bi se izbjegao toksični efekt iona. Najbitnije je da se održi ionska homeostaza citoplazme te da se održi niska koncentracija Na^+ u citoplazmi, tako što će se smanjiti njegov dotok. Posebno je značajna akumulacija Na^+ u vakuoli, što je također pod utjecajem SOS signalnog puta (Nieves-Cordones i sur., 2018).

1.4.3. Osmoprotektant prolin u odgovoru na solni stres

Tolerancija na osmotski stres podrazumijeva sposobnost biljke da tolerira pojavu dehidracije koja nastaje za vrijeme solnog stresa. Tijekom osmotske prilagodbe dolazi do aktivnog nakupljanja iona u vakuolama i sinteze organskih spojeva što smanjuje osmotski potencijal. Također, dolazi i do nakupljanja organskih spojeva, tzv. kompatibilnih osmolita ili osmoprotektanata. U te spojeve ubrajaju se različiti organski spojevi (aminokiseline, polihidroksilni alkoholi, kvarterni amonijevi spojevi) koji su visoko topljivi i neutralno nabijeni te ne ometaju metabolizam. Prolin i glicin beatin igraju najvažniju ulogu među osmoprotektantima (Csonka i sur., 2014).

Prolin se može sintetizirati iz glutamata ili iz ornitina, ali u uvjetima osmotskog stresa glavni prekursor za sintezu je glutamat. Enzimi za sintezu nalaze se u citosolu i plastidima, a razgradnja se odvija u mitohondrijima. Kontrola nakupljanja prolina kao kompatibilnog osmolita uključuje povećanu sintezu i smanjenu razgradnju regulacijom transkripcije enzima Δ^1 -pirulin-5-karboksilat reduktaza, zadnjeg enzima u biosintezi i smanjenjem ekspresije prolina dehidrogenaze, prvog enzima u razgradnji (Verbruggen i Hermans, 2008). Istraživanjem na vrsti *Arabidopsis thaliana* pokazalo se da inaktivacijom enzima Δ^1 -pirulin-5-karboksilat reduktaze, dolazi do smanjenja sinteze i nakupljanja prolina, biljke su postale osjetljive na stres te je došlo do stvaranja više reaktivnih oblika kisika i produkta lipidne peroksidacije. S druge strane, povećanjem ekspresije enzima za sintezu prolina povećalo se nakupljanje te aminokiseline (Csonka i sur., 2014). Također, u nekim istraživanjima proučavano je kako prolin, koji se egzogeno dodaje u medij u kojem raste *Arabidopsis thaliana*, utječe na rast i razvoj tih biljaka. U ovom slučaju, dokazano je da egzogeno dodavanje prolina ima negativan utjecaj jer je utvrđeno povećano nakupljanje reaktivnih oblika kisika, smanjeni rast i smanjena tolerancija na stresne uvjete. Egzogeno dodavanje prolina može uzrokovati i staničnu smrt zbog toksičnosti, no nije poznato uzrokuje li toksičnost egzogeni prolin ili nakupljanje razgradnog produkta pirulin-5-karboksilata (Verbruggen i Hermans, 2008).

Prolin sudjeluje u smanjenju kiselosti citoplazme kao i u povoljnom održavanju omjera $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ za odvijanje metaboličkih reakcija kao što su stanično disanje, reakcije puta pentoza fosfata te fotosintetske reakcije. Naime, tijekom stresnih uvjeta puči u biljaka su zatvorene, čime je smanjena dostupnost atmosferskog CO_2 te je smanjeno iskorištavanje NADPH u Calvinovom ciklusu. Aktivnost pirulin-5-karboksilat sintaze reciklira NADP^+ , zadnjeg akceptora u lancu prijenosa elektrona kako bi se fotosintetski procesi odvijali neometano i smanjila količina reaktivnih oblika kisika. Prolin sudjeluje i u neutralizaciji reaktivnih oblika stabilizacijom antioksidacijskih enzima kao što su askorbat peroksidaza i glutation reduktaza (Csonka i sur., 2014). Prolin ima ulogu neenzimatskog antioksidansa u prisutnosti nekih ROS čestica tj. neutralizira hidroksilni radikal i vodikov peroksid, dok u prisutnosti singletnog kisika ne pokazuje takvu funkciju (Turkan i sur., 2014).

Prolin kao molekularni šaperon stabilizira strukturu proteina, ima ulogu u prijenosu reducirajućih ekvivalenata između staničnih odjeljaka te služi za skladištenje dušika i ugljika. Osim u uvjetima osmotskog stresa, do nakupljanja prolina dolazi i u uvjetima oksidativnog stresa te zbog prisutnosti viška teških metala, zaraze patogena, onečišćenja atmosfere i UV zračenja. Prisutnost vodikovog peroksida u stanici u uvjetima stresa također inducira

ekspresiju gena Δ^1 -pirulin-5-karboksilat reduktaze (Yang i sur., 2014). U tom slučaju, koncentracije prolina u stanici mogu biti i do 100 puta veće nego u normalnim uvjetima.

1.4.4. Antioksidacijski odgovori biljaka, enzimatski i ne-enzimatski, na solni stres

Reaktivne kisikove čestice (ROS) nastaju u biljkama kao normalni nusprodukti tijekom mnogih metaboličkih reakcija, kao što su fotosinteza i disanje. Ukoliko dođe do neravnoteže između produkcije ROS-eva i antioksidacijske obrane u biljnoj stanici nastaje stanje oksidativnog stresa. Tijekom stresa, elektroni iz visokoenergetskog stanja prenose se do molekularnog kisika (O_2) te formiraju reaktivne kisikove čestice (ROS). ROS, poput singletnog kisika (1O_2), superoksidni ioni (O_2^-) i peroksidi, od kojih je najzastupljeniji vodikov peroksid (H_2O_2), toksične su molekule (Triantaphylidès i sur., 2008). Slobodni radikali ili ROS čestice su kemijske strukture koje imaju kratki vijek trajanja jer sadrže nesparene elektrone. Takva nepotpuna elektronska konfiguracija ih čini nestabilnima i izrazito reaktivnima. To im omogućuje da mogu donirati ili primiti elektron od drugih molekula, ponašajući se kao oksidansi ili reducensi. Stvaranje ROS-eva izaziva lančanu reakciju koja dovodi do oštećenja stanica. Najčešće ROS mete su molekule velike molekulske mase, kao što su membranski lipidi ili mitohondrijska DNA, pri čemu se stvaraju lipidni ili nukleotidni peroksidi. ROS čestice mogu izazvati oštećenje gotovo svih staničnih makromolekula (Tuteja i sur., 2008). U stresnim uvjetima koncentracija ROS-eva u kloroplastima, mitohondrijama i peroksisomima je povišena do razina koje mogu biti opasne za biljke u odnosu na normalne uvjete rasta. S ciljem uklanjanja suvišnih ROS čestica generiranih u uvjetima stresa, biljne stanice su razvile sustav ne-enzimskih i enzimskih antioksidanasa. Također ih neki autori klasificiraju na direktne koji odgovaraju ne-enzimskim i indirektno (enzimske) antioksidanse (Kapoor sur., 2019). Mohammadi i sur. (2018) pokazali su da zajedničko djelovanje enzimskih i ne-enzimskih mehanizama imaju važnu ulogu u toleranciji biljaka na povećani salinitet.

Direktni antioksidansi su reducirajuće vrste s kratkim vremenom poluraspada koje se troše u procesu oksidacije te se moraju regenerirati da bi se mogle ponovo aktivirati u zaštiti od oksidativnog stresa. Većina polifenola su direktni antioksidansi uključeni u različite antioksidacijske reakcije, od redukcije oksidansa do stvaranja citoprotektivnih proteina i endogenih izravnih antioksidansa kao što je glutathion. Stoga je zaštita od oksidativnog stresa od strane polifenola i njihovih derivata uglavnom posljedica njihova neizravnog antioksidacijskog djelovanja (Mohammadi i sur., 2018). Ostali niskomolekularni antioksidansi kao što su glutathion, vitamin E, karotenoidi, flavonoidi, fenoli itd. također neenzimski reagiraju sa slobodnim radikalima, ali sami postaju slabo reaktivni radikali (Kapoor sur., 2019).

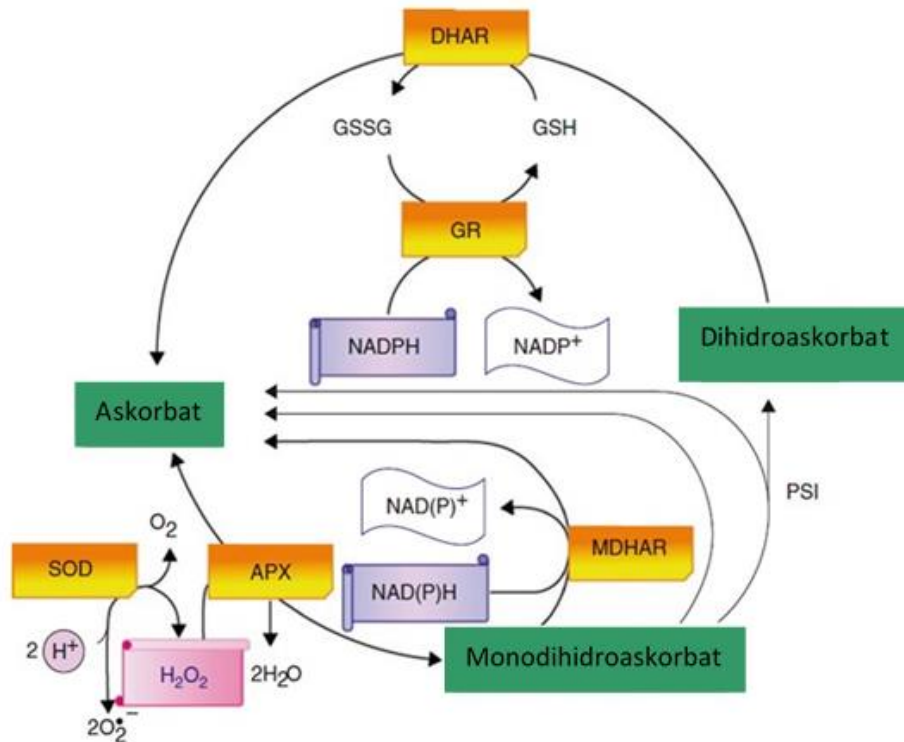
Za razliku od njih, indirektni antioksidansi, koji mogu ali i ne moraju biti reducirajuće vrste, ispoljavaju antioksidacijsku aktivnost putem regulacije različitih spojeva i proteina kao što su NAD(P)H, NAD(P)H kinon-oksido-reduktaza 1 (NQOR1), superoksid-dismutaza (SOD), glutathion-S-transferaza (GST), glutathion-peroksidaza (GPx), hem oksigenaza-1 (HO1), glutamat-cistein ligaza (GCL), katalaza (CAT) i tioredoksin (Trx). Ovi spojevi i enzimi poznati su i kao "ultimativni antioksidanti" jer imaju relativno dugo vrijeme poluraspada, ne troše se u tijekom antioksidacijske aktivnosti, mogu katalizirati razne reakcije detoksikacije i regenerirati neke od izravnih antioksidansa (Gómez-Cadenas i sur., 2016).

Enzimski antioksidansi, poput superoksid dismutaze (SOD), katalaze (CAT) i askorbat peroksidaze (APX), predstavljaju glavne antioksidacijske enzime u obrani biljaka koje su izložene solnom stresu (Gómez-Cadenas i sur., 2016). Značajno povećanje aktivnosti CAT i APX enzima izmjereno je kod graška koji su rasli na tlima s električnom vodljivošću od 12 dS/m (120 mM NaCl). Nadalje, aktivnost SOD i CAT enzima se značajno povećava u listovima pri koncentraciji soli od 200 mM NaCl (Farhangi-Abriz i Torabian, 2017). Istraživanja na biljkama graška i riže te kupusa (*Brassica oleracea* L.) dokazala su povećanu aktivnost enzima SOD, CAT i APX kao i prolina u uvjetima solnog stresa. Mnoge komparativne studije koje su koristile genotipove otporne i osjetljive na sol, toleranciju na sol pripisale su povećanoj aktivnosti antioksidacijskih enzima (Ghaderi i sur., 2016).

Posebno važan proces koji u biljaka omogućuje uklanjanje suviška ROS čestica u uvjetima stresa je askorbat-glutationski (Asc-GSH) ciklus. On uključuje niz enzima kao što su askorbat-peroksidaza (APX), monodehidroaskorbat-reduktaza (MDHAR), dehidroaskorbat-reduktaza (DHAR) i glutation-reduktaza (GR) koji imaju ključnu ulogu u održavanju razine antioksidanasa askorbinske kiseline (Asc) i glutationa (GSH) u njihovim reduciranim oblicima u kloroplastima i ostalim staničnim odjeljcima kao što su citosol, mitohondriji, apoplast i peroksisomi (Esfandiari i sur., 2007) (**Slika 15**).

Optimalne količine askorbata (Asc) u stanicama održavaju se ravnotežom između sinteze, recikliranja i katabolizma. U aerobnim uvjetima Asc u stanicama oksidira u mono-dehidro-askorbatni radikal (MDHA), koji se može reducirati natrag u Asc djelovanjem NAD(P)-ovisne mono-dehidro-askorbat reduktaze (MDHAR). Ta reakcija je posebno brza pri niskoj pH vrijednosti. DHA se spontano i ireverzibilno hidrolizira u 2,3-diketogulonsku kiselinu ako se prije ne reciklira natrag u Asc djelovanjem dehidroaskorbat reduktaze (DHAR) koja koristi glutation (GSH) kao reducens. Budući da je DHA vrlo nestabilna pri pH vrijednosti višoj od 7, potrebno je održavati zalihe Asc u reducirajućem obliku kako bi se spriječio njen gubitak i na taj način DHAR doprinosi regulaciji redoks stanja u stanicama.

DHAR povezuje askorbat i glutation, još jedan važan antioksidans u biljnoj stanici. Te reakcije zajedno čine askorbat-glutationski ciklus (Esfandiari i sur., 2007). Antioksidativno djelovanje Asc ima za posljedicu nakupljanje MDHA i DHA. Dva enzima kataliziraju oksidaciju askorbata: askorbat oksidaza (AO) i askorbat peroksidaza (APX). Asc se sintetizira u reducirajućem obliku, a zatim ju oksidira AO ili APX. AO je smještena u apoplastu i oksidira Asc u MDHA istovremeno reducirajući molekularni kisik u vodu, a povezana je s metabolizmom sastojaka stanične stijenke i rastom stanice. APX je prisutna u različitim staničnim odjeljcima, a oksidira askorbat i istovremeno reducira vodikov peroksid (H_2O_2) u vodu pri čemu se nakuplja MDHA. Ta reakcija je važna u zaštiti od oksidativnog oštećenja. MDHA i DHA, koji se nakupljaju kao rezultat aktivnosti AO i APX, moraju biti učinkovito reciklirani kako bi se održavala zaliha Asc u reducirajućem obliku (Sofa i sur., 2015). Asc izravno neenzimski reagira s O_2^- , H_2O_2 , i 1O_2 , daje elektrone radikalima stvarajući pritom MDHA i DHA.



Slika 15. Askorbat- glutation ciklus u biljkama. Askorbat peroksidaza (APX), dehidro-askorbat reduktaza (DHAR), mono-dehidro-askorbat reduktaza (MDHAR) i glutation reduktaza (GR) (preuzeto iz Sofo i sur., 2015).

U spomenutom ciklusu, enzimi koji izravnom katalizom uklanjaju ROS su SOD, APX, GPX i CAT. Aktivnost APX je inducirana abiotičkim stresnim čimbenicima, a rezultira povećanjem tolerancije na te čimbenike održavanjem zaliha reducirane Asc. Povećava se i aktivnost enzima CAT, SOD i GSH reduktaze. Suprotno tome, stres izazvan povećanim salinitetom smanjuje udio Asc u biljkama uglavnom zbog ionskih i osmotskih promjena. Smatra se da je Asc u apoplastu uključena u percepciju i provođenje signala iz okoliša, te zaštitu stanične membrane. Reducirano stanje Asc kao i oksidirano stanje DHA djeluju kao signali u regulaciji interakcije između biljke i stresnih čimbenika u svrhu postizanja veće otpornosti na stres. Biljke s niskom proizvodnjom Asc su osjetljivije na različite stresne uvjete što utječe na njihov rast, razvoj i produktivnost (Sofo i sur., 2015).

1.4.5. Uloga specijalizirani metabolita u odgovoru kupusnjača na solni stres

U kupusnjača, važnu ulogu u obrani od stresnih stanja, pa tako i od povećanog saliniteta, imaju specijalizirani metaboliti (fenolni spojevi i glukozinolati). Poznato je da se akumuliraju kao odgovor na različite biotske i abiotске čimbenike stresa te se smatraju ključnim obrambenim spojevima koji pomažu u eliminaciji štetnih utjecaja ROS-eva (Singh i sur., 2012).

Fenolni spojevi

Sadržaj fenolnih spojeva u uvjetima povećane koncentracije soli uvelike ovisi o vrsti biljke te vrsti biljnog tkiva, dozi soli, vremenu izloženosti povećanom salinitetu i početnim razinama fenolnih spojeva u biljkama (Waśkiewicz i sur. 2013).

Kod biljaka izloženih abiotskom stresu dolazi do povećane sinteze polifenola poput fenolnih kiselina i flavonoida kako bi se biljke lakše nosile s promjenama okoliša (suša, solni stres, teški metali, slanost, visoke ili niske temperature i UV zračenje). Polifenolni spojevi uključujući fenolne kiseline mogu neutralizirati reaktivne kisikove čestice (ROS), čime štite biljne stanice od štetnih učinaka oksidativnog stresa te na taj način omogućuju biljci opstanak. Biosinteza fenola u stresnim okruženjima regulirana je izmijenjenim djelovanjem različitih ključnih enzima fenilpropanoidnog biosintetskog puta poput PAL i CHS. Međutim, osim promijene razine aktivnosti enzima, dolazi do povećanja razine transkripata ključnih za biosintezu enzima kao što su PAL, C4H, 4CL, CHS, CHI, F3H, F3'H, DFR i FLS (Sharma i sur., 2019).

Glukozinolati

Glukozinolati su specijalizirani metaboliti specifični za kupusnjače. Izlaganje solnom stresu uzrokuje porast koncentracije glukozinolata u kupusnjača (Neugart i sur., 2018). Glukozinolati se nalaze u svim djelovima biljke, ali u različitim koncentracijama i oblicima. Sadržaj glukozinolata u nekim dijelovima biljke roda *Brassica* iznosi oko 1% s obzirom na masu suhe tvari, mada sadržaj može biti promjenjiv i dostići čak 10% u sjemenu. Najčešće biljka sadrži 2-5 različita glukozinolata, međutim može ih biti i znatno više, primjerice u lišću i sjemenu uročnjaka (*A. thaliana*) identificirana su čak 34 različita glukozinolata (Clarke, 2010).

Martínez-Ballesta i sur., 2015 istražili su učinak alifatskih glukozinolata na sadržaj vode u biljaka kao i njihov rast u uvjetima povećane koncentracije soli. Istraživanja su provedena na mutantama *A. thaliana* u biosintezi alifatskih glukozinolata, pri čemu su korištene jednostruka *myb28* i dvostruka *myb28myb29* mutanta. Jednostruka mutant *myb28* ima smanjenu razinu kratkolančanih alifatskih glukozinolata, dok su dugolančani alifatski glukozinolati u potpunosti odsutni, a dvostrukoj mutanti *myb28myb29* u potpunosti nedostaju alifatski glukozinolati, u usporedbi s divljim tipom Col-0 (WT). Rezultati tretmana solnim stresom su pokazali povećanje sadržaja alifatskih glukozinolata kod divljeg tipa i mutanta *myb28*. Razina indolnih glukozinolata značajno je viša u dvostrukoj mutanti *myb28myb29* u usporedbi s divljim tipom i mutantom *myb28* u kontrolnim uvjetima, ali izlaganje solnom stresu uzrokuje smanjenje njihove koncentracije u dvostrukom mutantu dok u divljem tipa i *myb28* ostaju nepromijenjeni. U usporedbi sa WT, dvostruki mutant *myb29myb29* je osjetljiviji na izlaganje solnom stresu, dok između *myb28* mutanta i WT nisu primijećene značajnije razlike.

Pokazalo se da se sadržaj glukozinolata povećava u biljkama izloženih solnom stresu ovisno o vrsti i razvojnom stadiju. Kod biljaka izloženih solnom stresu sadržaj glukozinolata izraženiji je u mladim listovima, najvjerojatnije zbog veće *de novo* sinteze, u odnosu na starije listove (López-Berenguer i sur., 2009). U drugoj je studiji pokazano da je prisutan različit sastav glukozinolata u različitim razvojnim fazama halofita *Thellungiella* izloženog solnom stresu iz čega se može zaključiti da bi se glukozinolati mogli sintetizirati *de novo* tijekom procesa rasta

(Pang i sur., 2012). López-Berenguer i sur. (2009) objavili su da salinitet (40 mM NaCl) povećava ukupan sadržaj glukozinolata kod brokule, dok koncentracija soli od 80 mM NaCl uzrokuju smanjenje sadržaja glukozinolaza. Nastavno na prijašnja istraživanja, Wang i sur. (2010) uočili su porast glukozinolata u rotkvi u skladu s rastućom koncentracijom aplicirane soli NaCl (10 mM, 50 mM i 100 mM). Ti bi se rezultati mogli povezati sa snažnom promjenom metabolizma usredotočenog na prilagođavanje turgora što dovodi do inhibicije rasta. Također, pretpostavlja se da je povećanje glukozinolata povezano sa sintezom osmoprotektivnih spojeva (López-Berenguer i sur. 2009).

1.5. CILJ I SVRHA ISTRAŽIVANJA

Klimatske promjene u kombinaciji s povećanjem svjetske populacije razlog su za sve većom potrebom istraživanja u smjeru selekcije poljoprivrednih kultura s povećanom tolerancijom na čimbenike abiotskog stresa. U prilagodbi biljaka na nepovoljne okolišne uvjete sudjeluju specijalizirani metaboliti, ali je njihova uloga u tim procesima slabo istražena. U skladu s tim, cilj nam je istražiti ulogu specijaliziranih metabolita (glukozinolata, karotenoide, polifenola) s posebnim naglaskom na fenolne kiseline u odgovoru kupusnjača na solni stres. Istraživanja su provedena na globalno važnim kulturama: kineskom kupusu (*B. rapa L. ssp. pekinensis*), bijelom kupusu (*B. oleracea var. capitata*) i raštici (*B. oleracea var. acephala*) koje su različito tolerantne na solni stres. Povećani salinitet uzrokuje promjene u rastu i razvoju biljaka te negativno djeluje na procesa kao što su vodna bilanca, homeostaza mineralnih iona, fotosinteza itd. Sve te promjene u konačnici dovode do značajnih ekonomskih gubitaka u proizvodnji usjeva. Kupusnjače (Brassicaceae) uključuju mnoge ekonomski važne vrste koje se uzgajaju širom svijeta. Kako se usjevi kupusnjača obično uzgajaju u mediteranskom području, njihova proizvodnja uvelike je pogođena nepovoljnim uvjetima okoliša (abiotičkim stresovima, uključujući povećani salinitet). Stoga je pitanje, kako povećani salinitet utječe na rast komercijalno važnih kultura kupusnjača i koji mehanizmi sudjeluju u toleranciji ovih vrsta na slanost.

Ciljevi ovog istraživanja su:

- 1) Okarakterizirati odgovor klijanaca i tri tjedna starih biljaka kupusnjača uzgojenih i tretiranih hidroponski (kineski kupus, bijeli kupus i raštika) na izlaganje kratkoročnom stresu (24h) izazvanom natrijevim kloridom (NaCl) te utvrditi stupanj tolerancije ovih kultura na salinitet.
- 2) Odrediti grupe specijaliziranih metabolita (karotenoide, glukozinolate i polifenolne spojeve) i antioksidacijske aktivnosti te odrediti njihove promjene uslijed stresa; odrediti profil i dinamiku fenolnih kiselina te izmjeriti aktivnosti enzima fenilpropanoidnog puta.
- 3) Odrediti funkcije gena uključenih u fenilpropanoidni put koristeći mutante uročnjaka (*Arabidopsis thaliana*) u uvjetima solnog stresa prateći fenotip mutanata.
- 4) Utvrditi korelacije između tolerancije i specijaliziranih metabolita u kupusnjača.

2. MATRIJALI I METODE

2.1. BILJNI MATERIJAL

Istraživanja su provedena na odabranim vrstama iz porodice Brassicaceae za koje je pethodnim istraživanjima utvrđeno da imaju različitu toleranciju na solni stres: kineski kupus (*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*), bijeli kupus (*Brassica oleracea* var. *capitata* cv. Varaždinski) i raštika (*Brassica oleracea* var. *acephala*) (Pavlović i sur. 2019.). Istraživanja su provedena na klijancima i 3-4 tjedna starim hidroponski uzgojenim biljkama.

Sjeme kineskog kupusa (*B. rapa* spp. *pekinensis*) kupljeno je od ovlaštenog proizvođača sjemena International Seeds Processing GmbH, Njemačka. Sjeme bijelog kupusa (*B. oleracea* var. *capitata*) dobiveno je od Poljoprivredne savjetodavne službe Varaždinske županije dok je sjeme raštike (*B. oleracea* var. *acephala*) nabavljeno od obiteljske farme iz Vrgorca.

Funkcionalna istraživanja provedena su na uročnjaku (*Arabidopsis thaliana*). Sjeme mutanti uročnjaka (*A. thaliana*) s mutacijom u jednom ili više gena fenilpropanoidnog puta nabavljeni su iz Europskog centra za pohranu linija uročnjaka (Nottingham Arabidopsis Stock Centre, NASC) (**Tablica 3**). Mutante su kreirane u ekotipu uročnjaka (*A. thaliana*) Col-0.

Tablica 3. Popis mutanti uročnjaka (*A. thaliana*) nabavljenih iz Europskog centra za pohranu linija uročnjaka (Nottingham Arabidopsis Stock Centre, NASC) korištenih za funkcionalna istraživanja.117

Naziv mutante	NASC kod	Opis	Izvor
<i>fah1-7</i> (CS8604)	N8604	- 1x mutant na alelu <i>fah1-7</i> - alel <i>fah 1-7</i> smješten na lokusu AT4G36220. - kodira enzim ferulat-5-hidroksilazu, smješten u endoplazmatskom retikulumu. - Funkcije: 1. značajan za biosintezu lignina; 2. uloga u zaštiti od UV-B. - nema posebnih uvjeta za rast	Chapple i sur., 1992
<i>fah1-7, tt3-1</i> (CS8603)	N8603	- 2x mutant na alelima <i>fah1-7</i> i <i>tt3-1</i> ; - alel <i>fah 1-7</i> smješten na lokusu AT4G36220, alel <i>tt3-1</i> smješten na lokusu AT5G42800. – kodiraju enzime ferulat-5-hidroksilazu i dihidoflavanol reduktazu. - Funkcije: 1. katalizira pretvorbu dihidrokvercetina u leukocijanidin u biosintezi antocijana; 2. uključen u fenilpropanoidni mjetabolizam -Mutanta nema posebnih uvjeta za rast	Sheahan i Rechnitz, 1993
<i>PAL1</i> (SALK_022804C)	N656265	- <i>PAL1</i> gen smješten na lokusu AT2G37040 - kodira fenilalaninamonij liazu 1 (<i>PAL1</i>)	Alonso i sur., 2003

		- Funkcije: 1. katalizira pretvorbu L-fenilalanina do cimetne kiseline - nema posebnih uvjeta rasta	
<i>PAL2</i> (SALK_092252C)	N669929	- <i>PAL2</i> alel smješten je na lokusu AT3G53260 - kodira fenilalaninamonij liazu 2 (<i>PAL2</i>) - Funkcije: 1. katalizira pretvorbu L-fenilalanina do cimetne kiseline - nema posebne uvjete za rast	Alonso i sur., 2003
<i>PAL3</i> (SALK_205612C)	N694848	- <i>PAL3</i> alel smješten na lokusu AT5G04230 - kodira fenilalaninamonij liazu 3 (<i>PAL3</i>) - Funkcije: 1. katalizira pretvorbu L-fenilalanina do cimetne kiseline - nema posebne uvjete za rast	Alonso i sur., 2003
<i>PAL4</i> (SALK_070702C)	N666381	- <i>PAL4</i> alel smješten na lokusu AT3G10340 - kodira fenilalaninamonij liazu 4 (<i>PAL4</i>) - Funkcije: 1. katalizira pretvorbu L-fenilalanina do cimetne kiseline - nema posebne uvjete za rast	Alonso i sur., 2003
<i>COMT</i> (SALK_135290C)	N664080	- <i>COMT</i> gen smješten na lokusu AT5G54160 - kodira flavanol 3-O-metiltransferazu - Funkcije: katalizira kava kiselinu u 5-hidroksiferulinsku kiselinu - nema posebne uvjete za rast	Alonso i sur., 2003

2.2. HRANIDBENE PODLOGE ZA UZGOJ KLIJANACA I TRETMANE

Za naklijavanje sjemena kupusnjača, kao i za kontrolne podloge uz solne tretmane korištene su krute podloge koje su sadržavale 1% agara. Za pripremu podloga korišten je Plant Agar (Duchefa Biochemie) i destilirana voda. Za solne tretmane korištene su agarozne podloge (1%) uz dodatak NaCl (Kemika) konačnih koncentracija 50, 100 i 200 mM.

Za naklijavanje i uzgoj kontrole uročnjaka (*A. thaliana*) korištene su krute MS podloge (Murashige i Skoog, 1962), MS0. Podloge su pripravljene koristeći komercijalnu smjesu mikro- i makro-elemata (Duchefa Biochemie) prema uputama proizvođača, 1,4% agar (Plant agar, Duchefa Biochemie), 1% saharozu (Kemika) i destiliranu vodu. Vrijednost pH podloge podešena je prije dodavanja agara na 5,7. Za tretmane uročnjaka solnim stresom u MS0 podlogu dodana je sol NaCl do konačne koncentracije 150 mM (MS+NaCl).

Prije korištenja sve podloge su sterilizirane autoklaviranjem pri temperaturi 120°C i tlaku 1,5 atm u trajanju od 20 minuta. Ohlađene otopine (oko 60°C) razdijeljene su u sterilne Petrijeve

zdjelice (oko 20 mL otopine po zdjelici) ili kvadratne sterilne pločice (oko 30 mL) te su pohranjene na 4 °C do upotrebe.

2.3. UZGOJ BILNOG MATERIJALA I APLIKACIJA STRESA

2.3.1. Uzgoj i tretman klijanaca kineskog kupusa, bijelog kupusa i raštike solnim stresom

Sjeme kupusnjača od interesa sterilizirano je u otopini 3%-tnog Izosana G u vodi (Pliva, Hrvatska) 10 min, isprano sterilnom vodom (5 puta) te preneseno u Petrijeve zdjelice koje su sadržavale 1% agar prethodno pripremljene kao što je opisano u prethodnom poglavlju (2.2. Hranidbene podloge) i ostavljeno na 4 °C tijekom 72h u mraku. Petrijeve zdjelice sa sjemenom prebačene su u vertikalnom položaju u komoru za uzgoj biljaka pod kontroliranim uvjetima fotoperioda (16h dan/8h noć), intenziteta svjetlosti od $115 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ i temperature 22 °C. Nakon što su klijanci dosegli duljinu od oko 1 cm, postavljeni su na 1% agarske ploče koje sadrže NaCl (u koncentracijskom rasponu od 0 do 200 mM) tijekom 24h. Svježi biljni materijal služio je za praćenje morfoloških parametara i analizu ROS čestica. Ostatak biljnog materijala smrznut je u tekućem dušiku i pohranjen na -80 °C. Dio materijala je liofiliziran (Steris Lyovac GT 2) i korišten za UV/VIS spektrofotometrijske i UHPLC-MS/MS analize dok je smrznuti biljni materijal korišten je za enzimske analize i analize transkripata gena.

2.3.2. Hidroponski uzgoj i tretman biljaka kineskog kupusa, bijelog kupusa i raštike solnim stresom

Klijanci spomenutih kupusnjača, stari tri dana, postavljeni su u hidroponski uzgoj u komori za uzgoj biljaka u kontroliranim uvjetima pri temperaturi 22 °C i fotoperiodu 16h dan/8h noć. Hidroponski sustav činilo je 8 posuda od 5,5 L opremljenih aeropumpama te se u svakoj posudi moglo uzgojiti po 8 biljaka (**Slika 16**). Tijekom uzgoja, biljke su prihranjivane komercionalno dostupnim hranjivima Flora (GHE Hydroponics), dodanim direktno u vodu prema uputama proizvođača (**Slika 17**). Prema tome, 1,8 mL svakog pojedinog hranjiva dodano je na dan postavljanja hidroponskog uzgoja i isti volumen na 7. dan uzgoja, dok je 3,4 mL svakog pojedinog hranjiva dodano 14. dan uzgoja.

Prije aplikacije solnog stresa kineski kupus uzgajan je tri tjedna dok su biljke bijelog kupusa i raštike uzgajane četiri tjedna. Razlog različitog trajanja uzgoja je postizanje istog razvojnog stadija tj. faze od četiri potpuno razvijena lista. Potom su biljke izložene solnom stresu (50-200 mM NaCl) u usporedbi s kontrolom u trajanju od 24h. Primjena solnog stresa postignuta je postepenim podizanjem koncentracije NaCl svaka dva sata za 25 ili 50 mM pri čemu je korištena 3M otopina NaCl.

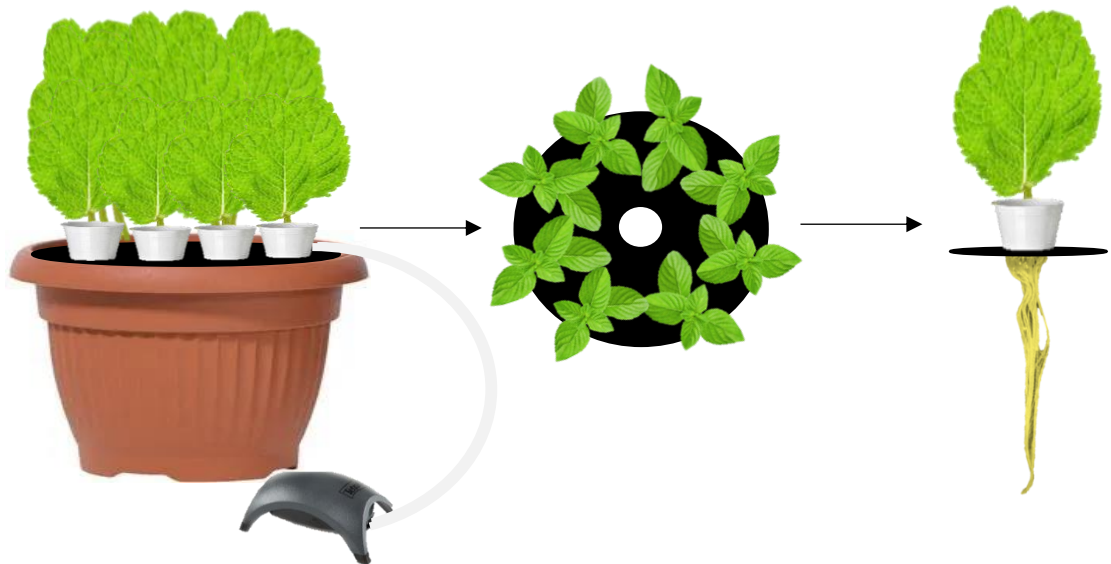
Postupak podizanja koncentracije soli vršio se ovim redoslijedom:

hidroponska otopina + 2 × 46 mL 3M NaCl (uz 2h prilagodbe između dodavanja soli) = 50 mM NaCl hidroponska otopina (24 h tretmana)

50 mM NaCl hidroponska otopina + 2 × 46 mL 3M NaCl (uz 2h prilagodbe između dodavanja soli) = 100 mM NaCl hidroponska otopina (24 h tretmana)

100 mM NaCl hidroponska otopina + 2 × 92 mL 3M NaCl (uz 2 sata prilagodbe između dodavanja soli) = 200 mM hidroponska otopina (24 h tretmana)

Biljke su uzorkovane 24 sata nakon aplikacije solnog stresa gdje su netretirane biljke (bez aplikacije soli) služile kao kontrola. Prilikom uzorkovanja posebno su odvojeni listovi i korijen, smrznuti u tekućem dušiku i pohranjeni na -80 °C. Za UV/VIS spektrofotometrijske i UHPLC-MS/MS analize koristio se liofilizirani materijal.



Slika 16. Skica hidroponskog uzgoja biljaka.

GHE
eurohydro.com

Flora Series
HYDRO, AERO, COCO

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	...
	18 H ☀			12 H ☀							
ml/10 L	☀			☀ - 🍊							
FloraGro	2,5	2,5	7	15	15	5	5	5	5		
FloraMicro	2,5	2,5	7	10	10	10	10	10	10	10	
FloraBloom	2,5	2,5	7	5	5	15	15	15	15		

Slika 17. Prikaz hranjiva korištenih u hidroponskom uzgoju i tablica doziranja.

2.3.3. Pred-tretman biljaka kineskog kupusa fenolnim kiselinama u svrhu poboljšanja tolerancije na stres

Rezultati analiza fenolnih kiselina u kineskom kupusu (*B. rapa* ssp. *pekinensis*), bijelom kupusu (*B. oleracea* var. *capitata* cv. Varaždinski) i raštici (*B. oleracea* var. *acephala*) uslijed solnog stresa u ovom radu ukazali su na ulogu fenolnih kiselina (salicilne kiseline, sinapinske kiseline i ferulinske kiseline) u toleranciji na solni stres. Na osnovu tih nalaza, biljke kineskog kupusa kao najosjetljivije vrsta od ovdje analiziranih, uzgojene su hidroponski, te predtretirane spomenutim fenolnim kiselinama u eksperimentima aplikacije solnog stresa.

Detaljnije, sjeme kineskog kupusa sterilizirano je kao što je opisano u poglavlju 2.3.1. Klijanci veličine oko 1 cm postavljeni su u hidroponski uzgoj te su uzgojene biljke kao što je opisano u poglavlju 2.3.2. Nakon 5 tjedana uzgoja biljke su folijarno pred-tretirane fenolnim kiselinama: salicilnom, sinapinskom i ferulinskom kiselinom u rasponu koncentracija 10, 50 i 100 μM . Tretman destiliranom vodom poslužio je kao kontrola. Ti pred-tretmani su započeti 24h prije aplikacije solnog stresa (150 mM NaCl) i nastavljeni su slijedeća 4 dana (jednom dnevno u isto vrijeme). Kao kontrola poslužile su jednako stare biljke koje nisu tretirane NaCl. Biljke su tretirane u trajanju 4 dana (tretmani su aplicirani u isto vrijeme), nakon čega su mjereni fotosintetski parametri *in vitro* (opisano u poglavlju 2.4.3.) te su biljke uzorkovane u tekućem dušiku i pohranjene na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Biljni materijal je liofiliziran i takav korišten za analize markera stresa i specijaliziranih metabolita.

2.3.4. Uzgoj uročnjaka *A. thaliana* u svrhu funkcionalnih istraživanja

Sjeme divljeg tipa uročnjaka kao i mutanti u jednom ili više gena fenilpropanoidnog biosintetskog puta (**Tablica 3**, poglavlje 2.1.) tretirano je 70% EtOH (2 min), isprano sterilnom vodom, sterilizirano u 1% Izosan G (10 min) te isprano 5 puta sterilnom vodom. Sterilizirano sjeme prebačeno je na prethodno pripremljene krute MS0 podloge i stavljeno 4 dana na bubrenje ($+4\text{ }^{\circ}\text{C}$) kako bi se postiglo ujednačeno klijanje. Nakon perioda bubrenja sjeme je prebačeno u komoru za rast u vertikalnoj poziciji u uvjetima dugog dana (16 h dan/8 h noć) i temperaturi od $22\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Klijanci stari 7 dana, veličine oko 1 cm, presađeni su u sterilnim uvjetima (u komori s protokom sterilnog zraka) na kvadratne ploče s MS0 hranjivom podlogom (kontrola) i MS+NaCl ploče (uz dodatak 150 mM NaCl). Klijanci su inkubirani u vertikalnom položaju u komori za uzgoj biljaka pri već spomenutim uvjetima oko 12 dana. Pločice s klijancima su skenirane (Canon scanner) i klijanci analizirani pomoću programa EZ Rhizo II (Armengaud i sur. 2009).

2.4. Analize odgovora kupusnjača na solni stres

U svrhu evaluacije odgovora spomenutih kupusnjača na solni stres mjereni su osnovni morfološki i biokemijski parametri stresa koji su prethodnim istraživanjima definirani kao pouzdani markeri stresa (npr. inhibicija rasta korijena i prirast biomase kao morfološki markeri, te omjer Na^+/K^+ , koncentracija prolina, fotosintetska učinkovitost te antioksidacijski odgovor kao biokemijski markeri).

2.4.1. Morfološki markeri stresa

Kao pouzdani pokazatelji nepovoljnog utjecaja solnog stresa na biljke utvrđeni su inhibicija rasta korijena i smanjeni prirast biomase. Stoga su ti parametri praćeni kao pokazatelji osjetljivosti biljaka na solni stres.

Klijanci su uzgojeni i tretirani NaCl-om u rasponu koncentracija 0-200 mM kao što je opisano u poglavlju 2.3.1.

Inhibicija rasta korijena kao i prirast izračunati su prema formulama te izraženi u postocima:

$$\text{Prirast korijena (\%)} = \frac{\Delta d \text{ NaCl}}{\Delta d \text{ kontrola}} \times 100;$$

$$\text{Inhibicija rasta korijena (\%)} = 100 - \text{prirast}$$

Δd NaCl - prirast korijena klijanaca nakon 24 h tretmana NaCl

Δd kontrola - prirast korijena kontrolnih klijanaca nakon 24h

Prinos biomase izražen je upotrebom sljedeće formule i izražen u postotku:

$$\text{Prirast biomase (\%)} = \frac{m \text{ NaCl}}{m \text{ kontrola}} \times 100$$

m NaCl - masa klijanaca izloženih solnom tretmanu tijekom 24 h

m kontrola = masa kontrolnih klijanaca tijekom 24 h rasta

2.4.2. Biokemijski markeri stresa

2.4.2.1. ICP-MS analiza kationa

Razine Na^+ i K^+ u klijancima kupusnjača tretiranim NaCl-om i odgovarajućim netretiranim kontrolama određene su metodom masene spektrometrije s induktivno spregnutom plazmom visoke rezolucije (HR-ICP-MS, Element 2, Thermo, Bremen, Njemačka) povezane autosamplerom ESI SC-2 DX FAST (Elemental Scientific, SAD). Kao interni standard korišteni su indij dok su parametri mjerenja i uvjeti instrumenta postavljeni prema Fiket i sur. (2016). Mjerenja su realizirana servisnom uslugom u okviru Instituta Ruđer Bošković.

Liofilizirano tkivo sve tri vrste kupusnjača homogenizirano je u tekućem dušiku u fini prah. Potom je 100 mg biljnog materijala prebaćeno u 6,1 mL kiselog medija kojeg čini HNO_3 :HF, 6:0,1 (v:v) i izloženo mikrovalovima u trajanju od 40 min (Anton Paar Multiwave 3000, Graz, Austrija). Prvih 20 min postupno se podizala snaga zraćenja do konačnih 1400 W dok su preostalih 20 min uzorci tretirani na maksimalnoj snazi.

2.4.2.2. Određivanje sadržaja prolina

Koncentracije prolina u tretiranim i netretiranim uzorcima određene su prema Carillo i Gibon (2011) uz određene modifikacije. Ekstrakcija 30 mg liofiliziranog biljnog materijala provedena je u 70 % etanolu. U 1 mL reakcijske smjese (1% ninhydrin u 60% octenoj kiselini i 20% etanolu) dodano je 100 μL ekstrakta ili standarda, sadržaj je promještan korištenjem vorteksa (Tehtnica

Željeznici) zagrijan 20 minuta na 95 °C u termobloku (Stuart SBH200D/3), potom ohlađen na ledu te prebačen u kivetu za spektrofotometrijska mjerenja.

Sadržaj prolina detektiran je mjerenjem apsorbancije korištenjem UV/VIS spektrofotometra (Shimatzu) pri valnoj duljini $\lambda=530$ nm.

Koncentracija prolina određena je putem prethodno kreirane baždarne krivulje gdje se koristila 10 mM otopina prolina od koje su napravljena razrjeđenja od 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 1 i 1.5 mM. Rezultati su izraženi kao $\mu\text{mol L-prolina po suhoj masi } (\mu\text{mol /mg s.m.})$.

2.4.2.3. Određivanje fotosintetske učinkovitosti

Parametri fotosinteze, fotosintetske učinkovitost (PI_{ABS}) i maksimalni kvantni prinos fotosustava II (F_v/F_m) (Strasser i sur. 2004) koji daju informaciju o funkcioniranju fotosintetskog aparata poslužili su kao pouzdani markeri praćenja odgovora biljaka kineskog kupusa na pred-tretmane s različitim koncentracijama fenolnih kiselina (salicilna, sinapinska i ferulinske kiselina) i aplikacije solnog stresa. Navedeni parametri izmjereni su metodom polifaznog rasta fluorescencije klorofila a (OJIP) pomoću uređaja Plant Efficiency Analyser (PEA Hansatech, Engleska) (Pavlović i sur. 2019). Mjerenje je provedeno *in vivo* na hidroponski uzgojenim biljkama kineskog kupusa. Prije mjerenja fluorescencije pomoću specijalnih kopči, listovi biljaka kineskog kupusa prilagođeni su na uvjete tame kroz pola sata. Indukcija fluorescencije klorofila postiže se primjenom crvene saturacijske svjetlosti (650 nm, 3000 $\mu\text{mol}_{\text{fotona}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$) uz mjerenje promjena intenziteta fluorescencije tijekom 1s.

2.4.2.4. Određivanje reaktivnih kisikovih čestica (ROS) i glutationa

Reaktivne kisikove čestice (SO , H_2O_2), kao i sadržaj GSH u klijancima određen je *in vivo* uz upotrebu specifičnih fluorescentnih boja koje u prisustvu spomenutih ROS čestica proizvode specifičnu fluorescenciju (Radić Brkanac i sur., 2015). Preparati su analizirani fluorescencijskim mikroskopom pri povećanjima 20 \times i 40 \times (Olympus BX51, Olympus Optical Co. (Europa) GmbH) povezanim s kamerom (Olympus DP70, Tokio, Japan) i s računalom.

Sva mjerenja provedena su na korijenu klijanaca kod tri vrsta kupusnjača: kineski kupus, bijeli kupus i raštika podvrgnutih solnom stresu (50-200 mM NaCl), u usporedbi s njihovim odgovarajućim kontrolama. Određivanje superoksidnog radikala ($\text{O}_2^{\cdot-}$) provedeno je inkubacijom korijena klijanaca s 10 μM dihidroetidijem (DHE), 30 min, 24 °C, u mraku. Procesom inkubacije DHE ulazi u stanicu i pretvara se u fluorescentni etidij uz pomoć reaktivnih kisikovih čestica. Nakon inkubacije, preparat je pokriven pokrovnim stakalcem te je analiziran tj. praćena je crvena fluorescencija pri ekscitaciji $\lambda=565$ nm i emisiji $\lambda=580$ nm

Određivanje vodikovog peroksida (H_2O_2) provedeno je inkubacijom korijena klijanaca s 50 μM 2,7-diklorofluorescin diacetatom (DCFH-DA) u trajanju od 30 min, pri 24°C, u mraku. Spomenuta boja ulazi u biljno tkivo te potom oksidira u fluorescentni 2,7-diklorofluorescin (DCF), koji nastaje kao produkt reakcije primarno s H_2O_2 iako fluorescencija može biti rezultat reakcije i sa superoksidnim i hidroksilnim radikalom. Nakon inkubacije, preparat je prekriven

pokrovnim stakalcem te je praćena zelena fluorescencija pri ekscitaciji $\lambda = 450\text{--}490\text{ nm}$ i emisiji $\lambda = 520\text{ nm}$,

Određivanje glutationa (GSH) provedeno je inkubacijom korijena klijanaca s $50\ \mu\text{M}$ monoklorbiaminom (MCB) u trajanju od 40 min, pri $24\ ^\circ\text{C}$, u mraku. Tokom inkubacije boja ulazi u stanicu te u reakciji koja je potpomognuta enzimom glutation-S-transferazom stvara se fluorescentni adukt s GSH. Po završetku inkubacije, preparat je prekriven pokrovnim stakalcem te je praćena plava fluorescencija pri ekscitaciji $\lambda = 400\text{ nm}$ i emisiji $\lambda = 420\text{ nm}$.

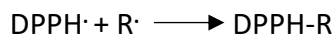
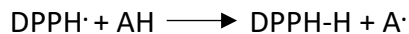
Akumulirani fluorescentni signal kvantificiran je korištenjem softvera Lucida 6.0 (Kinetic Imaging Ltd., Wirral, Velika Britanija). Na svakoj slici analizirano je dvadeset i pet polja, a rezultati su prikazani kao srednja vrijednost intenziteta fluorescencije od pet slika po tretmanu.

2.4.2.5. Određivanje antioksidacijske aktivnosti

Kako bi se utvrdila sposobnost klijanaca i biljaka kupusnjaća od interesa da neutraliziraju ROS čestice akumulirane uslijed solnog stresa, izmjerena je antioksidacijska aktivnost pomoću DPPH i FRAP metoda.

DPPH metoda provedena je prema (Brand-Williams, i sur. 1995.), dok je protokol za FRAP metodu kao mjeru "antioksidacijske snage" preuzet prema Benzie i Strain (1996).

Metoda Brand-Williams bazira se na redukciji DPPH \cdot (2,2-difenil-1-pikril-hidrazil) radikala, kao što je prikazano niže u reakciji.



Spektrofotometrijski se prati smanjenje apsorbancije na valnoj duljini 515 nm u toku reakcije. Brand-Williams ili DPPH metoda temelji se na mehanizmu prijenosa pojedinog elektrona ("single electron transfer mechanism" (SET)) . DPPH radikal je jedan od rijetkih organskih dušikovih radikala koji je vremenski stabilan, intenzivno (ljubičasto) obojen i komercijalno dostupan. U reakciji s antioksidansima, DPPH radikal se reducira u blijedo žuti hidrazinski oblik. Sposobnost antioksidansa da reduciraju DPPH radikal prati se mjerenjem promjene apsorbancije pri $515\text{--}528\text{ nm}$ (Prior i sur., 2005). Prednosti DPPH testa su njegova jednostavnost, brzina, jednostavna instrumentacija (UV-VIS spektrofotometar). Nedostaci testa su topljivost DPPH radikala samo u organskim otapalima (najčešće se koriste niskomolekulski alkoholi), pa je test ograničene primjenjivosti pri određivanju hidrofилnih antioksidansa. Također, apsorbancija DPPH radikala pri 515 nm osim zbog reakcije s antioksidansom može se smanjivati i zbog utjecaja svjetlosti. Prisutnost vode u otapalu može dovesti do pogrešnih rezultata jer dolazi do agregacije ili koagulacije DPPH radikala, zbog čega postaje teže dostupan za reakciju s antioksidansima (Prior i sur., 2005). Antioksidacijska aktivnost ispitivanih uzoraka izražava se na temelju prethodno izrađenog baždarnog pravca gdje se koristi Trolox, ekvivalent vitamina E, kao standard i u odnosu na njega izražavaju sve vrijednosti antioksidacijske aktivnosti. Vrijednosti se stoga izražavaju kao ekvivalent mmol Trolox equivalenata na 1 g suhe mase uzorka (mmol Trolox/g s. m.).

FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) metoda temelji se na sposobnosti antioksidansa da doniranjem elektrona u kiselom mediju (pH 3,6) reduciraju žuti kompleks željeza (III) sa 2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazinom (TPTZ) u plavo obojeni kompleks Fe^{2+} -TPTZ, pri čemu se spektrofotometrijski mjeri intenzitet nastale plave boje pri 593 nm. Intenzitet boje je proporcionalan redukcijskoj sposobnosti antioksidansa (Huang i sur., 2005). Prednosti FRAP testa su jednostavnost, brzina, robusnost i pristupačnost (Prior i sur., 2005). Nedostatak FRAP metode je taj što će svaka komponenta, neovisno o tome ima li antioksidativnu sposobnost ili ne, a posjeduje niži standardni potencijal od redoks-pare (Fe^{3+} -TPTZ)/(Fe^{2+} -TPTZ), dovest do redukcije kompleksa i tako povećati FRAP vrijednost uzorka (tj. dat će lažno veće rezultate). Antioksidacijska aktivnost ispitivanih uzoraka izražava se u mmol Fe^{2+} /g s. m. na temelju prethodno izrađenog baždarnog pravca (raspon koncentracija od 0.1, 0.25, 0.5, 0.75 i 1 mM), a određuje se spektrofotometrijski nakon točno 4 minute mjerenjem apsorbancije pri 593 nm.

2.5. ANALIZA SPECIJALIZIRANIH METABOLITA U KUPUSNJAČA USLIJED SOLNOG STRESA

2.5.1. Mjerenje ukupnih polifenolnih spojeva

Sadržaj ukupnih fenola, ukupnih fenolnih kiselina, ukupnih flavonoida te ukupnih flavanola određen je spektrofotometrijski (koristeći spektrofotometar Shimadzu)

Ekstrakcije su provedene u 2 ml 80% metanola uz korištenje 60 mg liofiliziranog tkiva. Za homogenizaciju tkiva korišten je homogenizator (MM 400, Retsch, Haan, Njemačka) tijekom 5 min pri 30 Hz, potom su ekstrakti stavljeni u sonikator (10 min) i miješani u vertikalnom rotoru za epruvete 1h, 15 o/min). U konačnici, ekstrakti su centrifugirani (Eppendorf 5415R centrifuga, 10 min, 13 000 o/min) te su supernatanti korišteni za sve daljnje analize koje su opisane u nastavku. Sve ekstrakcije provedene su u pet bioloških replika za sve tri vrste kupusnjača.

Za određivanje ukupnih fenola korištena je Folin–Ciocalteu metoda (Singleton i sur., 1965) koja se bazira na reakciji FC reagensa (kompleks fosfomolibdene/fosfovolframne kiseline) s reducirajućim reagensom (fenolnim spojem/antioksidansom). Tijekom reakcije u vremenu od 2 sata ukupni fenolni spojevi u uzorku izreagiraju s FC reagensom pri čemu se razvije plava boja čija se apsorbancija mjeri pri valnoj duljini $\lambda=765$ nm. Rezultati su izračunati koristeći prethodno generiranu baždarnu krivulju koja je napravljena na temelju različitih serija razrjeđenja galne kiseline (200, 400, 800, 1000 i 1400 mg/L) te su dobivene vrijednosti prikazane kao ekvivalenti galne kiseline po suhoj masi (mg GAE/mg s.m.).

Ukupne fenolne kiseline određene su korištenjem Arnou-og reagensa (10% NaNO_2 i 10% Na_2MoO_4 pomiješanog u vodi) prema Europskoj farmakopeji (2004), a rezultati su izračunati korištenjem prethodno formirane baždarne krivulje s rasponom razrjeđenja kava kiseline od 10, 50, 100, 250 i 500 mg/L i izraženih kao ekvivalenti kava kiseline po suhoj masi (mg CAE/mg s.m.).

Za određivanje ukupnih flavonoida korištena je metoda preuzeta i adaptirana prema Zhisten i sur. (1999). Metoda se bazira na svojstvu flavonoida da s aluminijevim kloridom (AlCl_3) tvore obojen kompleks a intenzitet obojenja proporcionalan je količini prisutnih flavonoida. Rezultati su prikazani pomoću prethodno konstruirane baždarne krivulje koristeći otopinu

katehina sa serijom razrjeđenja od 50, 100, 150, 200 i 250 mg/L a dobivene vrijednosti se prikazane kao ekvivalenti katehina po suhoj masi (mg CE/mg s.m.).

Ukupni flavanoli analizirani su metodom s *p*- dimetilaminocinamaldehydom (DMACA) (Šamec i sur. 2014), dok su rezultati izračunati i izraženi na isti način kao što je opisano za ukupne flavonoide koristeći baždarnu krivulju prethodno formiranu s poznatim koncentracijama katehina (0.5, 1, 2, 4, 6, 8 i 10 mg/L) te su dobivene vrijednosti izražene kao ekvivalenti katehina po suhoj masi (mg CE/mg s.m.).

2.5.2. Mjerenje pigmenata: klorofila i karotenoida

Biljni pigmenti, klorofili *a* i *b*, kao i karotenoidi određeni su prema Lichtenthaler i Buschmann (2001) s određenim modifikacijama (Šamec i sur., 2014).

U svrhu mjerenja pigmenata, 100 mg svježeg tkiva, prethodno homogeniziranog u tekućem dušiku koristeći homogenizator (MM 400, Retsch, Haan, Njemačka) uz dodatak metalnih kuglica tijekom 3 min pri 30 Hz, ekstrahirano je u 2 ml 80% acetona. Uzorci su potom centrifugirani (Eppendorf centrifuga, 5 min, 15 000 o/min) te je cijeli postupak ponovljen. Ukupni volumen od 4 mL ekstrakta prebaci se u staklene kivete te mjeri spektrofotometrijski.

Apsorbancije su mjerene pri tri valne duljine, $\lambda = 663,2$ nm za klorofil *a*, $\lambda = 646,8$ nm za klorofil *b* i $\lambda = 470$ nm za ukupne karotenoide. Rezultati su prikazani kao mg/g svježe tvari.

Količina pigmenata izračunata je prema sljedećim formulama:

Klorofil *a*

$$12,25 \times A_{663,2} - 2,79 \times A_{646,8} = \mu\text{g/mL}$$

Klorofil *b*

$$21,5 \times A_{646,8} - 5,1 \times A_{663,2} = \mu\text{g/mL}$$

Ukupni karotenoidi

$$(1000 \times A_{470} - 1,82 \times \text{klorofil } a \text{ } (\mu\text{g/mL}) - 85,02 \times \text{klorofil } b \text{ } (\mu\text{g/mL})) \div 198 = \mu\text{g/mL}$$

Iz osnovnih formula izračunati su nadalje ukupni klorofili (klorofil *a* + klorofil *b*) te omjeri klorofil *a*/klorofil *b* i ukupni klorofili/karotenoidi

2.5.3. Mjerenje glukozinolata

Sadržaj glukozinolata izmjeren je prema De Kok i sur. (2014.), s određenim modifikacijama. Za određivanje koncentracije glukozinolata, 30 mg liofiliziranog tkiva, ekstrahirano je u 80% metanolu. Da bi se inaktivirao enzim mirozinaza, ekstrakti su grijani u termobloku na 95 °C, u trajanju od 2 min, te potom ohlađeni i centrifugirani (Eppendorf 5415R centrifuga, 5 min, 13 000 o/min). Određivanje koncentracije glukozinolata provedeno je mjerenjem apsorbancije pri valnoj duljini $\lambda = 425$ nm. U tom postupku je korištena 2 mM otopina dinatrijevog tetrakloropaladata (Na_2PdCl_4), gdje je Na_2PdCl_4 otopljen u 20 mM HCl. Točnije, za pripremu 25 mL 2 mM otopine odvagano je 14,7 mg Na_2PdCl_4 uz dodatak 42,5 μL konc. HCl i 25 mL vode.

Rezultati su izračunati koristeći prethodno generiranu baždarnu krivulju s rasponom koncentracija sinigrina od 100, 250, 500, 1000, 1500 i 3000 µg/mL te vrijednosti izražene kao ekvivalenti sinigrina po suhoj masi (µg sinigrin/ mg s.m.).

2.5.4. Identifikacija i kvantifikacija pojedinačnih fenolnih kiselina UPLC - MS/MS metodom

Detaljna analiza fenolnih kiselina, slobodnih i konjugiranih u uzorcima kupusnjača realizirana je prema prethodno publiciranoj metodi tekućinske kromatografije visoke učinkovitosti uz masenu spektrometriju (Gruz i sur., 2008). Za analizu fenolnih kiselina, gdje je provedena analiza slobodnih fenolnih kiselina (F1), kiselina hidroliza (F3) i alkalna hidroliza (F4) odvagano je 30 mg liofiliziranog biljnog materijala i to posebno za svaku analizu. Uzorci, neovisno o tipu analize, ekstrahirani su u 750 µL 80% metanola uz dodatak 20 µL smjese internih standarda (10^{-4} M otopina salicilne kiseline i 4- hidroksibenzojeva kiselina). Homogenizacija je provedena u homogenizatoru (MM 400, Retsch, Haan, Njemačka) tijekom 3 minute pri 27 Hz nakon čega su uzorci centrifugirani (Eppendorf 5415R centrifuga, 10 min, 17 000 o/min), prikupljen je supernatant te je postupak ekstrakcije ponovljen još jednom. Uzorci koji su odvagani za F1 analizu ujedno su iskorišteni i za F4 analizu. Za F1 analizu koristila sam dobiveni supernatant, dok se za F4 analizu koristio talog istog uzorka. Kod F3 analize koristi se isključivo dobiveni supernatant.

Za F1 analizu dobiveni supernatant je uparen do suha te je dobiveni talog otopljen u 500 µL 0,1 M mravlje kiseline, uzorci su vorteksirani i stavljeni u ultrasonifikator tokom 5 min. Supernatant F3 analize je uparen do suha te je ostatak otopljen u 500 µL 1M HCl uz vorteks i ultrasonifikator kroz 5 min te su uzorci inkubirani 1h na 80 °C. F4 analiza provedena je na način da je na talog biljnog materijala dodano 400 µL 1M NaOH + 0,5% askorbinske kiseline, uzorak je promiješan koristeći vorteks i ultrasonifikator kroz 5 min, uzorci su inkubirani 3h u mraku pri 25 °C, te potom centrifugirani 5 min, 17 000 o/min. Dobiveni supernatant je prebačen u novu tubicu i dodano je 50 µL 35% HCl. Na tako pripremljene uzorke, neovisno o vrsti analize, dodano je 750 µL di-etil etera, potom je provedena homogenizacija (MM 400, Retsch, Haan, Njemačka) tijekom 5 min pri 10 Hz, uzorci su centrifugirani (2 min, 10 000 o/min), pri čemu su se odvojile organska i vodena faza. Organska faza je prebačena u novu tubicu a u vodenu fazu je ponovno dodan di-etil eter te je cijeli gore navedeni postupak ponovno ponovljen. Sakupljena frakcija di-etil etera je uparena u uparivaču u struji dušika. Talog je otopljen u 200 µL 30% metanola, centrifugiran (5 min, 15 000 o/min) te profiltriran kroz mikrofiltere (0,45 µm) u bočice sa umetcima za UPLC MS/MS analizu.

Za određivanje profila fenolnih kiselina korišten je ACTIVITY Ultra Performance LCTM sustava (Waters, Milford, MA, USA) opremljen PDA 2996 fotodiodnim detektorima (Waters, Milford, MA, SAD) i Micromass Quattro microTM API triple quadrupole masenim spektrometrom (Waters MS Technologies, Manchester, Velika Britanija). Kao izvor ionizirajućeg raspršivanja (ESI) korišteno je Z-raspršivanje u negativnom načinu rada. Uzorci su inicirani u kolonu (BEH C8, 1,7 µm, 2,1 × 150 mm, Waters, Milford, MA), pri 30 °C. Kao pokretna faza korišteno je otapalo B (acetonitril) uravnoteženo s vodenom fazom koju čini 7,5 mM mravlja kiselina (otapalo A) uz protok 250 µL/min. Tlak tijekom kromatografske analize bio je u rasponu od 4000 do 8000 psi. Uzorci su detektirani pomoću PDA detektora (raspon skeniranja 210–600

nm, razlučivost 1,2 nm) nakon čega su dovedeni do izvora elektrosprejnog raspršivanja (temperatura bloka 100 °C, temperatura desolvatacije 350 °C, napon kapilara 2,5 kV, napon konusa 25 V) pri čemu se argon koristio kao plin sudara (energija sudara 16 eV), a dušik kao plin za otapanje (500 L/h).

Za obradu i prikupljanje podataka, kao i za kontrolu instrumenta korišten je MassLynx™ softver (verzija 4.0, Waters, Milford, MA, SAD). Fenolne kiseline u uzorcima detektirane su na osnovu unaprijed optimiziranih parametara koristeći smjese standarda (**Tablica 4**).

Tablica 4. Fenolne kiseline detektirane putem UPLC- MS/MS metode. RT- retencijsko vrijeme izraženo u minutama; MRM- "Multiple reaction monitoring"; LOD- limit detekcije izražen u pmol po injekciji.

Fenolna kiselina	RT (min)	MRM (m/z)	Fragmenti	LOD
galna kiselina (GaA)	2,64	153 > 109	-	3
protokatehinska kiselina (PA)	3,84	153 > 109	-	1
4-hidroksibenzojeva kiselina (4-HBA)	4,84	137 > 93	-	1
kava kiselina (CaA)	5,37	179 > 135	161	3
vanilinska kiselina (VA)	5,44	167 > 152	152, 123	15
siringinska kiselina (SyA)	5,64	197 > 182	182, 167	15
4-kumarinska kiselina (pCoA)	6,55	163 > 119	-	1
sinapinska kiselina (SiA)	7,05	223 > 208	208, 149	10
ferulinska kiselina (FA)	7,14	193 > 178	178, 149	5
salicilna kiselina (SA)	8,25	137 > 93	-	1,5

Koncentracija fenolnih kiselina u uzorcima određena je metodom razrijeđenja stabilnog izotopa (Rittenberg i Foster 1940). Napravljena je baždarna krivulja serijom decimalnih razrijeđenja analita (1×10^{-4} – 1×10^{-10} M) uz dodatak internog standarda (IS) u svako razrijeđenje u konačnoj koncentraciji od 1×10^{-6} M. Vrijednost na osi y predstavlja odziv ($\text{konc. IS} \times \text{površina ispod pika analita} / \text{površina ispod pika IS}$), a vrijednost na osi x koncentraciju analita.

Koncentracija fenolnih kiselina u uzorku izračunata je prema formuli:

$$\text{koncentracija analita (pmol)} = A_a \times IS_c \times a \times 2(IS_1 + IS_2)^{-1}$$

pri čemu je:

A_a = površina ispod pika analita u uzorku;

IS_c = koncentracija IS u uzorku;

IS_1 = površina ispod pika [2H_4]-4-hidroksibenzojeve kiseline u uzorku;

IS_2 = površina ispod pika [2H_4]-salicilne kiseline u uzorku;

a = nagib pravca.

2.6. ANALIZA TRANSKRIPATA GENA FENILPROPANOIDNOG PUTA USLIJED SOLNOG STRESA

Kako bi što detaljnije istražili utjecaj solnog stresa na metabolizam specijalizirani biljnih metabolita, pored analitičkih istraživanja provedene su i analize transkripata gena fenilpropanoidnog puta kao i aktivnosti odabranih enzima fenilpropanoidnog biosintetskog puta (sekcija 2.7.) u uvjetima solnog stresa. Analize su realizirane u okviru Erasmus stipendije u CEBAS-CSIC (El Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura), Murcia, Španjolska.

2.6.1. Izolacija RNA

Za izolaciju RNA korišteno je 100 mg svježeg biljnog tkiva prethodno pohranjenog na $-80^\circ C$. Tkivo je homogenizirano uz dodatak 1 mL TRI reagensa u tekućem N_2 te je provedena inkubacija 5 min na sobnoj temperaturi. Zatim je dodano 200 μL kloroforma, dobro izvorteksirano (može i u nekoliko navrata), inkubirano 10 min na sobnoj temperaturi i centrifugirano 12 000 o/min, 15 min na $+4^\circ C$. Nakon centrifugiranja jasno su odvojeni slojevi u tri faze: donja crvena faza sadrži protein, interfaza sadrži DNA i gornja vodena faza sadrži RNA. Gornja vodena faza se prebaci u novu tubicu od 2 mL i doda 500 μL 2-propanola, slijedi inkubacija 10 min na sobnoj temperaturi te centrifugiranje (12 000 o/min tijekom 10 min na $+4^\circ C$). Supernatant se ukloni a talog RNA se osuši na zraku 5-10 min, pri čemu treba paziti da se ne osuši u potpunosti. RNA talog se otopi u 50 μL vode, po potrebi dodati isti taj volumen. Prisutnost nukleinskih kiselina u uzorku potvrđuje se mjerenjem koncentracije na Nanodropu. Kvaliteta RNA je provjerena elektroforezom u 1% agaraznom gelu u puferu TAE pri 75 mS tokom 25 minuta.

2.6.2. Analiza transkripata gena fenilpropanoidnog biosintetskog puta

Prethodno izoliranu glasnličku RNA (mRNA) potrebno je pretvoriti u cDNA pri čemu je korišten StepOnePlus PCR System uz KIT SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems) prateći upute proizvođača. Kreirane su početnice za slijedeće gene aktin (ACT), fenilalanin-amonij liazu (PAL); cinamat 4-hidroksilazu (C4H); 4-kumarat koenzim A ligazu (4CL); cinamat 3-hidroksilazu (C3H); kava kiselina 3-O-metiltransferazu (COMT); halkon sintazu (CHS); halkon izomerazu (CHI); flavanon 3-hidroksilazu (F3H); flavonoid 3'-hidroksilazu (F3'H); flavonol sintazu (FLS) i antocijanidin sintazu (ANS). (Tablica 5). Početnice su naručene preko TIMB MOLBIOL (Berlin, Njemačka). Početnice su pripremljene u koncentraciji od 20 μM te su kao takve dalje korištene za qPCR na način da je u pločice od 96 bazenčića po bazenčiću dodano 10 μL Fast gene (Merck), 0,4 μL svake od početnica, 7,2 μL ddH₂O i 0,02 μL ROX (AAT Bioquest). Na taj način pripremljene su smjese za sve navedene početnice u tablici 5. Ukupni volumen u bazenčićima

bio je 20 μL od čega je dodano po 18 μL pripremljenih smjesa i 2 μL cDNA te je za analizu korištena već prethodno uhodana metoda amplifikacije dijela cDNA na 7500 Real-Time PCR System. Kao endogena kontrola koristio se gen za aktin (ACT) te se na temelju njega vršila normalizacija dobivenih rezultata.

Tablica 5. Popis početnica korištenih u amplifikaciji dijela cDNA od interesa (Qu i sur., 2013).

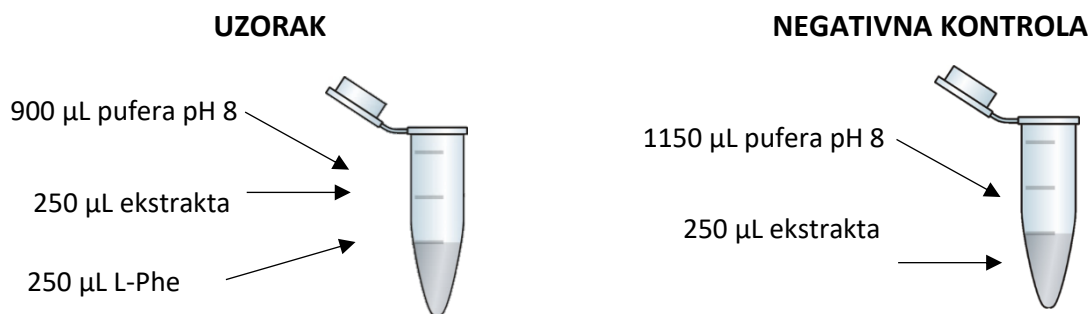
Početnica	Sekvenca	Početnica	Sekvenca
BnACT2-F	5'-CATCGGTGCTGAGAGATTCA-3'	BnACT2-R	5'-CACTGAGCACGATGTTACCG-3'
BnF3'H-R	5'-AAGCGTCGAACCTCTTGTGT-3'	BnF3'H-F	5'-TCACAAAGCGGAGGAGTTTC-3'
BnF3H-F	5'-TCGACGATGTTGGTGAGAAA-3'	BnF3H-R	5'-CAGGAGGTAACGCGAAGAAG-3'
BnPAL-F	5'-AATATTCGGCAGCACGAAAG-3'	BnPAL-R	5'-TGTTGGTGTTGAGGAAGCTG-3'
BnC3H-F	5'-GCACGCTTGAACCTTCACA-3'	BnC3H-R	5'-AACGCAACCGCTCCTAAGTA-3'
Bn4CL-F	5'-CGGTGCTAGCAATGTCGTTA-3'	Bn4CL-R	5'-ACCACGGATGCAAATCTCTC-3'
BnCHS-F	5'-CATCTGACACCCACCTTGAC-3'	BnCHS-R	5'-GTCCCACTCCCTCAAGTGT-3'
BnCOMT-F	5'-TCCCGCATCTGAAAGGTATC-3'	BnCOMT-R	5'-TCATCGCTCCAATCATGAAG-3'
BnANS-F	5'-AAAAAGCGGAATCAGTCAA-3'	BnANS-R	5'-ACGGATGGTTTCGTCTTCTG-3'
BnFLS-F	5'-AATTACTATCCGCCGTGTCC-3'	BnFLS-R	5'-TTGACGTGATCCAGTGATT-3'
BnCHI-F	5'-TCCCTTTCTCCGTGAAATC-3'	BnCHI-R	5'-GAGAGCGAAGAGGATGGAAG-3'

2.7. Mjerenje aktivnosti enzima fenilpropanoidnog biosintetskog puta uslijed solnog stresa

Na osnovu rezultata analize transkripata gena fenilpropanoidnog puta odabrano je šest enzima tog biosintetskog puta te je izmjerena njihova aktivnost u uvjetima solnog stresa s obzirom na odgovarajuće kontrole: fenilalanin-amonij liazu (PAL); cinamat 4-hidroksilazu (C4H); halkon sintazu (CHS); halkon izomerazu (CHI); flavonol sintazu (FLS) i antocijanidin sintazu (ANS). Biljni materijal klijanaca uzgojen je i tretiran kao što je opisano u poglavlju 2.3.1. Za analize enzimske aktivnosti korišten je svježi biljni materijal pohranjen na -80°C a ekstrakcije i mjerenja su izvedeni na ledu tj. $+4^{\circ}\text{C}$. Enzimatske aktivnosti mjerili smo prema (Cantu i sur., 2015.) uz određene modifikacije.

2.7.1. Mjerenje aktivnosti PAL enzima

Za ekstrakciju enzima 0,25 g biljnog materijala usitnjeno je u 1 mL 100 mM ekstrakcijskog pufera (TRIS-HCl pH 8,8 koji sadrži 14 mM β - merkaptoetanol, 5 mM DTT, 1% BSA i 5% PVPP). Nakon što je biljni ekstrakt centrifugiran (12 000 o/min tokom 20 min) supernatant je prebačen u nove tubice. Za mjerenje PAL aktivnosti u 900 μL TRIS-HCl pufera pH 8 dodano je 250 μL biljnog ekstrakta i 250 μL L-Phe koncentracije 10 mg/mL Negativna kontrola je sadržavala istu količinu biljnog ekstrakta ali bez dodatka L-Phe (**Slika 18**).

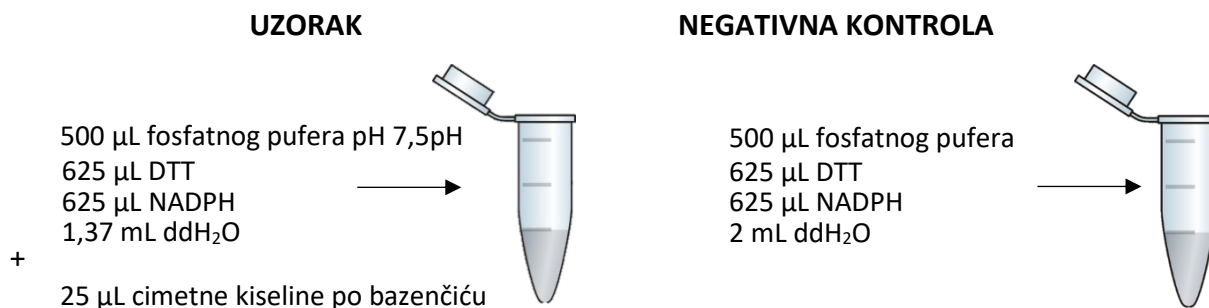


Slika 18. Sastav smjesa za mjerenje aktivnosti PAL enzima.

Uzorci kao i negativna kontrola se inkubiraju na 30 °C/ 60 min. Reakcija se zaustavlja dodatkom 150 µL 35% trikloroocetene kiseline (TCA), potom slijedi centrifugiranje (6500 o/min tijekom 5 min). Supernatant se prebaci u nove tubice te se 200 µL tog supernatanta doda u bazenčić kvarcne pločice od 96 bazenčića i apsorbancija se očitava pri valnoj duljini $\lambda = 290$ nm gdje se mjerenje provodi svaku minutu tokom deset minuta. Kao standard se koristi cimetna kiselina u rasponu koncentracija 50-200 µM te se rezultati računaju na temelju dobivenog baždarnog pravca i izražavaju kao µmol cimetne kiseline/ g svježe mase/ minuti.

2.7.2. Mjerenje aktivnosti C4H enzima

Mjerenje CH₄ enzima provedeno je na način da je u tubice od 1,5 mL izvagano 0,25 g svježeg biljnog materijala u koji je dodan 1 mL 100 mM ekstrakcijskog pufera (TRIS-HCl pH 7,5 koji sadrži 14 mM β- merkaptoetanol, 5 mM DTT, 1% BSA i 5% PVPP), dobro se izvortexira, potom se centrifugira (12 000 o/min tokom 20 min) te se supernatant prebaci u nove tubice. Aktivnost enzima se mjeri u 100 mM fosfatnom puferu pH 7,5 uz dodatak 1 mM DTT i 1 mM NADPH. Reakcija se pokreće dodatkom 25 µL 10 mM cimetne kiseline, koja se dodaje na kraju u svaki bazenčić posebno. Mjerenje se provodi na način da se u tubicama napravi smjesa koja sadrži cimetnu kiselinu dok smjesa bez dodatka cimetne kiseline predstavlja negativnu kontrolu (slika 19).



Slika 19. Sastav smjesa za mjerenje aktivnosti C4H enzima.

Aktivnost enzima je izmjerena u pločicama s bazenčićima. U svaki bazenčić pločice doda se po 150 μL tako pripremljene inkubacijske smjese, te se u bazenčiće za mjerenje uzorka doda 100 μL ekstrakta uzorka i na samom kraju 25 μL cimetne kiseline jer ona pokreće reakciju, dok se u bazenčiće kontrole umjesto ekstrakta doda fosfatni pufer pH 7,5. Mjerenje se provodi u kvarcnoj pločici gdje se apsorbancija mjeri svaku minutu tokom deset minuta pri valnoj duljini $\lambda = 290 \text{ nm}$. Rezultati se izražavaju kao μmol oksidiranog NADPH/ g svježe mase/ minuti.

2.7.3. Mjerenje aktivnosti CHS enzima

Za mjerenje CHS enzima također je korišteno 0,25g svježeg biljnog materijala. Ekstrakcijski pufer je 100 mM fosfatni pufer pH 6,8 koji sadrži 14 mM β - merkaptetoetanol, 5 mM DTT, 40 mM natrijev askorbat, 3 mM EDTA i 2% BSA. Nakon centrifugiranja biljnog ekstrakta (12 000 o/min tijekom 20 min) supernatant se prebaci u nove tubice te se vrši precipitacija proteina sa zasićenim amonijevim sulfatom. Precipitacija proteina provedena je na način da je dodano 250 μL ekstrakta u 1,5 mL tubice i potom polako, kap po kap, dodaje se 1 mL zasićenog amonijevog sulfata. Uzroci se ostave na ledu 30 minuta i centrifugiraju (14 000 o/min tijekom 15 min). Dobiveni talog su precipitirani proteini te se talog otopi u istom volumenu fosfatnog pufera pH 6,8 tj. 250 μL . Aktivnost enzima u uzorku se mjeri na način da se u svaki bazenčić pločice doda 10 μL *p*-kumarinske kiseline koncentracije 1 mg/mL, 50 μL precipitata i 190 μL 50 mM TRIS-HCl pufera pH 7,6 koji sadrži 10 mM KCN dok u slučaju negativne kontrole umjesto precipitata dodaje se isti volumen pufera. Do reakcije dolazi dodatkom 1 mg/mL 2',4',6'-tetrahidroksihalkona otopljenog u etilen glikol monometileteru. Mjerenje se provodi u pločici, svaku minutu tokom deset minuta pri valnoj duljini $\lambda = 370 \text{ nm}$. Rezultati se izražavaju kao μmol oksidiranog *p*-kumaril-CoA/ g svježe mase/ minuti.

2.7.4. Mjerenje aktivnosti CHI enzima

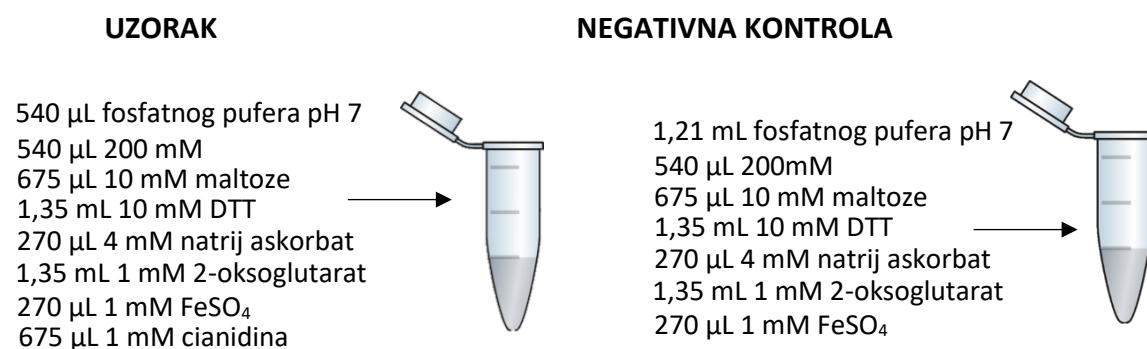
Ekstrakcija enzima za mjerenje CHI aktivnosti provedeno je kao u slučaju PAL enzima. CHI aktivnost temelji se na sintezi tetrahidroksihalkona iz naringenina uz dodatak 50 % KOH. Za mjerenje enzimske aktivnosti uzorka dodano je 100 μL ekstrakta, 75 μL 50 mM TRIS-HCl pufera pH 7,4 koji sadrži 1% BSA i 75 μL 50 mM KCN, dok kod negativne kontrole umjesto ekstrakta dodan je pufer. Reakcija je potaknuta dodatkom 5 μL 1 mg/mL tetrahidroksihalkona otopljenog u 2-etoksietanolu. Mjerenje se provodi u pločici s 96 bazenčića, svaku minutu tijekom deset minuta pri valnoj duljini $\lambda = 381 \text{ nm}$. Rezultati se izražavaju kao μmol formiranog naringenina/ g svježe mase/ minuti.

2.7.5. Mjerenje aktivnosti ANS i FLS enzima

Aktivnost ANS i FLS enzima provedena je odvagom 0,25g biljnog materijala u 1,5 mL tubice te je dodan 1 mL 100 mM ekstrakcijskog pufera TRIS-HCl pH 8 koji sadrži 14 mM β -merkaptetoetanol, 5 mM DTT, 5mM EDTA, 15 mM MgCl_2 i 2% BSA te se jako dobro izvorteksira, potom se centrifugira (12 000 o/min tokom 20 min). Nakon centrifuge provede se precipitacija proteina putem zasićenog amonijevog sulfata kod oba enzima, kako je već opisano kod

mjerenja aktivnosti CHS enzima, jedina razlika je što se talog precipitiranih proteina otopi u TRIS-HCl puferu pH 8. FLS aktivnost mjerena je na način da je napravljena smjesa u tubici (volumena 2 mL) koja sadrži 540 μ L 2-oksoglutarata, 270 μ L amonij željezo (II) sulfat $((\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O})$, 135 μ L natrij askorbata, 13,5 μ L 2 mg/mL goveđe katalaze i 5,116 mL ddH₂O. Nakon što se 250 μ L pripremljene smjese doda u bazenčiče pločice, doda se 50 μ L precipitata kod mjerenja FLS aktivnosti u uzorcima dok se u negativnu kontrolu umjesto precipitata dodaje pufer. Na samom kraju dodaje se 20 μ L 100 μ M dihidrokvercetin koji je odgovoran za pokretanje reakcije te se aktivnost enzima mjeri pri valnoj duljini $\lambda = 381$ nm tokom 10 minuta. Rezultati se prezentiraju kao μ mol iskorištenog dihidrokvercetin / g svježe mase / minuti.

ANS aktivnost mjeri se tako da se priprema smjesa uzorka i negativne kontrole kao na slici 20. U svaki bazenčić pločice doda se po 200 μ L tako pripremljene inkubacijske smjese. U bazenčiče za mjerenje aktivnosti uzorka doda se 50 μ L biljnog ekstrakta, dok se u bazenčiče negativne kontrole doda fosfatni pufer pH 7 umjesto biljnog ekstrakta. Aktivnost enzima mjeri pri valnoj duljini $\lambda = 330$ nm tokom 10 minuta. Rezultati se prezentiraju kao μ mol formiranog naringenina / g svježe mase / minuti.



Slika 20. Sastav smjesa za mjerenje aktivnosti ANS enzima.

2.8. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

Statistička analiza izvršena je korištenjem STATISTICA programa (Verzija Stat Soft. Statistica.v 10.0. Enterprise) uz primjenu analize varijance (Factorial ANOVA). Tukey HSD (eng. honest significant difference) post hoc statistički test je korišten za analizu odgovora tri vrste kupusnjača prilikom aplikacije solnog stresa na fiziološkom i biokemijskom nivou kako kod klijanaca tako i kod hidroponski uzgojenih biljaka.

Statistički značajne razlike prikazane su različitim slovima uz razinu značajnosti od 0,05 ($p < 0,05$). Svi rezultati prikazani su kao srednje vrijednosti \pm standardna devijacija (SD) gdje je za svaku analizu naveden broj ponavljanja. U slučaju klijanaca bilo je 5 bioloških replika dok u slučaju hidroponski uzgojenih biljaka 3 biološke replike, ukoliko nije drugačije navedeno za specifične slučajeve.

2.9. PCA analiza

Kako bi vizualizirali korelacije odgovarajućih istraživanih parametara, varijeteta kupusnjača i solnog stresa provedena je 2D-PCA analiza (dvodimenzionalna analiza glavnih komponenata). Ova metoda primjenjuje se za redukciju dimenzionalnosti i interpretaciju podataka, gdje glavne komponente objašnjavaju varijabilnost podataka na najkoncizniji način, pri čemu se pokazuju povezanosti i međuodnosi podataka (Rodriguez-Delgado i sur. 2002). PCA pretvara izvorne izmjerene varijable u nove nekorelirane varijable koje se nazivaju glavnim komponentama. Prva komponenta opisuje većinu varijacija podataka. Druga komponenta pokriva veći dio preostalih varijacija. Analizirani podaci standardizirani su kako bi se mogle uspoređivati različite veličine, tako da parametri jednako doprinose na varijancu skupa podataka i na glavne komponente proračuna. 2D-PCA analiza izvršena je u programu XLSTAT 2020.

3. REZULTATI

Rezultati istraživanja grupirani su u 3 glavna dijela: 3.1. Odgovor klijanaca kupsnjača kineskog kupusa, bijelog kupusa i raštike na solni stres, 3.2. odgovor odraslih biljaka istih varijeteta kupusnjača na solni stres i 3.3. molekularna i funkcionalna istraživanja. Pri tome je glavni fokus bio istražiti promjene u specijaliziranim metabolitima, posebno fenolnim kiselinama uslijed solnog stresa i korelacije između specijaliziranih metabolita i tolerancije varijeteta na solni stres. Stupanj stresa praćen je morfološki i mjereći glavne markere stresa. U slučaju odraslih biljaka napravljeni su dodatno pokusi pred-tretmana odabranim fenolnim spojevima u svrhu potencijalnog povećanja tolerancije na stres. Molekularna i funkcionalna istraživanja obuhvatila su praćenje razine transkripata gena i analize aktivnosti pripadajućih enzima fenilpropanoidnog biosintetskog puta u klijancima kineskog kupusa, a funkcionalna istraživanja provedena su na divljem tipu uročnjaka i nekoliko mutanti u fenilpropanoidnom biosintetskom putu.

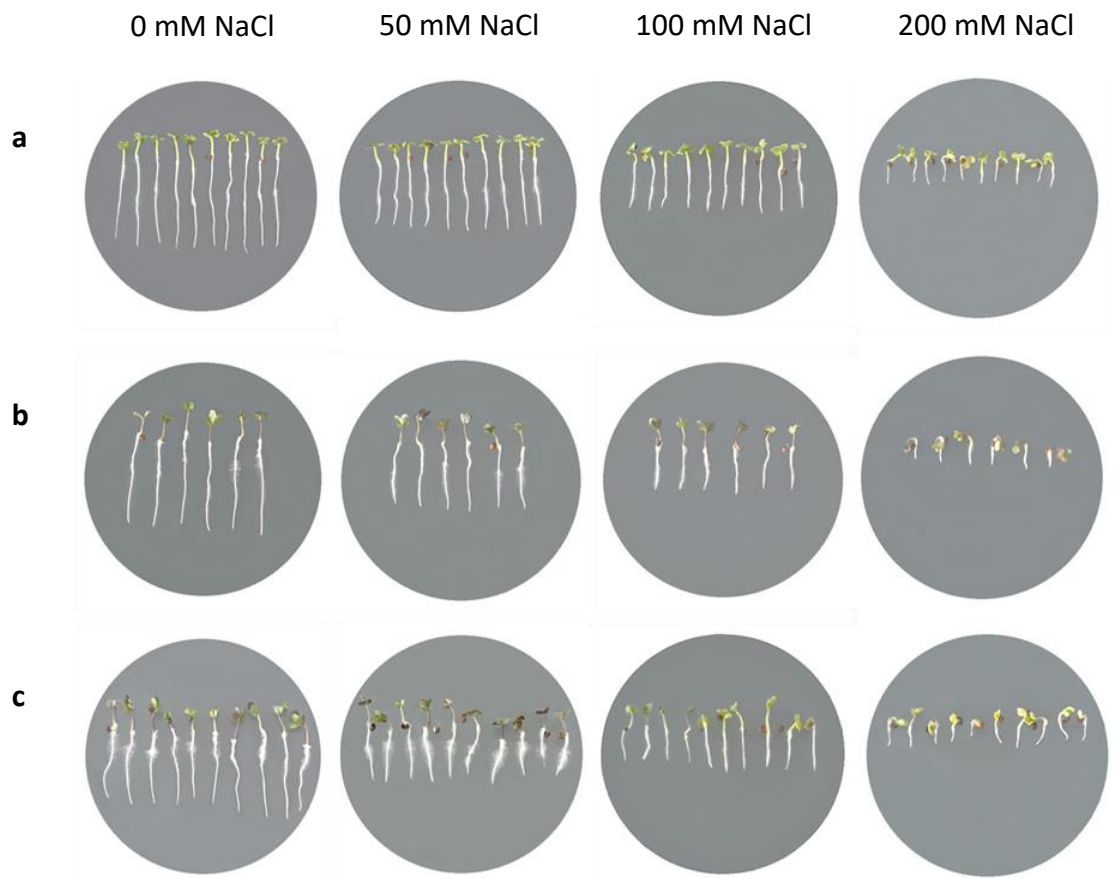
3.1. Odgovor klijanaca kineskog kupusa (*B. rapa* spp. *pekinensis*), bijelog kupusa (*B. oleracea* var. *capitata*) i raštike (*B. oleracea* var. *acephala*) na povišeni salinitet

Odgovor klijanaca gore navedenih varijeteta na povišeni salinitet praćen je na fiziološkoj i biokemijskoj razini. Važno je napomenuti da su prijašnja istraživanja u Laboratoriju za kemijsku biologiju identificirala kineski kupus kao najosjetljiviju vrstu a raštiku kao najotporniju na izlaganje različitim stresnim uvjetima pa tako i solnom stresu (Pavlović i sur. 2018, 2019).

3.1.1. Fiziološki odgovor

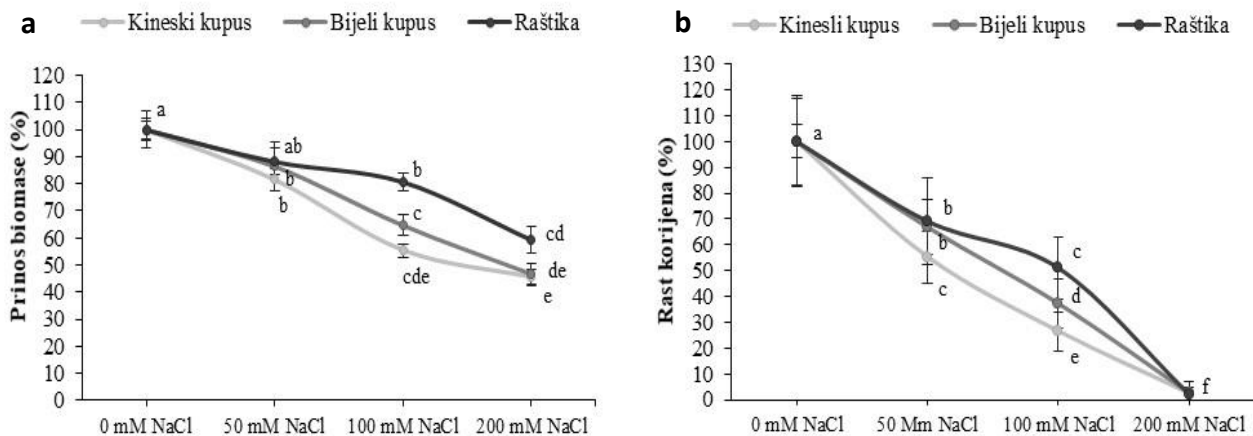
U okviru fiziološkog odgovora praćen je prinos biomase klijanaca te rast korijena u tri različita varijeteta izložena solnom stresu u rasponu koncentracija od 0-200 mM NaCl. Prinos biomase klijanaca i rast korijena kineskog kupusa, bijelog kupusa i raštike analizirani su na agaroznim podlogama uz dodatak NaCl (konc. 50-200 mM) u usporedbi s odgovarajućim kontrolama (**Slika 21a-c**).

Na temelju priloženih rezultata vidljivo je da prisutnost soli u hranjivim podlogama uzrokuje smanjenje prinosa biomase gdje je najveći gubitak prinosa zabilježen pri koncentraciji od 200 mM NaCl kod sva tri varijeteta (**Slika 22a**). U slučaju kineskog kupusa pri tretmanu s 50 mM NaCl-om prinos je smanjen za 18%, pri tretmanu s 100 mM NaCl-om za 45% dok pri koncentraciji od 200 mM NaCl prinos je smanjen za 55% u odnosu na kontrolu. Kod bijelog kupusa tretman s 50 mM NaCl-om smanjio je prinos za 13%, tretman s 100 mM NaCl-om za 35% a 200 mM koncentracija smanjila je prinos za 53% u odnosu na kontrolu. Na posljeticu, kod raštike, kao najotpornije vrste od ispitivanih varijeteta, tretman s koncentracijom 50 mM NaCl smanjio je prinos za 11%, 100 mM NaCl uzrokovao je smanjenje prinosa za 19% te 200 mM NaCl smanjio je prinos za 40% u odnosu na kontrolu.



Slika 21. Klijanaci kupusnjača podvrgnuti tretmanima soli (0-200 mM NaCl) u trajanju od 24h: **a)** kineski kupus (*B. rapa*); **b)** bijeli kupus (*B. oleracea* var. *capitata*) i **c)** raštika (*B. oleracea* var. *acephala*).

Nadalje, testovi inhibicije rasta korijena potkrepljuju rezultate prinosa biomase, gdje je s porastom koncentracije NaCl (50-200 mM) vidljiv inhibitorni učinak soli na rast korijena klijanaca kineskog kupusa, bijelog kupusa i raštike (**Slika 22b**). Tretman klijanaca s 50 mM NaCl uzrokovao je inhibiciju rasta korijena 44% kod kineskog kupusa, 33% kod bijelog kupusa i 30% kod raštike. Tretman od 100 mM NaCl nadalje inhibira rast korijena 74%, 63% i 49% kod kineskog kupusa, bijelog kupusa i raštike. Izlaganje klijanaca koncentraciji od 200 mM NaCl gotovo je u potpunosti inhibiralo rast korijena kod sva tri varijeteta: 97-98% u odnosu na kontrolne klijance.



Slika 22. Prinos biomase (a) i rast korijena (b) klijanaca kineskog kupusa, bijelog kupusa i raštike pod utjecajem solnog stresa (50-200 mM NaCl). Rezultati su prikazani kao postotak (%) u odnosu na odgovarajuće kontrole (100%). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm SD, n=4 (u slučaju a) odnosno n=3 (u slučaju b); n predstavlja broj bioloških replika, a svaka biološka replika je sadržavala po 10 klijanaca. Različita slova predstavljaju statistički značajne razlike između varijeteta i tretmana ($p < 0,05$).

3.1.2. Biokemijski odgovor

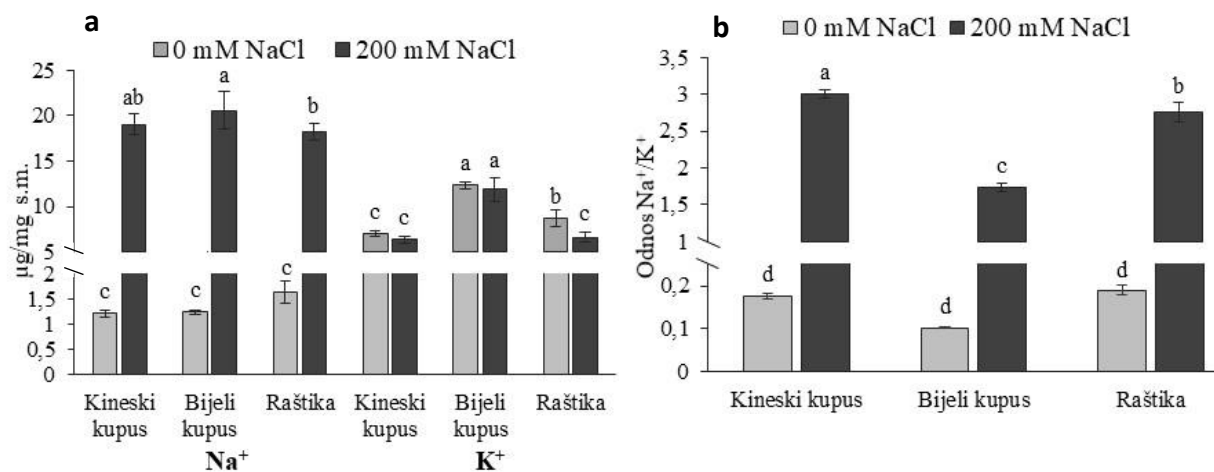
U okviru biokemijskog odgovora tri različite vrste klijanaca na solni stres ispitan je sadržaj različitih iona (makro- i mikro-elemenata), s posebnim naglaskom na Na^+ i K^+ te odnos Na^+/K^+ , sadržaj prolina, intenzitet nakupljanja reaktivnih kisikovih čestica (ROS) te antioksidacijski odgovor klijanaca mjeren putem DPPH i FRAP metoda. Nadalje izmjeren je sadržaj ukupnih fenolnih spojeva te grupa fenolnih spojeva: fenolnih kiselina flavonoida i flavanola; te karotenoida i glukozinolata spektrofotometrijskom metodom. Od navedenih spojeva, fenolne kiseline su detaljnije analizirane metodom UHPLC- MS/MS.

3.1.2.1. Sadržaj iona

Važan pokazatelj stresa u ionskoj homeostazi je sadržaj Na^+ i K^+ te njihov omjer. Sadržaj iona Na^+ i K^+ u klijancima navedenih vrsta izloženih solnom stresu (200 mM NaCl) u odnosu na pripadajuće kontrole prikazan je na **slici 23a**, odnos Na^+/K^+ na **slici 23b**.

U kontrolnim klijancima, u sva tri varijeteta, koncentracije Na^+ su vrlo slične i kreću se između 1,2 i 1,6 $\mu\text{g}/\text{mg}$ s.m. (suhe mase). Međutim, izlaganje solnom stresu od 200 mM NaCl značajno povećava razinu Na^+ (oko 15 puta) u odnosu na njihove kontrole kod sve tri vrste klijanaca. U slučaju K^+ iona nema značajnijih razlika između kontrolnih klijanaca i klijanca izloženih tretmanu s 200 mM NaCl. Također, možemo primijetiti da bijeli kupus ima najveću osnovnu razinu K^+ koja iznosi 12,30 $\mu\text{g}/\text{mg}$ s.m., potom slijedi raštika s 8,67 $\mu\text{g}/\text{mg}$ s.m. i na kraju kineski kupus s 6,98 $\mu\text{g}/\text{mg}$ s.m. Omjer Na^+/K^+ povećao se u sva tri varijeteta pri tretmanu s 200 mM

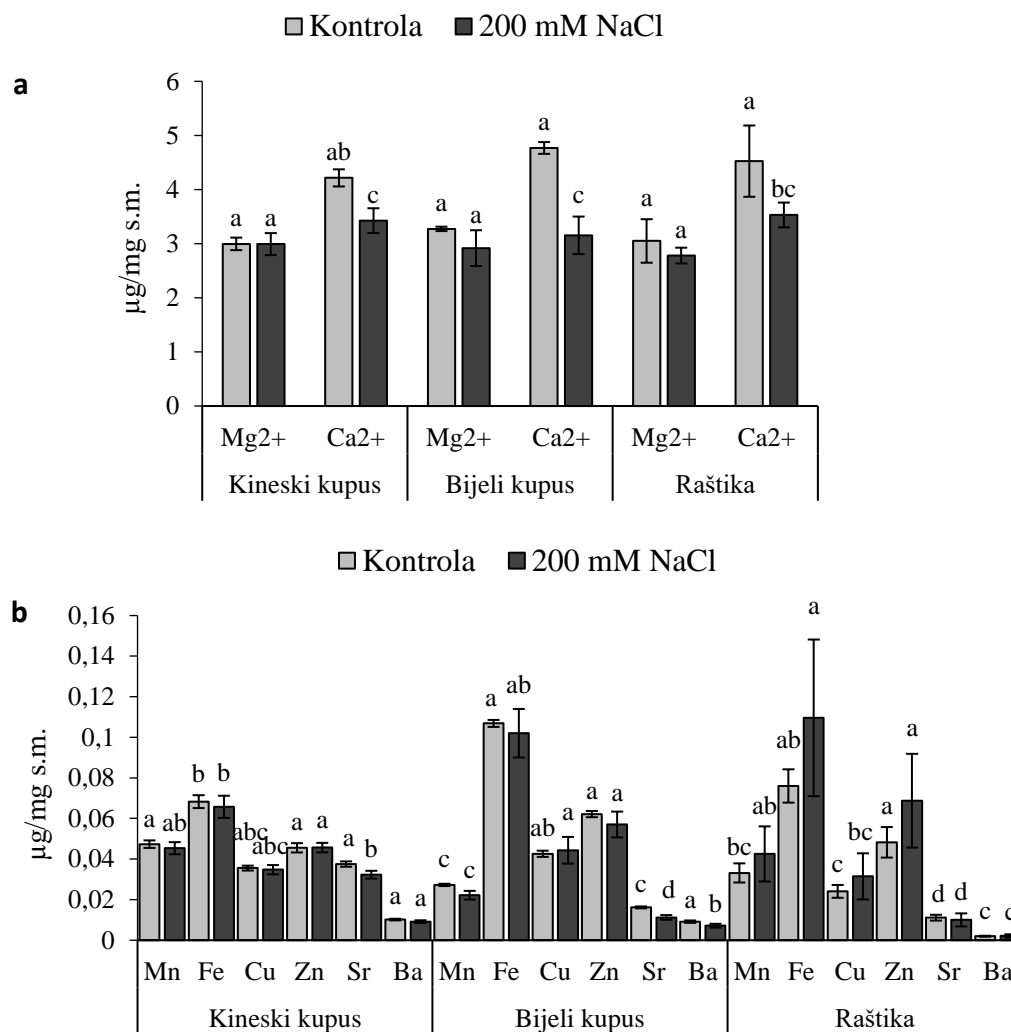
NaCl-om. Najznačajnije povećanje omjera Na^+/K^+ bilo je u kineskom kupusu (17,6 puta) i bijelom kupusu (17,3 puta) te u raštici (14,4 puta) u usporedbi s njihovim odgovarajućim kontrolama.



Slika 23. Sadržaj Na^+ i K^+ iona (a) i odnos Na^+/K^+ (b) kod kineskog kupusa, bijelog kupusa i raštike u kontrolnim klijancima i klijancima podvrgnutih solnom tretmanu od 200 mM NaCl. Podatci predstavljaju srednju vrijednost \pm SD, n=4. Različita slova predstavljaju statistički značajne razlike između tretmana i odgovarajuće kontrole te varijeteta ($p < 0,05$).

Također, na **slici 24** prikazan je sadržaj makro- i mikro-elemenata kod sva tri varijeteta. Od makroelemenata najzastupljeniji su magnezij (Mg^{2+}) i kalcij (Ca^{2+}). Iz priloženih rezultata je vidljivo da sva tri varijeteta imaju sličnu koncentraciju Mg^{2+} te da se njegov sadržaj ne mijenja bitno izlaganjem slonom stresu koncentracije 200 mM NaCl. Koncentracija Ca^{2+} u kontrolnim klijancima sve tri vrste kupusnjača iznosi oko 4,5 $\mu\text{g}/\text{mg}$ s.m., međutim, kod sva tri varijeteta njegov sadržaj ima statistički značajan pad prilikom izlaganja solnom stresu od 200 mM NaCl. U slučaju kineskog kupusa pad iznosi 1,23 puta, kod bijelog kupusa 1,51 puta te kod raštike 1,28 puta.

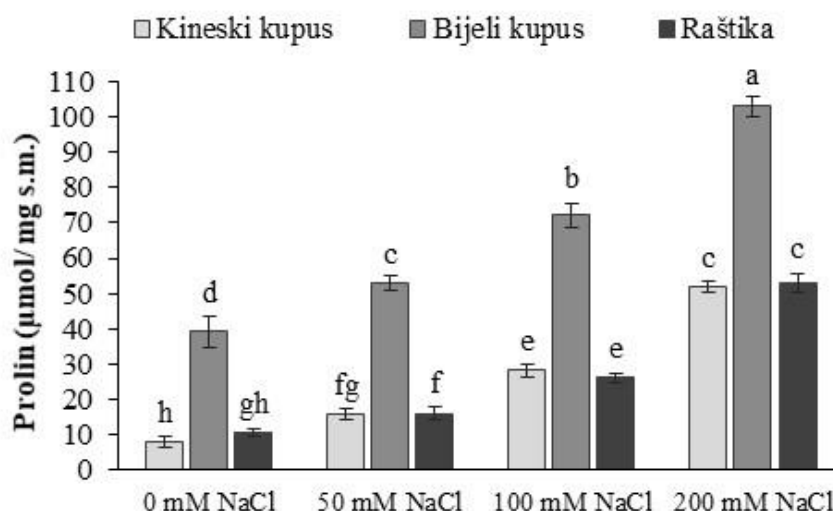
Od mikro-elemenata izmjereni su mangan (Mn), željezo (Fe), bakar (Cu), cink (Zn), stroncij (Sr) i barij (Ba). Od spomenutih mikro-elemenata kineski kupus ima najveći sadržaj Fe (0,068 $\mu\text{g}/\text{mg}$ s.m.), međutim, izlaganjem slonom stresu (200 mM NaCl) jedino se koncentracija Sr značajno mijenja, te je njegov sadržaj 1,15 puta manji u odnosu na kontrolu. Kod bijelog kupusa najzastupljeniji mikro-elementi su Fe (0,106 $\mu\text{g}/\text{mg}$ s.m.) i Zn (0,062 $\mu\text{g}/\text{mg}$ s.m.) dok koncentracija soli od 200 mM NaCl uzrokuje značajan pad koncentracije Sr (1,45 puta) i Ba (1,28 puta) u odnosu na kontrole. Raštika, slično kao i bijeli kupus, ima najveću koncentraciju Fe (0,076 $\mu\text{g}/\text{mg}$ s.m.) i Zn (0,048 $\mu\text{g}/\text{mg}$ s.m.). Bez obzira što kod raštike nema statistički značajnih razlika između kontrolnih klijanaca i onih izloženih solnom stresu (200 mM NaCl), treba napomenuti da izlaganje koncentraciji soli od 200 mM NaCl uzrokuje porast koncentracije gotovo svih mikro-elemenata u odnosu na kontrolu što je suprotno u odnosu na prva dva varijeteta.



Slika 24. Sadržaj **a)** makro-elemenata i **b)** mikro-elemenata kod kineskog kupusa, bijelog kupusa i raštike u kontrolnim klijancima i klijancima podvrgnutih solnom stresu (200 mM NaCl). Podatci predstavljaju srednju vrijednost \pm SD, n=4. Različita slova predstavljaju statistički značajne razlike između tretmana i odgovarajuće kontrole kao i varijeteta za svaki element ($p < 0,05$).

3.1.2.2. Sadržaj prolina

Prethodna istraživanja provedena na kupusnjačama definirala su prolina kao pouzdan marker stresa. Rezultati mjerenja prolina prikazani su na **slici 25**. Uočeno je da bijeli kupus u kontrolnim uzorcima ima značajno višu osnovnu razinu prolina koja je 4,9 puta viša nego u kineskog kupusa i 3,7 puta viša nego kod raštike. Prilikom tretmana s različitim koncentracijama NaCl (50-200 mM) primijećen je porast koncentracije prolina u skladu s porastom koncentracije soli kod sve tri vrste klijanaca. Najizraženiji porast zapažen je kod bijelog kupusa gdje je razina prolina pri koncentraciji od 200 mM NaCl 1,9 puta veća nego kod kineskog kupusa i raštike.



Slika 25. Sadržaj prolina kod tri vrste klijanaca kupusnjača izloženih solnom stresu u rasponu koncentracija NaCl od 0-200 mM. Podatci predstavljaju srednju vrijednost \pm SD, n=5. Različita slova predstavljaju statistički značajne razlike u odnosu na pojedine tretmane i varijetete ($p < 0,05$).

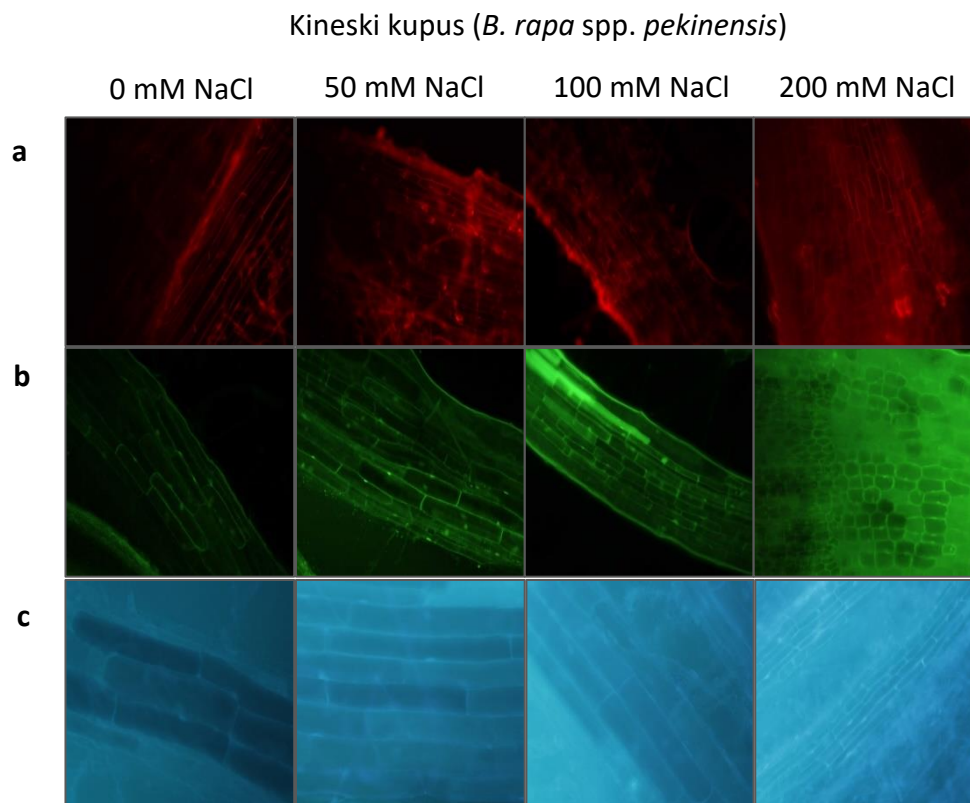
3.1.2.3. Reaktivne kisikove čestice (ROS) i glutation određeni *in situ*

Razina reaktivnih kisikovih čestica (ROS) i glutationa u klijancima kineskog kupusa, bijelog kupusa i raštike mjerena je *in situ* metodom fluorescencijske mikroskopije. Za detekciju su korištene karakteristične fluorescentne boje koje reagiraju s reaktivnim kisikovim česticama (SO i H₂O₂) i reduciranim glutationom (GSH) te na temelju toga se razvija fluorescencija. Mjerenja su provedena na korijenju klijanaca gore navedenih varijeteta.

Reprezentativni primjeri fluorescencije kod korijena kineskog kupusa, bijelog kupusa i raštike, nastale kao rezultat prisutnosti ROS i GSH prilikom izlaganja različitim koncentracijama soli (50-200 mM) u odnosu na njihove kontrole, prikazana je na **slici 26**. Vidljivo je da se razvija intenzivnija fluorescencija kao rezultat povećanja razine ROS-eva (SO i H₂O₂) kod sva tri varijeteta prilikom tretmana sa soli (NaCl).

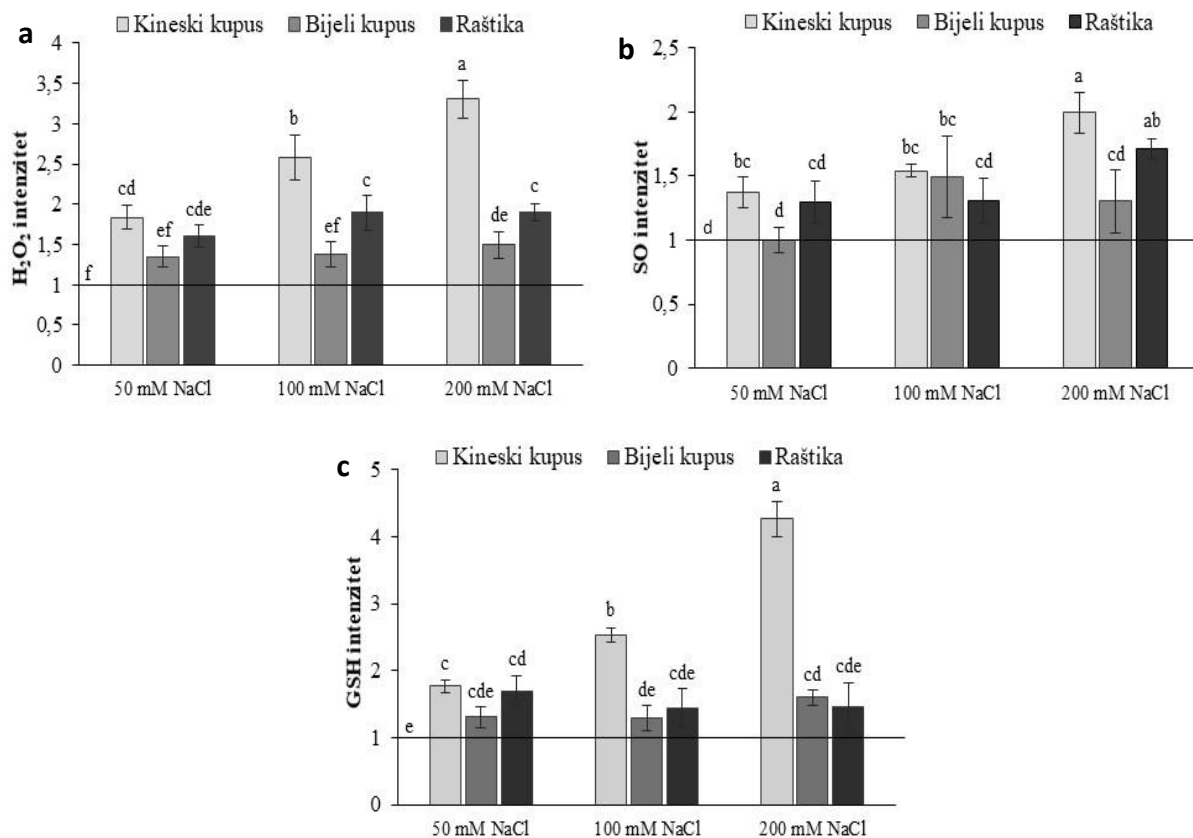
Intenzitet fluorescencije je kvantificiran i izražen u odnosu na kontrole čije su vrijednosti intenziteta podešene na 1 (**Slika 27**). Kod kineskog kupusa razina H₂O₂ se povećava u skladu s porastom koncentracije soli. Pri tretmanu s 50 mM NaCl je 1,8 puta veća, pri koncentraciji od 100 mM NaCl je 2,6 puta veća a pri tretmanu s 200 mM NaCl je 3,3 puta veća u odnosu na kontrolu. Suprotno tome, kod bijelog kupusa i raštike nije primijećen takav trend porasta razine H₂O₂ te je pri koncentraciji soli od 200 mM nivo H₂O₂ između 1,4 – 1,9 puta veći u odnosu na kontrolu. Nivo superoksidnog radikala (SO) najviši je kod kineskog kupusa, gdje je pri koncentracijama soli od 50 i 100 mM porast vrlo sličan (1,3 i 1,5 puta) a pri koncentraciji od 200 mM NaCl je 2 puta veći u odnosu na kontrolu. Kod bijelog kupusa i raštike također dolazi do porasta SO pri izlaganju solnom stresu, međutim, taj porast je slabijeg intenziteta i

pri najvišoj koncentraciji soli (200 mM) razina SO kod bijelog kupusa je 1,3 puta veća a kod raštike 1,7 puta veća u odnosu na kontrolu.



Slika 26. Reprezentativni primjer fluorescentne mikroskopije korijena klijanaca kineskog kupusa (*B. rapa*) izloženih solnom stresu (50-200 mM NaCl) u odnosu na kontrole: **a)** superoksidni radikal (SO), **b)** vodikov peroksid (H_2O_2) i **c)** glutation (GSH). Povećanje: 25 ×.

U slučaju glutationa (GSH), prisutan je trend porasta u uvjetima solnog stresa ovisno o koncentraciji NaCl, ponajviše u kineskom kupusu. Pri koncentraciji od 200 mM NaCl razina GSH je 4,3 puta u usporedbi s kontrolom. Kod raštike najznačajniji porast primijećen je pri koncentraciji soli od 50 mM (1,7 puta) te nije pokazana tendencija porasta pri višim koncentracijama soli. U konačnici, kod bijelog kupusa najveći porast je pri koncentraciji od 200 mM NaCl i iznosi 1,6 puta u usporedbi s kontrolama.



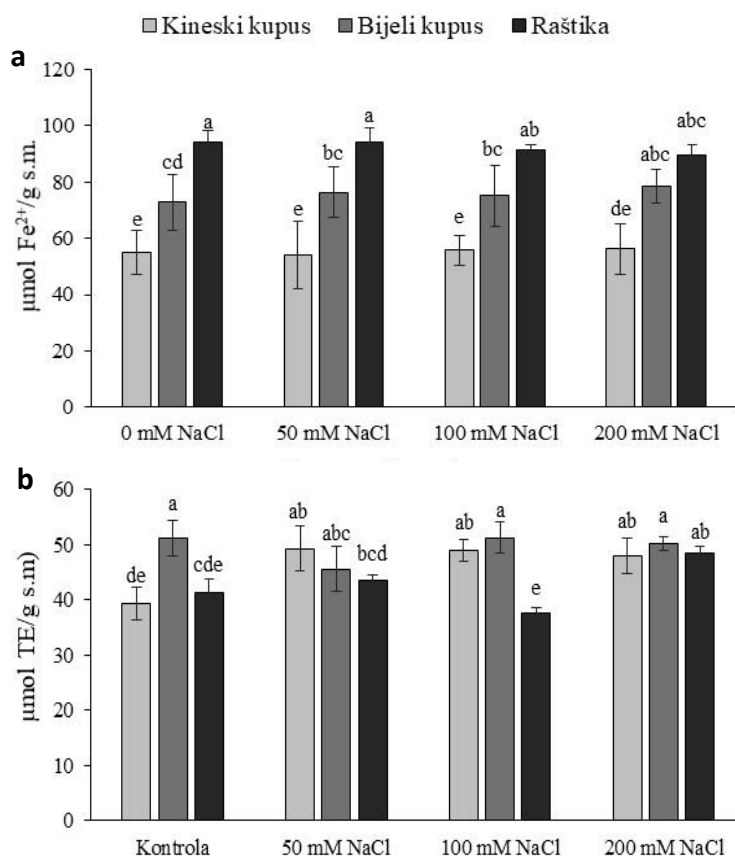
Slika 27. Rezultati kvantifikacije ROS-eva na osnovu *in situ* mjerenja intenziteta fluorescencije u korijenu klijanaca kineskog kupusa, bijelog kupusa i raštike uslijed solnog tretmana (0-200 mM NaCl): **a)** vodikov peroksid (H₂O₂); **b)** superoksidni radikal (SO); **c)** reducirani glutation (GSH). Rezultati su izraženi kao relativne vrijednosti u odnosu na kontrolu koju predstavlja linija vrijednosti intenziteta 1. Podatci su srednja vrijednost ± SD (n=5). Različita slova predstavljaju statistički značajne razlike kod korijena klijanaca u odnosu na pojedini tretman i varijetete (p < 0,05).

3.1.2.4. Antioksidacijski odgovor klijanaca

Antioksidacijska aktivnost ekstrakta klijanaca tri vrste kupusnjača izmjerena je spektrofotometrijski koristeći DPPH i FRAP metodu. Rezultati su prikazani na **slici 28**.

Iz priloženih rezultata vidimo da prilikom izlaganja klijanaca kineskog kupusa, bijelog kupusa i raštike solnom stresu (50-200 mM) nema značajnih razlika u antioksidacijskoj aktivnosti uslijed stresa s obzirom na kontrole. Međutim, možemo vidjeti da postoje razlike u antioksidacijskoj aktivnosti između pojedinih vrsta. Kod mjerenja antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom vidljivo je da raštika ima najveću antioksidacijsku aktivnost, približno 1,3 puta veću u odnosu na bijeli kupus i oko 1,7 puta veću nego kineski kupus. Mjerenjem antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom, kod kineskog kupusa dolazi do statistički značajnog porasta antioksidacijske aktivnosti prilikom izlaganja solnom stresu, za oko 1,25 puta kod sve tri koncentracije NaCl (50 mM, 100 mM i 200 mM) u odnosu na kontrolu. Kod

bijelog kupusa nema značajnih promjena dok je kod raštike najveći porast antioksidacijske aktivnosti pri najvišoj koncentraciji soli (200 mM) i to za 1,17 puta u odnosu na kontrolu.

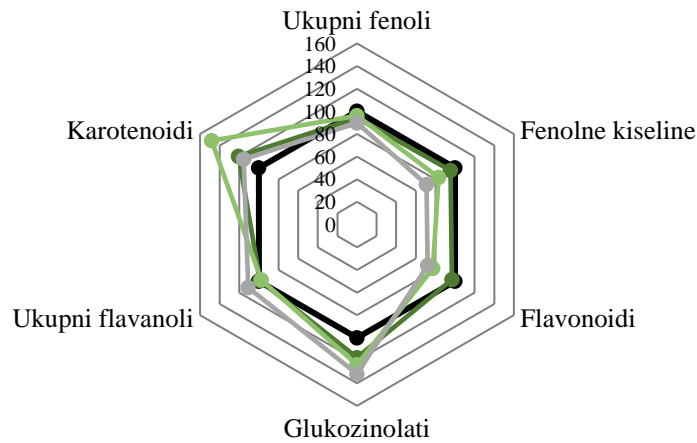


Slika 28. Antioksidacijska aktivnost klijanaca kineskog kupusa, bijelog kupusa i raštike uslijed solnog stresa (0-200 mM NaCl) mjerena **a)** FRAP metodom i **b)** DPPH metodom. Rezultati su srednja vrijednost \pm SD (n=5). Provedena je statistička usporedba u odnosu na sve tri vrste. Različita slova predstavljaju statistički značajne razlike između tretmana i vrsta ($p < 0,05$).

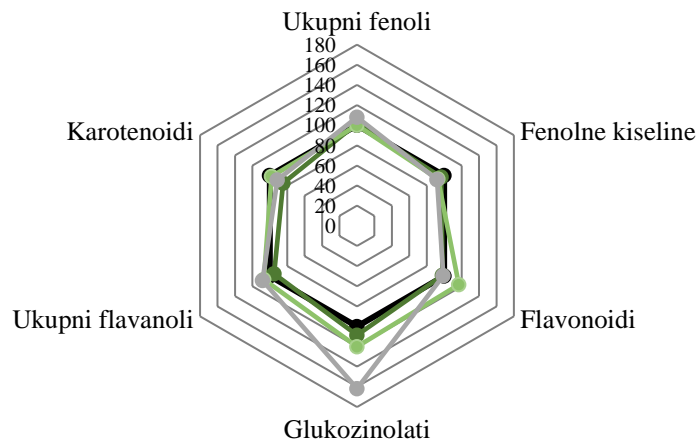
3.1.2.5. Sadržaj specijaliziranih metabolita i korelacije u donosu na vrste kupusnjača u tretmanima solnog stresa

Sadržaj ukupnih fenola te grupa fenolnih spojeva (fenolnih kiselina, flavonoida, flavanola) te karotenoida i glukozinolata kod tri različite vrste klijanaca izmjeren je spektrofotometrijski. **Slika 29** prikazuje promjene u sadržaju ukupnih specijaliziranih metabolita uslijed tretmana solnim stresom u postotcima u odnosu na kontrolu (100%), a konkretne vrijednosti sa statističkom obradom prikazane su u **Tablici 1 (prilozi)**. Rezultati pokazuju da izlaganje klijanaca solnom stresu (50-200 mM NaCl) utječe na razinu specijaliziranih metabolita.

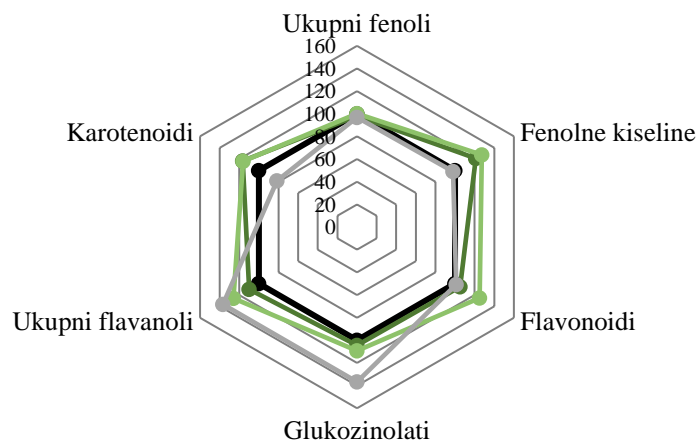
a —●— Kontrola —●— 50 mM NaCl —●— 100 mM NaCl —●— 200 mM NaCl



b —●— Kontrola —●— 50 mM NaCl —●— 100 mM NaCl —●— 200 mM NaCl



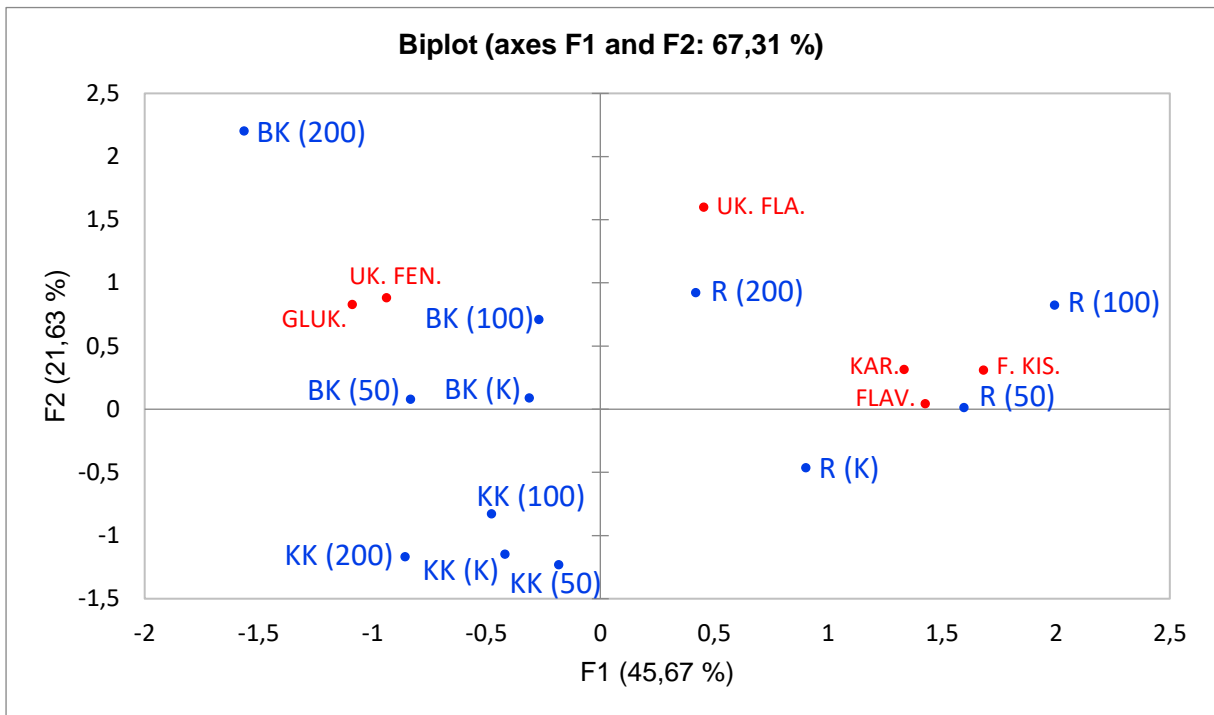
c —●— Kontrola —●— 50 mM NaCl —●— 100 mM NaCl —●— 200 mM NaCl



Slika 29. Promjene u sadržaju ukupnih fenola, grupa fenolnih spojeva (fenolnih kiselina, flavonoida, flavanola) te karotenoida i glukozinolata kod klijanaca **a)** kineskog kupusa; **b)** bijelog kupusa i **c)** raštike podvrgnutih solnom stresu u rasponu koncentracija od 0-200 mM NaCl. Rezultati su prikazani kao postotak u odnosu na kontrole, gdje kontrola iznosi 100%, a konkretne vrijednosti sa statističkom obradom prikazane su u Tablici 1 (prilozi).

Kod kineskog kupusa dolazi do statistički značajnog smanjenja koncentracije flavonoida pri koncentraciji soli od 200 mM koja je 1,39 puta niža u odnosu na kontrolu. Nadalje, razina glukozinolata značajno se povećava s povećanjem koncentracije soli, te je pri koncentracijama soli od 50 mM i 100 mM oko 1,2 puta veća, dok kod koncentracije od 200 mM NaCl je 1,32 puta veća u odnosu na kontrolu. Također, kod kineskog kupusa dolazi do promijene u sadržaju karotenoida, posebno prilikom aplikacije soli od 50 mM i 100 mM NaCl, koja je 1,16 i 1,42 puta veća u odnosu na kontrolne biljke. Kod bijelog kupusa, jedina značajnija promjena, prilikom izlaganja klijanaca solnom stresu (50-200 mM NaCl), je u koncentraciji glukozinolata koja se povećava s porastom koncentracije soli, te pri koncentraciji soli od 200 mM je 1,62 puta veća u odnosu na kontrolu. Solni stres kod raštike uzrokuje promjenu razine ukupnih flavanola čija je koncentracija 1,36 puta veća pri najvišoj koncentraciji soli (200 mM) u usporedbi s netretiranom kontrolom. Sadržaj fenolnih kiselina kod raštike povećan je prilikom tretmana s blažim koncentracijama NaCl (50 mM i 100 mM) za oko 1,27 puta u odnosu na kontrolu, dok je pri koncentraciji soli od 200 mM NaCl sadržaj fenolnih kiselina sličan kao i kod kontrolnih klijanaca. Jedina značajnija promjena sadržaja flavonoida kod raštike prisutna je prilikom tretmana s 100 mM NaCl, gdje je njihova koncentracija 1,25 puta veća u odnosu na kontrolu. Slično kao i kod kineskog kupusa, sadržaj karotenoida kod raštike najviši je prilikom tretmana s 50 mM i 100 mM NaCl, te je u oba slučaja 1,12 puta veći u odnosu na kontrolu. Suprotno, koncentracija soli od 200 mM NaCl uzrokuje drastičan pad koncentracije karotenoida (1,21 puta) u odnosu na klijance koji su rasli u kontrolnim uvjetima. Također, kao i kod prethodna dva varijeteta i kod raštike s porastom koncentracije soli dolazi do povećanja koncentracije glukozinolata koja je 1,38 puta veća pri tretmanu od 200 mM NaCl nego u kontrolnim klijancima.

Promjene u specijaliziranim metaboliti s obzirom na intenzitet solnog stresa (50 mM, 100 mM i 200 mM NaCl) i varijetete (kineski kupus, bijeli kupus i raštika) objedinjene su i vizualizirane dvodimenzionalnom analizom glavnih komponenata (2D-PCA) (**Slika 30**). Prve dvije glavne komponente, F1 i F2 objasnile su 67,31% kumulativne varijabilnosti izmjerenih parametara. Odvajanje varijeteta jasno je pokazalo da njihov odgovor na solni stres u odnosu na određene metabolite znatno varira. Kineski kupus se pozicionirao u donjem lijevom kvadrantu, bijeli kupus u gornjem lijevom kvadrantu, a raštika u gornjem desnom kvadrantu. 2D-PCA također prikazuje odnos specijaliziranih metabolita s obzirom na koncentraciju soli i varijetet. Metaboliti analizirani u stresnim uvjetima grupirani su uglavnom u blizini bijelog kupusa i raštike. GLUK. i UK. FEN. grupirani su u blizini bijelog kupusa tretiranog visokom koncentracijom soli (200 mM NaCl), dok su KAR, F. KIS. i FLAV. smješteni u blizini raštike tretirane 50-100 mM NaCl. Pearsonovi linearni koeficijenti (**Tablica 2 u priložima**) pokazali su pozitivne korelacije između parametara koji su usko grupirani: F. KIS. pozitivno koreliraju s FLAV. (0,724) i KAR. (0,652).

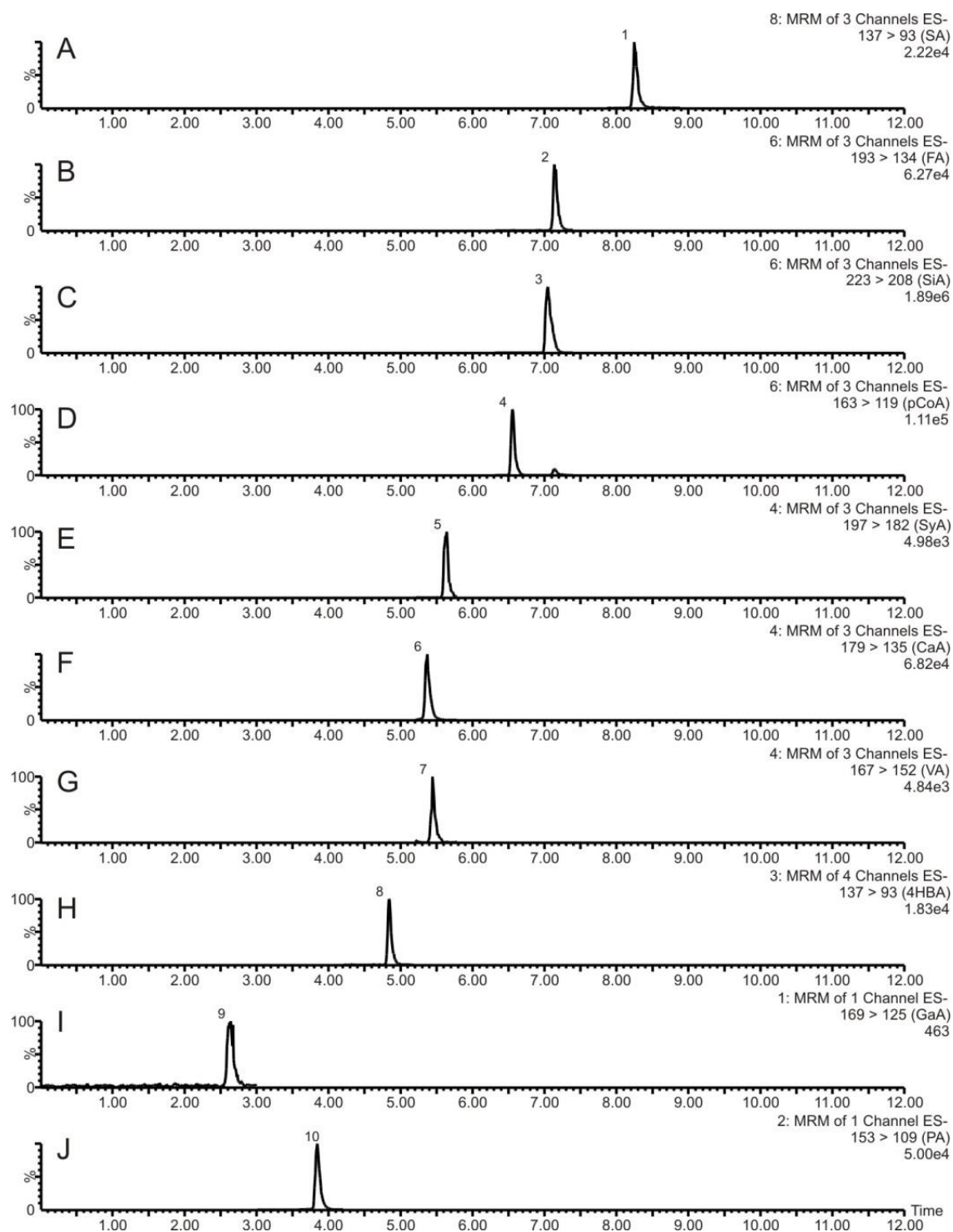


Slika 30. Dvodimenzionalna analiza glavnih komponenta (2D-PCA) specijaliziranih metabolita kod klijanaca kineskog kupusa (KK), bijelog kupusa (BK) i raštike (R) nakon 24 sata izlaganja 0 (K), 50, 100 i 200 mM NaCl. Crveni simboli označavaju položaj specijaliziranih metabolite: glukozinolati (GLUK), karotenoidi (KAR) i fenolni spojevi (ukupni fenoli (UK. FEN.), ukupni flavonoidi (FLAV.), ukupne fenolne kiseline (F. KIS.), ukupni flavonoli (UK. FLA.)). Plavi simboli prikazuju položaj klijanca različitih varijeteta nakon svakog tretmana. PCA je kreirana na osnovu rezultata u Tablici 1 (Prilozi).

3.1.2.6. Profil i sadržaj fenolnih kiselina

Fenolne kiseline (slobodne, konjugirane i vezane za stanične stjenke) analizirane su detaljno metodom tekućinske kromatografije visoke učinkovitosti uz korištenje spektrometra masa (UHPLC-MS/MS) u klijancima kineskog kupusa, bijelog kupusa i raštike u uvjetima solnog stresa. Pojedinačne fenolne kiseline identificirane su na osnovu retencijskog vremena (RT) i karakterističnih MRM fragmenata kao što je opisano u sekciji Materijal i metode, Tablica 4. Na **slici 31** prikazan je reprezentativni UPLC-MS/MS kromatogram fenolnih kiselina identificiranih u klijancima kupusnjača.

Ukupno je identificirano deset fenolnih kiselina u klijancima kupusnjača (galna kiselina (GaA), protokatehinska kiselina (PA), 4-hidroksibenzojeva kiselina (4HBA), kava kiselina (CaA), vanilinska kiselina (VA), siringinska kiselina (SyA), 4-kumarinska kiselina (pCoA), sinapinska kiselina (SiA), ferulinska kiselina (FA) i salicilna kiselina (SA)). Šest fenolnih kiselina (PA, pHBA, pCoA, SiA, FA i SA) detektirano je u slobodnom obliku dok su preostale četiri (GaA, CaA, VA i SyA) detektirane isključivo u konjugiranom obliku.



Slika 31. Reprezentativni UPLC-MS/MS kromatogram (A-J) konjugiranih fenolnih kiselina u ekstraktu klijanaca raštike (*B. oleracea* var. *acephala*): salicilna kiselina (SA) (A), ferulinska kiselina (FA) (B), sinapinska kiselina (SiA) (C), 4-kumarinska kiselina (pCoA) (D), siringinska kiselina (SyA) (E), kava kiselina (CaA) (F), vanilinska kiselina (VA) (G), 4-hidroksibenzojeva kiselina (4HBA) (H), galna kiselina (GaA) (I), protokatehinska kiselina (PA) (J).

Rezultati ukupnog sadržaja pojedinačnih fenolnih kiselina, dobiveni objedinjenjem slobodnih, konjugiranih i vezanih za stanične stjenke prikazani su u **Tablici 7**. Detaljni prikaz sadržaja slobodnih, konjugiranih i fenolnih kiselina vezanih za stanične stjenke prikazan je u **Tablici 3 u Prilogu**.

Tablica 7. Sadržaj fenolnih kiselina izmjeren metodom UHPLC-MS/MS kod kineskog kupusa bijelog kupusa i raštike. Rezultati su zbroj slobodnih i konjugiranih fenolnih kiselina i predstavljaju srednja vrijednost \pm SD (n=5). Svijetlo siva boja predstavlja najmanje vrijednosti dok tamno zelena najviše vrijednosti. Provedena je statistička usporedba unutar pojedinog varijeteta za svaku pojedinu mjerenu komponentu gdje različita slova predstavljaju statistički značajne razlike u odnosu na svaki pojedini tretman ($p < 0,05$). Kratice: galna kiselina (GaA), protokatehinska kiselina (PA), 4-hidroksibenzojeva kiselina (4HBA), kava kiselina (CaA), vanilinska kiselina (VA), siringska kiselina (SyA), 4-kumarinska kiselina (p CoA), sinapinska kiselina (SiA), ferulinska kiselina (FA) i salicilna kiselina (SA).

Fenolna kiselina (pmol/mg s.m.)	Kineski kupus (<i>B.rapa</i> spp. <i>pekinensis</i>)			
	Tretmani			
	0 mM NaCl	50 mM NaCl	100 mM NaCl	200 mM NaCl
GaA	65,49 \pm 9,26 a	64,99 \pm 10,34 a	64,13 \pm 11,10 a	57,62 \pm 9,65 a
PA	79,13 \pm 4,17 ab	82,34 \pm 8,02 a	84,63 \pm 7,15 a	68,55 \pm 7,45 b
4HBA	120,03 \pm 29,46 a	132,80 \pm 9,19 a	116,05 \pm 9,52 a	129,50 \pm 15,73 a
CaA	34,19 \pm 5,23 a	26,98 \pm 1,93 b	25,76 \pm 3,29 b	21,62 \pm 1,79 b
VA	291,96 \pm 37,29 a	263,46 \pm 25,38 a	248,10 \pm 33,25 a	305,44 \pm 69,14 a
SyA	72,60 \pm 10,41 a	68,48 \pm 5,35 a	69,23 \pm 8,66 a	72,08 \pm 13,58 a
p CoA	127,83 \pm 34,47 a	97,72 \pm 15,96 ab	91,86 \pm 23,06 ab	79,79 \pm 11,04 b
SiA	4834,88 \pm 290,75 a	5065,95 \pm 163,74 a	5065,99 \pm 728,55 a	5048,56 \pm 468,03 a
FA	253,02 \pm 14,59 a	259,47 \pm 9,93 a	245,33 \pm 35,83 a	230,34 \pm 21,64 a
SA	175,62 \pm 46,53 a	148,10 \pm 42,60 a	134,30 \pm 20,91 a	62,45 \pm 4,49 b
Ukupno	6054,78 \pm 249,04 a	6210,30 \pm 204,90 a	6145,38 \pm 864,92 a	6075,94 \pm 444,31 a

Fenolna kiselina (pmol/mg s.m.)	Bijeli kupus (<i>B. oleracea</i> var. <i>capitata</i>)			
	Tretmani			
	0 mM NaCl	50 mM NaCl	100 mM NaCl	200 mM NaCl
GaA	124,03±11,81 a	118,62±9,89 a	124,81±9,28 a	126,85±15,24 a
PA	173,79±39,78 a	161,71±44,67 a	160,28±42,55 a	155,28±42,82 a
4HBA	174,89±16,07 a	179,90±16,64 a	188,54±17,71 a	195,89±17,97 a
CaA	51,30±2,35 a	47,37±7,79 a	47,55±3,39 a	47,34±3,84 a
VA	142,38±26,87 a	126,04±20,67 a	135,85±13,34 a	149,09±24,58 a
SyA	98,61±11,01 a	98,98±20,96 a	97,46±13,57 a	97,63±14,20 a
pCoA	178,18±47,41 a	189,70±22,79 a	193,26±28,73 a	205,57±45,73 a
SiA	5807,30±677,05 a	6285,18±1136,82a	6375,35±1373,16a	6303,03±1123,34a
FA	469,18±95,30 a	451,51±108,24 a	451,41±93,64 a	471,44±118,46 a
SA	120,49±24,20 a	120,41±24,12 a	101,73±18,11 a	90,97±22,07 a
Ukupno	7340,16±621,87 a	7779,41±1222,34a	7876,24±1254,80a	7843,09±980,03 a

Fenolna kiselina (pmol/mg s.m.)	Raštika (<i>B. oleracea</i> var. <i>acephala</i>)			
	Tretmani			
	0 mM NaCl	50 mM NaCl	100 mM NaCl	200 mM NaCl
GaA	118,66±6,65 a	111,73±19,38 a	107,32±7,30 a	104,56±13,73 a
PA	136,92±15,84 a	131,81±13,81 a	130,63±5,99 a	128,07±12,73 a
4HBA	147,07±8,58 a	140,85±3,92 a	135,67±9,82 a	147,75±12,42 a
CaA	149,61±9,53 a	141,03±10,98 ab	124,15±10,93 bc	114,07±14,78 c
VA	153,14±14,22 a	155,80±15,55 a	141,84±5,46 a	146,49±15,73 a
SyA	51,13±4,86 a	51,13±4,41 a	51,18±3,73 a	53,28±6,51 a
pCoA	189,08±23,25 a	127,73±23,28 b	118,15±14,22 bc	90,85±8,97 c
SiA	7073,88±669,84 a	7042,78±588,29 a	6894,94±117,30 a	7230,73±620,73 a
FA	284,55±31,80 a	264,80±23,99 a	273,66±22,65 a	302,53±17,81 a
SA	81,78±4,17 a	76,05±10,45 a	69,58±6,77 ab	59,21±8,69 b
Ukupno	8376,93±707,89 a	8243,71±591,67 a	8047,12±108,79 a	8377,53±656,09 a

Kod kontrolnih klijanaca kineskog kupusa najzastupljenija je SiA (4834,88 pmol/mg s.m.), potom slijede VA (291,96 pmol/mg s.m.), FA (253,02 pmol/mg s.m.) i SA (175,62 pmol/mg s.m.). Prilikom izlaganja kineskog kupusa različitim koncentracijama soli (50-200 mM) kod SiA dolazi do porasta kod sve tri koncentracije soli u odnosu na kontrolu. Koncentracija VA povećava se pri najvećoj koncentraciji NaCl (200 mM), dok je kod 50 mM i 100 mM NaCl niža u odnosu na kontrolu. FA s porastom koncentracije soli bilježi blagi pad u odnosu na kontrolu.

Koncentracija SA opada s porastom koncentracije soli te je statistički značajno manja pri 200 mM NaCl u odnosu na kontrolu. Statistički značajne razlike također su vidljive kod PA i *p*-CoA gdje je u oba slučaja pri koncentraciji soli od 200 mM primijećen pad njihove razine u odnosu na kontrolu. Kada obratimo pažnju na ukupni zbroj svih fenolnih kiselina, najveća količina izmjerena je pri 50 mM NaCl. U **Tablici 3** (Prilozi) prikazani su detalji slobodnih i konjugiranih fenolnih kiselina. Kod kineskog kupusa najzastupljenije slobodne fenolne kiseline su SiA (180,29±42,77 pmol/mg s.m.), SA (80,23±21,57 pmol/mg s.m.) i FA (20,15±5,92 pmol/mg s.m.). Izlaganje solnom stresu uzrokuje porast koncentracije SiA te je pri koncentraciji od 200 mM NaCl 1,48 puta veća u odnosu na kontrolu. Suprotno, koncentracija soli od 200 mM uzrokuje pad koncentracije SA koja je 3,09 puta manja u odnosu na kontrolne klijance, dok se sadržaj FA ne mijenja značajno kod klijanaca izloženih solnom stresu u odnosu na kontrole. Od konjugiranih fenolnih kiselina također su najzastupljenije SiA (4348,04±334,00 pmol/mg s.m.), SA (95,29±25,08 pmol/mg s.m.), FA (28,25±4,52 pmol/mg s.m.) te VA (291,96±37,30 pmol/mg s.m.). Od spomenutih konjugiranih kiselina jedino se sadržaj SA i VA mijenja prilikom izlaganja solnom stresu, gdje koncentracija soli od 200 mM NaCl uzrokuje pad sadržaja SA (3,80 puta) dok se koncentracija VA poveća 1,05 puta. Od fenolnih kiselina vezanih za stanične stijenke najzastupljenija je FA (28,25±4,52 pmol/mg s.m.) ali se njena koncentracija ne mijenja bitno izlaganjem solnom stresu (50-200 mM) NaCl.

Kod kontrola bijelog kupusa najzastupljenije fenolne kiseline su SiA (5807,30 pmol/mg s.m.), FA (469,18 pmol/mg s.m.), *p*CoA (178,18 pmol/mg s.m.) i SA (120,49 pmol/mg s.m.). U slučaju solnog stresa (50-200 mM NaCl) kod SiA primijećen je blagi porast u odnosu na kontrolu. Koncentracija FA najviša je pri koncentraciji od 200 mM NaCl, isto kao i *p*CoA. SA ima tendenciju pada s porastom koncentracije soli i najniža je pri 200 mM NaCl. U slučaju ukupnog zbroja svih fenolnih kiselina, kao i kod kineskog kupusa, vidljiv je njihov porast s porastom koncentracije soli u odnosu na kontrolu a najznačajniji je pri koncentraciji od 100 mM NaCl. Bez obzira što razlike nisu statistički značajne, može se zaključiti da izlaganje kineskog i bijelog kupusa blažim koncentracijama NaCl potiče jaču sintezu fenolnih kiselina.

Kod bijelog kupusa najzastupljenije slobodne fenolne kiseline su 4HBA (10,91±2,98 pmol/mg s.m.), SiA (162,06±59,92 pmol/mg s.m.) i SA (47,00±11,33 pmol/mg s.m.). Izlaganje solnom stresu koncentracije 200 mM NaCl uzrokuje porast koncentracije 4HBA 1,20 puta u odnosu na kontrolu. Koncentracija soli od 200 mM uzrokuje pad koncentracije SiA (1,45 puta) i SA (1,43 puta) u odnosu na kontrolne klijance. Od konjugiranih fenolnih kiselina najzastupljenije su 4HBA (163,99±11,73 pmol/mg s.m.), VA (142,38±26,87 pmol/mg s.m.), SiA (5008,74±613,86 pmol/mg s.m.), FA (365,77±58,68 pmol/mg s.m.) i SA (82,89±14,84 pmol/mg s.m.). Od navedenih konjugiranih kiselina izlaganje solnom stresu od 200 mM NaCl uzrokuje povećanje sadržaja 4HBA (1,11 puta), VA (1,04 puta) i SiA (1,12 puta) u odnosu na kontrolne klijance. Od fenolnih kiselina vezanih za stanične stijenke najzastupljenije su SiA (636,51±90,56 pmol/mg s.m.) i FA (99,14±34,37 pmol/mg s.m.) te izlaganje koncentraciji soli od 200 mM NaCl uzrokuje pad njihove koncentracije, koja je u slučaju SiA 1,04 puta manja a kod FA 1,11 puta manja u odnosu na kontrolu.

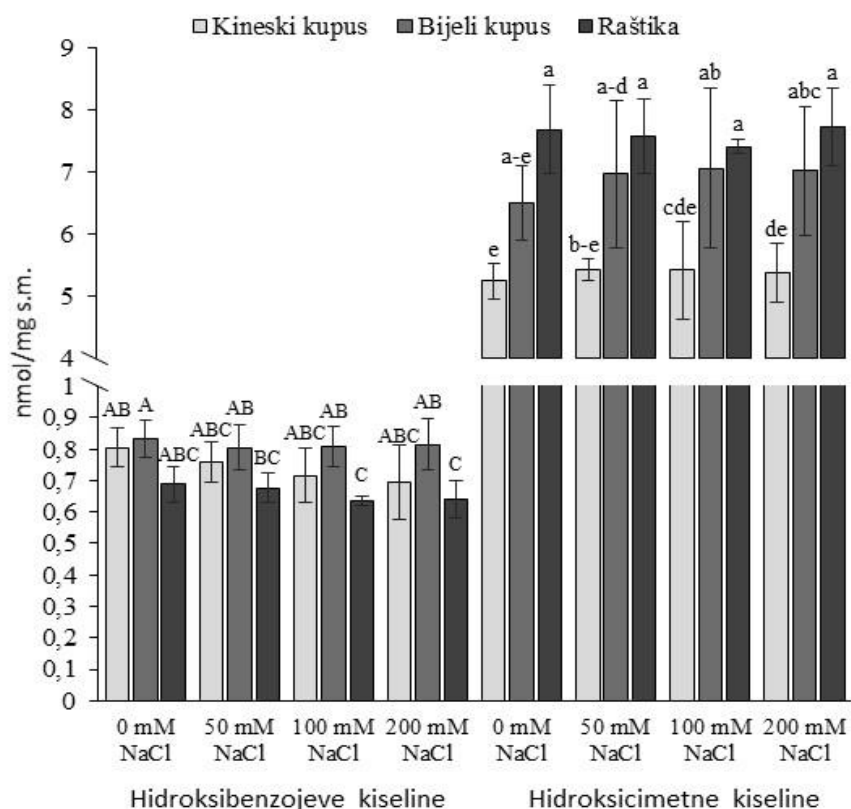
U kontrolnim klijancima raštike najzastupljenije su SiA (7073,88 pmol/mg s.m.), FA (284,55 pmol/mg s.m.), *p*CoA (189,08 pmol/mg s.m.) i VA (153,14 pmol/mg s.m.). Najviša razina SiA i

FA je pri koncentraciji od 200 mM NaCl u odnosu na kontrolu. *p*CoA bilježi statistički značajan pad s porastom koncentracije soli, a najniži nivo je pri koncentraciji od 200 mM NaCl. Kod VA nema značajnijih razlika u odnosu na tretman sa soli. SA kod raštike nije zastupljena u velikim koncentracijama (81,78 pmol/mg s.m.) tj. njena koncentracija je niža nego kod kineskog i bijelog kupusa. Prilikom izlaganja solnom stresu, primijećen je statistički značajan pad njene razine pri koncentraciji od 200 mM NaCl. Ukupni sadržaj fenolnih kiselina kod raštike vrlo je sličan kod svih tretmana, uključujući i kontrolu. Kod raštike najzastupljenije slobodne fenolne kiseline su 4HBA (6,18±1,67 pmol/mg s.m.), SiA (115,01±93,67 pmol/mg s.m.) i SA (27,08±3,36 pmol/mg s.m.) (**Tablica 3, Prilozi**). Koncentracija soli od 200 mM NaCl uzrokuje porast koncentracije 4HBA (1,33 puta) i SiA (2,92 puta), dok ista koncentracija soli uzrokuje pad sadržaja SA (1,72 puta) u odnosu na kontrolne klijance. Od konjugiranih fenolnih kiselina najzastupljenije su 4HBA (140,89±6,28 pmol/mg s.m.), VA (153,14±14,22 pmol/mg s.m.), *p*CoA (149,61±9,53 pmol/mg s.m.), SiA (6475,78±575,80 pmol/mg s.m.), FA (253,05±22,47 pmol/mg s.m.) i SA (54,71±3,44 pmol/mg s.m.). Izlaganje solnom stresu od 200 mM NaCl uzrokuje povećanje sadržaja FA (1,03 puta), dok je koncentracija VA (1,05 puta), *p*CoA (1,31 puta) i SA (1,49 puta) manja u odnosu na kontrolne klijance. Od fenolnih kiselina vezanih za stanične stijenke najzastupljenije su SiA (483,09±72,58 pmol/mg s.m.) i FA (30,04±8,20 pmol/mg s.m.) te izlaganje koncentraciji soli od 200 mM NaCl uzrokuje pad koncentracije SiA (1,20 puta) te porast sadržaja FA (1,16 puta) u odnosu na kontrolu.

Detektirane fenolne kiseline možemo podijeliti na hidroksicimetne kiseline (*p*CoA, CaA, FA i SiA) te hidroksibenzojeve kiseline (PA, GaA, VA, 4HBA, SyA i SA). Njihov sadržaj u svakoj pojedinoj vrsti prikazan je na **sluci 32**.

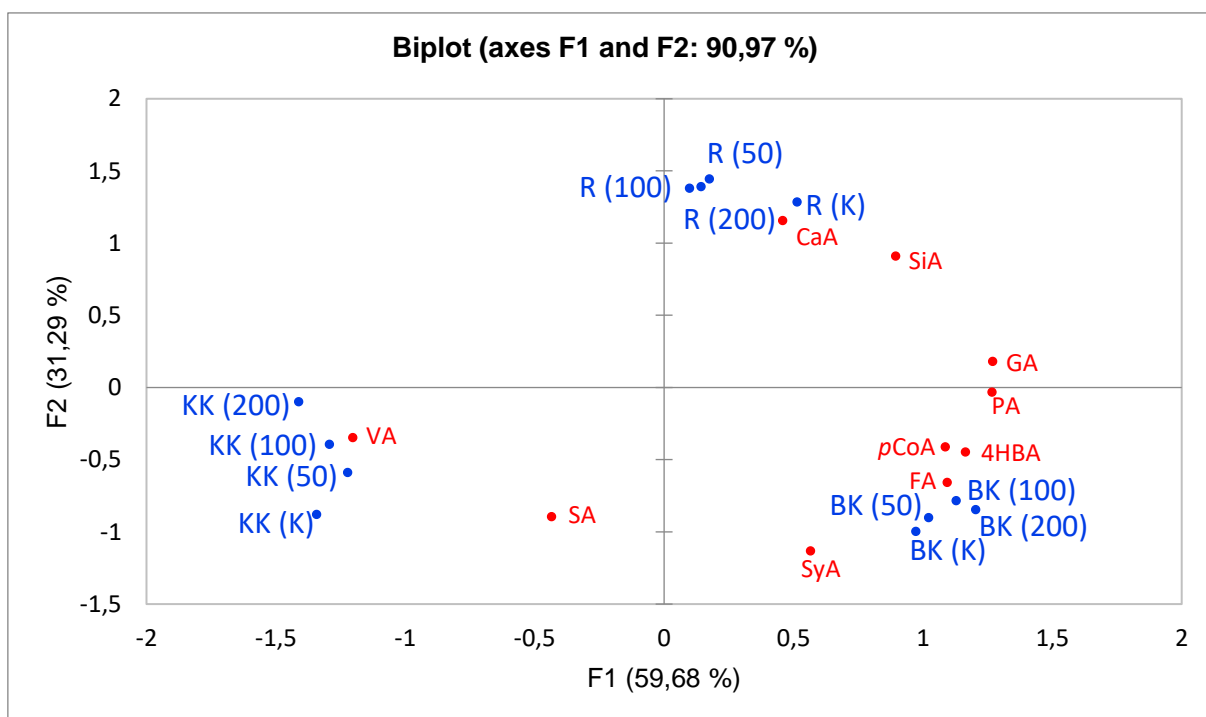
Iz rezultata je vidljivo da su hidroksicimetne kiseline zastupljenije od hidroksibenzojevih kiselina kod sve tri vrste klijanaca. Kod sva tri varijeteta nema značajnijih razlika u sadržaju hidroksibenzojevih i hidroksicimetnih kiselina prilikom izlaganja solnom stresu u odnosu na njihove kontrole. Najveći nivo hidroksibenzojevih kiselina ima bijeli kupus, slijedi kineski kupus i na poslijetku raštika s najnižim sadržajem. Hidroksicimetne kiseline su najzastupljenije kod raštike, potom bijelog kupusa i na kraju kod kineskog kupusa.

Korelacije između intenziteta solnih tretmana, sadržaja pojedinačnih fenolnih kiselina izmjerenih UHPLC-MS/MS metodom i varijeteta (kineskog kupusa, bijelog kupusa i raštike) prikazan je 2D-PCA (**Slika 33**). Prve dvije glavne komponente, F1 i F2 objasnile su 90,971% kumulativne varijabilnosti izmjerenih parametara. Varijeteti su se jasno odvojili: kineski kupus se smjestio u donjem lijevom kvadrantu, bijeli kupus u donjem desnom kvadrantu, a raštika u gornjem desnom kvadrantu. 2D-PCA također prikazuje odnos fenolnih kiselina s obzirom na koncentraciju soli i varijetet. Pri tom vidimo da je većina fenolnih kiselina grupirana u blizini raštike i bijelog kupusa što upućuje na činjenicu da su ta dva varijeteta bogatija fenolnim kiselinama u odnosu na kineski kupus. Značajnije promjene uslijed solnog stresa u SA i VA prisutne su u kineskom kupusu, dok su SiA i CaA vezane za raštiku, a značajnije promjene u FA, 4HBA i *p*CoA su vezane za bijeli kupus.



Slika 32. Sadržaj hidroksibenzojevih i hidroksicimnetnih kiselina kod kineskog kupusa, bijelog kupusa i raštika uslijed tretmana solnim stresom u odnosu na pripadajuće kontrole. Rezultati su srednja vrijednost \pm SD ($n=5$). Različita velika slova predstavljaju statistički značajne razlike u odnosu na pojedini tretman i njihove odgovarajuće kontrole u slučaju hidroksibenzojevih kiselina a različita mala slova statistički značajne razlike u odnosu na pojedini tretman i njihove odgovarajuće kontrole kod hidroksicimnetnih kiselina ($p < 0,05$).

Pearsonovi linearni koeficijenti (**Tablica 4 u priložima**) pokazali su pozitivne korelacije između parametara koji su usko grupirani u gornjem desnom kvadrantu a vezani su uz raštiku: SiA pozitivno korelira s GA (0,776) i CaA (0,872). Također, pozitivne korelacije prisutne su između parametara koji su usko grupirani u donjem desnom kvadrantu a vezani su uz bijeli kupus: FA pozitivno korelira s PA (0,853), 4HBA (0,957) pCoA (0,826), i SyA (0,836). Suprotno, VA koja je grupirana u donjem lijevom kvadrantu i vezana uz kineski kupus je u negativnoj korelaciji sa SiA (-0,847).



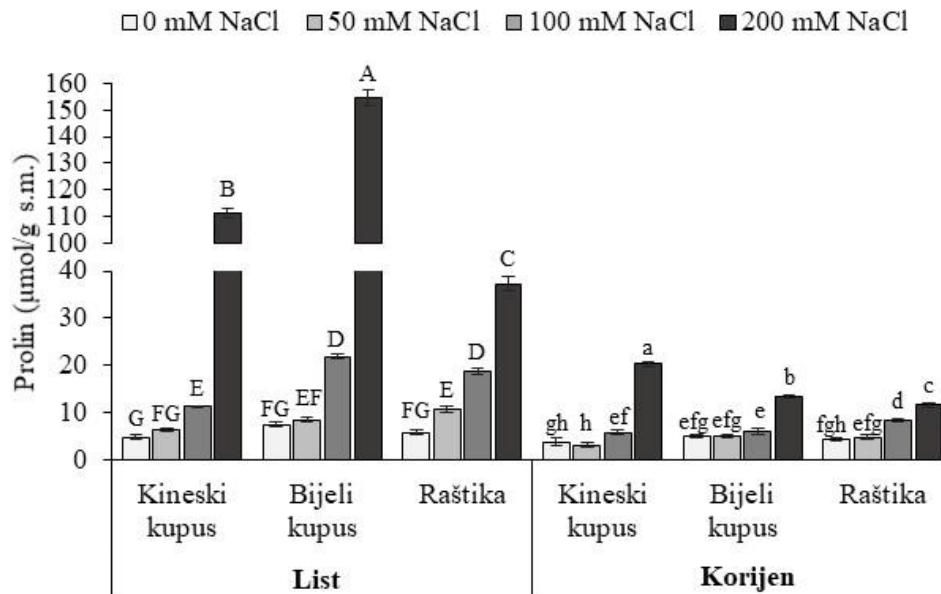
Slika 33. Dvodimenzionalna analiza glavnih komponentata (2D-PCA) ukupnih fenolnih kiselina izmjenjenih metodom UHPLC-MS/MS kod kineskog kupusa (KK), bijelog kupusa (BK) i raštike (R) nakon 24 sata izlaganja 0 (K), 50, 100 i 200 mM NaCl. Crveni simboli označavaju položaj ukupnih fenolnih kiselina u tablicama kao što su galna kiselina (GaA), protokatehinska kiselina (PA), 4-hidroksibenzojeva kiselina (4HBA), kava kiselina (CaA), vanilinska kiselina (VA), siringinska kiselina (SyA), 4-kumarinska kiselina (pCoA), sinapinska kiselina (SiA), ferulinska kiselina (FA) i salicilna kiselina (SA). Plavi simboli prikazuju položaj klijanca različitih varijeteta nakon svakog tretmana. Za PCA prikaz korišteni su podatci iz Tablica 7.

3.2. Odgovor biljaka kineskog kupusa (*B.rapa* spp. *pekinensis*), bijelog kupusa (*B. oleracea* var. *capitata*) i raštike (*B. oleracea* var. *acephala*) na povišeni salinitet

Biljke kineskog kupusa, bijelog kupusa i raštike uzgojene su hidroponski do starosti četiri do pet tjedna nakon čega su tretirane NaCl (50-200 mM) u trajanju od 24 h. Stupanj stresa određen je mjerenjem markera stresa (prolin). Određen je antioksidacijski odgovor kupusnjača mjenjen DPPH i FRAP metodama, i sadržaj specijaliziranih metabolita spektrofotometrijskim metodama. Također, provedeno je detaljnije profiliranje fenolnih kiselina putem UHPLC-MS/MS metode. Nadalje provedeni su eksperimenti pred-tretmana biljaka odabranim fenolnim kiselinama u svrhu povećanja tolerancije na solni stres.

3.2.1. Sadržaj prolina

Promjene u koncentraciji prolina kao pouzdanog markera stresa u listovima i korijenu tri vrste kupusnjača uslijed povišenog saliniteta prikazane su na **Slici 34**.

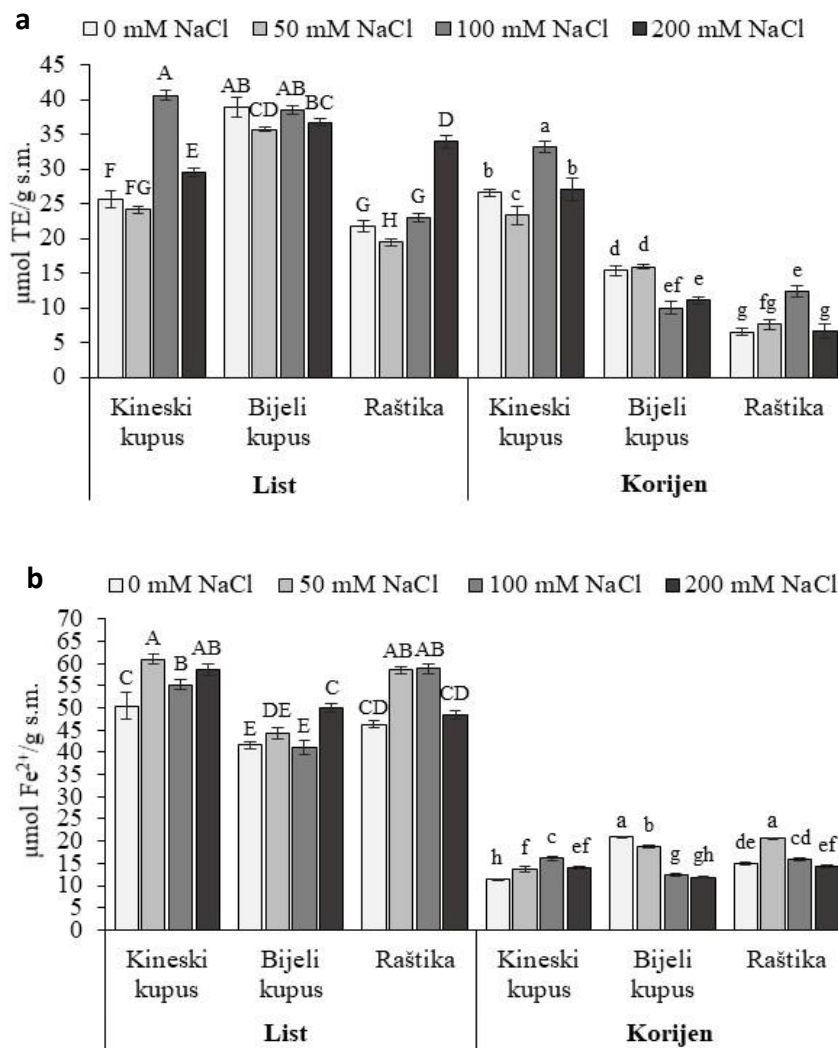


Slika 34. Sadržaj prolina kod tri vrste kupusnjača izloženih solnom stresu u rasponu koncentracija NaCl od 0-200 mM. Podatci predstavljaju srednju vrijednost \pm SD (n=3). Različita velika slova na grafikonima predstavljaju statistički značajne razlike koncentracije prolina u listovima kupusnjača dok različita mala slova predstavljaju statistički značajne razlike koncentracije prolina u korijenu kupusnjača u odnosu na tretmane i vrste ($p < 0,05$).

Rezultati pokazuju da listovi imaju veći sadržaj prolina u odnosu na korijen u sva tri varijeteta. Kontrolne biljke kineskog kupusa imaju 4,86 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ s.m. prolina u listovima te 3,84 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ s.m. prolina u korijenu. S porastom koncentracije NaCl raste i sadržaj prolina kako u listovima tako i u korijenu te je pri najvišoj koncentraciji soli (200 mM) u listovima 22,92 puta veći a u korijenu 5,31 puta veći u odnosu na kontrolu. Kod bijelog kupusa netretirane biljke sadrže 7,57 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ s.m. prolina u listovima te 5,14 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ s.m. prolina u korijenu. Pri koncentraciji soli od 200 mM NaCl u listovima bijelog kupusa koncentracija prolina je 20,40 puta veći a u korijenu 2,63 puta veći u odnosu na kontrolu. Kod raštike također je primijećen porast koncentracije prolina prilikom solnih tretmana ali nije toliko izražen u odnosu na prethodne dvije vrste. U kontrolnim biljkama raštike listovi imaju 5,95 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ s.m. prolina a korijen 4,47 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ s.m. prolina. Izlaganjem biljaka koncentraciji soli od 200 mM uzrokuje porast prolina 6,26 puta u listovima te 2,63 puta u korijenu u odnosu na njihove odgovarajuće kontrole.

3.2.2 Antioksidacijski odgovor biljaka kupusnjača

Antioksidacijski odgovor listova i korijena kineskog kupusa, bijelog kupusa i raštike uslijed izlaganja solnom stresu (50-200 mM NaCl) određen je DPPH i FRAP metodama (**slika 35**). Antioksidacijska aktivnost izmjerena DPPH metodom veća je u listovima nego u korijenu. U listovima kineskog kupusa najveća aktivnost je izmjerena pri koncentraciji soli od 100 mM NaCl te je 1,58 puta veća u odnosu na kontrolu. Kod bijelog kupusa nema značajnijih razlika prilikom izlaganja solnom stresu, blagi pad u odnosu na kontrolu vidljiv je pri koncentraciji soli od 50 mM NaCl, dok u listovima raštike značajna antioksidacijska aktivnost izražena je pri najvišoj koncentraciji soli (200 mM NaCl) gdje je 1,56 puta veća nego kod kontrole.



Slika 35. Antioksidacijska aktivnost biljaka kineskog kupusa, bijelog kupusa i raštike mjerena **a**) DPPH i **b**) FRAP metodama prilikom izlaganja solnom stresu (0-200 mM NaCl). Rezultati su srednja vrijednost \pm SD (n=3). Različita velika slova predstavljaju statistički značajne razlike u kod listova dok različita mala slova predstavljaju statistički značajne razlike kod korijena u odnosu na tretmane i vrste ($p < 0,05$).

U korijenu kineskog kupusa prisutan je isti trend porasta antioksidacijske aktivnosti kao i u listovima te je pri koncentraciji soli od 100 mM NaCl ta vrijednost 1,25 puta veća u odnosu na kontrolu. U korijenu bijelog kupusa vidljiv je značaj pad antioksidacijske aktivnosti prilikom izlaganja solnom stresu te je 1,54 puta manja kod 100 mM NaCl i 1,39 puta manja kod 200 mM NaCl u odnosu na kontrolu. U konačnici, u korijenu raštike najveći porast antioksidacijske aktivnosti je pri koncentraciji soli od 100 mM (1,89 puta veća nego kod kontrole).

Antioksidacijska aktivnost mjerena FRAP metodom, također je veća u listovima nego u korijenu. U listovima kineskog kupusa dolazi do značajnog porasta antioksidacijske aktivnosti kod sve tri koncentracije soli (50-200 mM) te je oko 1,1 puta veća u odnosu na kontrolu. Bijeli kupus ima najveću antioksidacijsku aktivnost pri koncentraciji od 200 mM NaCl (1,20 puta veća nego kod kontrole), dok je kod raštika izmjereno povećanje antioksidacijske aktivnosti oko 1,27 puta pri koncentracijama od 50 mM i 100 mM NaCl u odnosu na kontrolu.

U korijenu kineskog kupusa i raštike dolazi do povećanja antioksidacijske aktivnosti izlaganjem solnom stresu u odnosu na kontrolu, koja je u slučaju kineskog kupusa najizraženija pri 100 mM NaCl (1,43 puta veća) a kod raštike pri 50 mM NaCl (1,38 puta veća). Zanimljivo, kod bijelog kupusa, izlaganje solnom stresu uzrokuje pad antioksidacijske aktivnosti te je najveći pri najvišoj koncentraciji NaCl (1,76 puta manja u odnosu na kontrolu).

3.2.3. Sadržaj specijaliziranih metabolita

Sadržaji specijaliziranih metabolita (ukupni fenoli, fenolne kiseline, flavonoidi, flavanoli, glukozinolati i karotenoidi) određeni su spektrofotometrijski (**Tablica 9**). Najveći sadržaj ukupnih fenola prisutan je u raštici, kako u listovima tako i u korijenu a izlaganje solnom stresu uzrokuje pad njihove koncentracije koja je najizraženija pri 200 mM NaCl.

U listovima kineskog i bijelog kupusa solni stres uzrokuje porast razine ukupnih fenola te je pri koncentraciji od 100 mM NaCl 1,3 puta veća u slučaju kineskog kupusa i 1,11 puta veća kod bijelog kupusa u odnosu na kontrolu. U korijenu kineskog i bijelog kupusa izlaganje blažim koncentracijama NaCl uzrokuje porast sadržaja ukupnih fenola. Pri najvišoj koncentraciji NaCl (200 mM) kod kineskog kupusa dolazi do blagog pada sadržaja ukupnih fenola u odnosu na blaže koncentracije soli, ali kada se taj sadržaj uspoređuje s kontrolnim biljkama njihova koncentracija je još uvijek statistički značajno povećana. U sadržaju ukupnih fenolnih kiselina nema značajnijih odstupanja između pojedinih varijeteta s time da listovi imaju veći nivo fenolnih kiselina od korijena.

Tablica 9. Sadržaj specijaliziranih metabolita (ukupnih fenola, ukupnih fenolnih kiselina, ukupnih flavonoida, ukupnih flavanola, ukupnih glukozinolata i ukupnih karotenoida) kod biljaka kineskog kupusa, bijelog kupusa i raštike podvrnutih solnom stresu u rasponu koncentracija od 0-200 mM NaCl. Rezultati su srednja vrijednost \pm SD (n=3), svijetlo siva boja predstavlja najmanje vrijednosti dok tamno zelena najviše vrijednosti. Različita slova predstavljaju statistički značajne razlike u odnosu na tretmane i vrste, posebno za list i korijen ($p < 0,05$).

List							
Vrsta	NaCl mM	Ukupni fenoli	Fenolne kiseline	Flavonoidi	Flavanoli	Glukozinolati	Karotenoidi
		mg GAE/g s.m.	mg CAE/g s.m.	mg CE/g s.m.	μ g CE/g s.m.	mg sinigrin/g s.m.	mg/g s.m.
Kineski k.	0	19,16 \pm 0,63 g	3,67 \pm 0,05 bcd	5,36 \pm 0,08 c	43,48 \pm 2,84 ef	41,79 \pm 2,52 g	0,35 \pm 0,06 c
	50	22,83 \pm 0,18 d	3,86 \pm 0,22 ab	5,93 \pm 0,16 ab	53,17 \pm 1,82 bc	48,21 \pm 1,34 f	0,70 \pm 0,05 bc
	100	24,93 \pm 0,25 c	4,17 \pm 0,10 a	5,09 \pm 0,03 cd	41,20 \pm 2,03 f	49,92 \pm 1,88 ef	0,74 \pm 0,09 bc
	200	20,71 \pm 0,34 f	3,38 \pm 0,07 de	5,74 \pm 0,13 b	50,44 \pm 2,97 bcd	60,77 \pm 0,56 bc	0,27 \pm 0,07 c
Bijeli k.	0	21,90 \pm 0,31 e	3,55 \pm 0,10 bcd	4,54 \pm 0,07 e	54,58 \pm 1,83 ab	54,20 \pm 2,85 de	1,61 \pm 0,38 a
	50	18,83 \pm 0,27 g	3,15 \pm 0,17 e	3,96 \pm 0,06 f	52,88 \pm 2,70 bc	56,63 \pm 1,21 cd	1,65 \pm 0,33 a
	100	24,34 \pm 0,29 c	3,73 \pm 0,14 bc	3,27 \pm 0,07 g	41,12 \pm 2,20 f	60,51 \pm 1,52 bc	1,60 \pm 0,32 a
	200	22,97 \pm 0,22 d	3,13 \pm 0,09 e	4,97 \pm 0,10 d	48,75 \pm 1,83 b-e	70,23 \pm 1,14 a	1,28 \pm 0,06 ab
Raštika	0	26,14 \pm 0,22 b	3,79 \pm 0,084 b	5,24 \pm 0,10 cd	60,56 \pm 2,80 a	46,61 \pm 0,95 fg	1,71 \pm 0,30 a
	50	30,50 \pm 0,27 a	3,58 \pm 0,08 bcd	6,15 \pm 0,06 a	53,30 \pm 1,61 bc	56,59 \pm 2,18 cd	1,75 \pm 0,15 a
	100	24,63 \pm 0,06 c	3,85 \pm 0,04 ab	5,09 \pm 0,13 cd	47,68 \pm 2,45 c-f	60,64 \pm 1,31 bc	1,97 \pm 0,25 a
	200	23,03 \pm 0,30 d	3,45 \pm 0,04 cde	4,58 \pm 0,13 e	45,19 \pm 2,44 def	65,02 \pm 0,71 b	1,81 \pm 0,36 a
Korijen							
Kineski k.	0	5,59 \pm 0,30 g	0,74 \pm 0,06 abc	0,79 \pm 0,05 cde	19,44 \pm 2,49 ef	27,08 \pm 1,32 ef	ND
	50	8,13 \pm 0,24 e	0,74 \pm 0,14 abc	0,73 \pm 0,12 de	19,88 \pm 2,54 ef	29,25 \pm 0,87 b-e	ND
	100	11,39 \pm 0,05 bc	0,85 \pm 0,15 ab	1,00 \pm 0,15 bc	18,14 \pm 1,86 f	28,68 \pm 0,80 cde	ND
	200	9,53 \pm 0,32 d	0,91 \pm 0,07 a	0,65 \pm 0,04 e	16,75 \pm 2,48 f	30,14 \pm 1,13 bcd	ND
Bijeli k.	0	10,81 \pm 0,19 c	0,64 \pm 0,08 bc	1,36 \pm 0,07 a	65,04 \pm 2,84 a	27,84 \pm 1,32 def	ND
	50	11,40 \pm 0,20 b	0,53 \pm 0,07 c	0,92 \pm 0,08 cd	52,95 \pm 1,82 b	30,63 \pm 0,78 bc	ND
	100	8,17 \pm 0,10 e	0,82 \pm 0,04 ab	1,38 \pm 0,06 a	33,85 \pm 2,73 c	31,82 \pm 0,75 b	ND
	200	7,44 \pm 0,12 f	0,87 \pm 0,05 ab	0,76 \pm 0,03 de	26,02 \pm 1,90 de	35,12 \pm 0,39 a	ND
Raštika	0	12,02 \pm 0,17 a	0,70 \pm 0,07 abc	1,16 \pm 0,03 ab	70,50 \pm 1,59 a	22,90 \pm 0,67 g	ND
	50	9,96 \pm 0,12 d	0,52 \pm 0,09 c	1,01 \pm 0,06 bc	49,59 \pm 2,31 b	25,93 \pm 0,97 f	ND
	100	9,52 \pm 0,26 d	0,64 \pm 0,05 bc	0,76 \pm 0,09 de	27,34 \pm 2,45 cd	26,99 \pm 0,70 ef	ND
	200	8,59 \pm 0,08 e	0,67 \pm 0,10 abc	0,88 \pm 0,08 cde	22,91 \pm 2,98 def	28,31 \pm 0,96 c-f	ND

Od sva tri varijeteta najveći sadržaj flavonoida i flavanola ima raštika dok su kod kineskog i bijelog kupusa prisutni u nešto manjoj koncentraciji, te su zastupljeniji u listovima u odnosu na korijen. U uvjetima niskih koncentracija soli kod kineskog kupusa i raštike dolazi do blagog povećanja flavonoida u listovima.

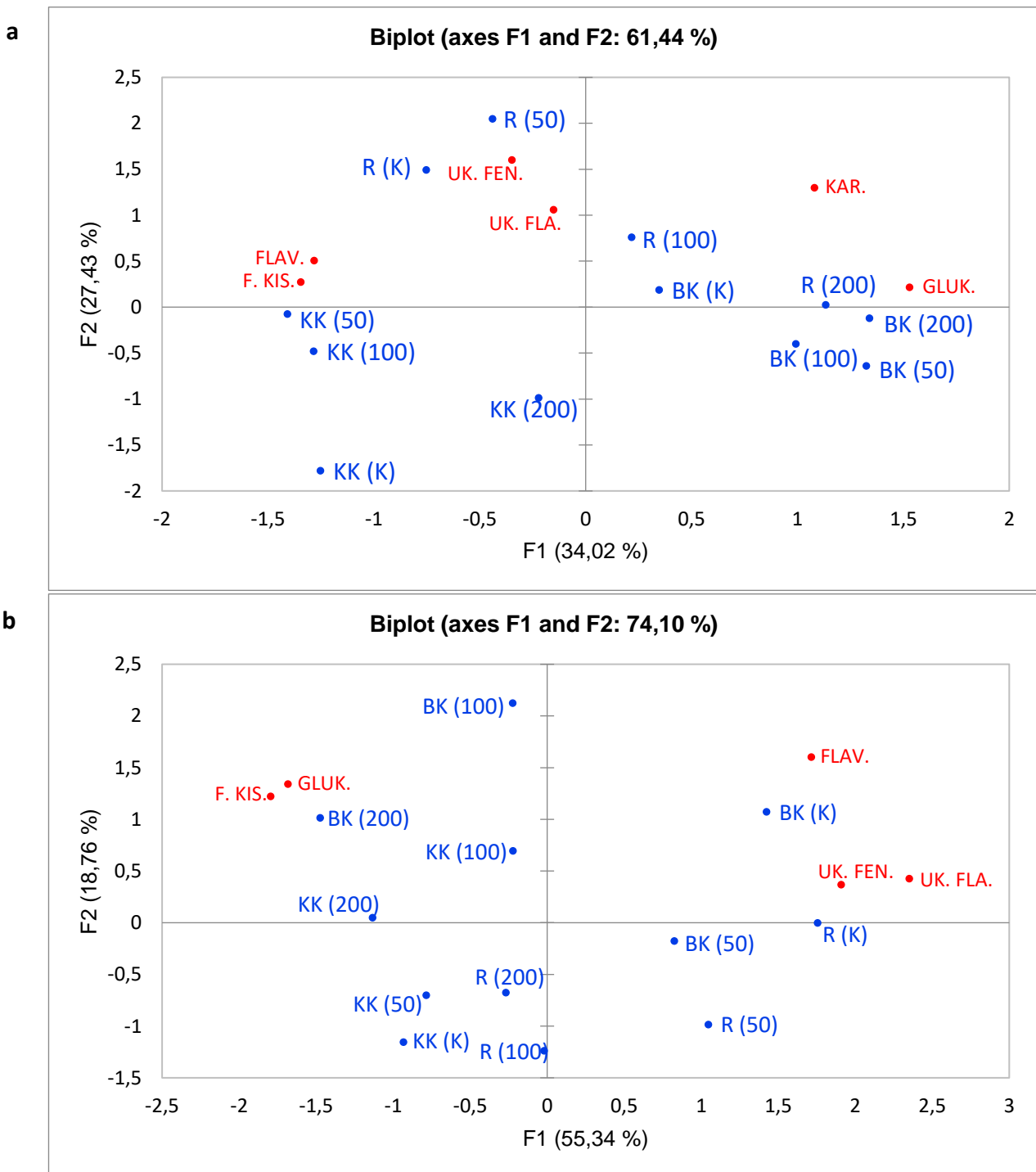
Kod sve tri vrste kupusnjača sadržaj glukozinolata se povećava s porastom koncentracije soli u listovima i korijenu te je najveća pri 200 mM NaCl. U listovima najveći porast u odnosu na

kontrolu prisutan je kod kineskog kupusa (1,45 puta) a u korijenu kod bijelog kupusa (1,26 puta).

Raštika, u odnosu na sva tri varijeteta, ima najveću koncentraciju ukupnih karotenoida a kineski kupus najmanju. Kod kineskog kupusa izlaganje solnom stresu od 50 mM i 100 mM NaCl uzrokuje porast sadržaja karotenoida. U slučaju bijelog kupusa i raštike povećani salinitet ne uzrokuje značajnije promjene u sadržaju ukupnih karotenoida.

Na **slici 36** prikazana je dvodimenzionalna analiza glavnih komponenata (2D-PCA) specijaliziranih metabolita u listu i korijenu kod biljaka kineskog kupusa (KK), bijelog kupusa (BK) i raštike (R) u odnosu na intenzitet solnog stresa (0-200 mM NaCl). Prve dvije glavne komponente, F1 i F2 objasnile su 61,44% kumulativne varijabilnosti izmjerenih parametara u listu i 74,10% istih u korijenu. Pozicioniranje varijeteta na **slici 36a** upućuje na činjenicu da su veće promjene u specijaliziranim metabolitima uslijed solnog stresa zabilježene u raštici te se taj varijetet pozicionira u gornjem lijevom i desnom kvadrantu s obzirom na intenzitet solnog stresa, zatim u bijelom kupusu koji se pozicionira s kontrolom u gornji desni kvadrant dok su varijable koje predstavljaju solni stres u donjem desnom kvadrantu. Varijable kineskog kupusa pozicionirane su u donjem lijevom kvadrantu. 2D-PCA također prikazuje odnos specijaliziranih metabolita s obzirom na koncentraciju soli i varijetet. Pri tom vidimo da je većina specijaliziranih metabolita grupirana u blizini raštike i bijelog kupusa što upućuje na činjenicu da su ta dva varijeteta bogatija tim spojevima u odnosu na kineski kupus. Značajnije promjene uslijed solnog stresa u flavonoidima i fenolnim kiselinama prisutne su u listu kineskog kupusa i raštike, a značajnije promjene u karotenoidima i glukozinolatima prisutne su u listovima raštike i bijelog kupusa. Pearsonovi linearni koeficijenti (**Tablica 5 u prilogima**) pokazali su pozitivne korelacije parametara koji su usko grupirani u gornjem lijevom kvadrantu a vezani su uz raštiku: UK.FEN pozitivno koreliraju s F.KIS. (0,398), UK.FLA. (0,164) i FLAV. (0,311). Također je prisutna pozitivna korelacija parametara grupiranih u gornjem desnom kvadrantu a vezani su uz raštiku i bijeli kupus gdje GLUK. pozitivno koreliraju s KAR. (0,396).

Pozicioniranje varijeteta s obzirom na solni stres u korijenu (**slika 36b**), koji su poprilično razbacani kroz različite kvadrante upućuje na činjenicu da solni stres uzrokuje veće promjene u korijenu s obzirom na list kupusnjača. Pri tome se specijalizirani metaboliti pozicioniraju u blizini bijelog i kineskog kupusa. Detaljnije, glukozinolati i fenolne kiseline pozicionirani su u blizini kineskog i bijelog kupusa izloženog višim koncentracijama soli. Flavonoidi, ukupni fenoli i flavanoli pozicionirani su u blizini kontrola bijelog kupusa i raštike.



Slika 36. Dvodimenzionalna analiza glavnih komponentata (2D-PCA) specijaliziranih metabolita kod **a)** listova i **b)** korijena biljaka kineskog kupusa (KK), bijelog kupusa (BK) i raštike (R) nakon izlaganja solnom stresu, 0 mM (K), 50, 100 i 200 mM NaCl. Crveni simboli označavaju položaj specijaliziranih metabolita u tablicama kao što su glukozinolati (GLUK), karotenoidi (KAR) i fenolni spojevi (ukupni fenoli (UK. FEN.), ukupni flavonoidi (FLAV.), ukupne fenolne kiseline (F. KIS.), ukupni flavanoli (UK. FLA.)). Plavi simboli prikazuju položaj različitih varijeteta nakon svakog tretmana s različitim koncentracijama NaCl. Za PCA prikaz su korišteni rezultati Tablice 9.

Pearsonovi linearni koeficijenti (**Tablica 5 u priložima**) pokazali su pozitivne korelacije parametara koji su usko grupirani u gornjem lijevom kvadrantu a vezani su uz kineski kupus i bijeli kupus izloženih koncentracijama soli od 100 mM i 200 mM NaCl gdje F.KIS. pozitivno koreliraju s GLUK. (0,469). Pozitivna korelacija uočena je u parametara grupiranih u gornjem desnom kvadrantu vezanih uz bijeli kupus gdje UK.FEN. pozitivno koreliraju s FLAV. (0,392) i UK.FLA (0,625).

3.2.4. Profil i sadržaj fenolnih kiselina u listu i korijenu biljaka kupusnjača

Pojedinačne fenolne kiseline u listu i korijenu kupusnjača uzgojenih i tretiranih u hidroponskom uzgoju određene su UHPLC-MS/MS metodom kao što je opisano za klijance. Za razliku od klijanaca, kod hidroponski uzgojenih kupusnjača mjerene su isključivo slobodne fenolne kiseline.

Detektirane fenolne kiseline kod biljaka kineskog kupusa, bijelog kupusa i raštike su protokatehinska kiselina (PA); klorogenska kiselina (ChA); 4-kumarinska kiselina (*p*CoA); sinapinska kiselina (SiA); ferulinska kiselina (FA) i salicilna kiselina (SA) (**tablica 10**).

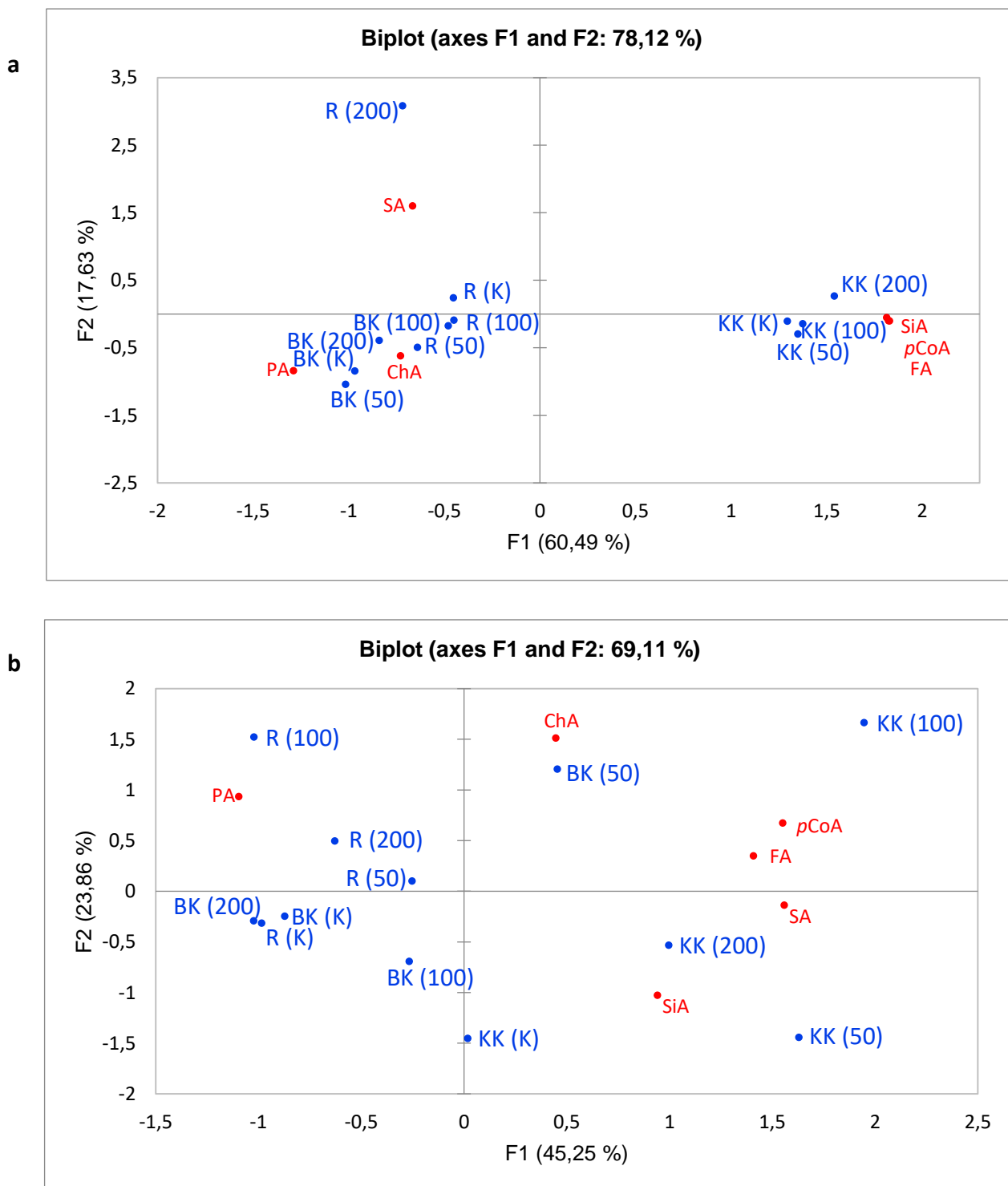
U listovima kontrolnih biljaka kineskog kupusa najzastupljenije fenolne kiseline su ferulinska kiselina (3127,25±611,81 nmol/mg s.m.), sinapinska kiselina (870,19±166,68 nmol/mg s.m.) i *p*-kumarinska kiselina (199,18±4,99 nmol/mg s.m.). Prilikom izlaganja solnom stresu (50-200 mM NaCl) dolazi do porasta njihove koncentracije. Kod sinapinske i ferulinske kiseline najveći porast primijećen je pri koncentraciji soli od 50 mM (1,11 puta i 1,23 puta) a kod *p*-kumarinske kiseline pri koncentraciji od 200 mM NaCl (1,11 puta) u odnosu na kontrolu. U korijenu kineskog kupusa sadržaj ferulinske kiseline najveći je pri 200 mM NaCl i to 2,42 puta veći u odnosu na kontrolu dok je koncentracija *p*-kumarinske kiseline 6,80 puta veća pri 100 mM NaCl i u odnosu na kontrolu. Također, u korijenu kineskog kupusa dolazi do promijene salicilne kiseline posebno prilikom izlaganja blažim koncentracijama soli. Pri 50 mM NaCl sadržaj salicilne kiseline poraste 2,89 puta a pri 100 mM 2,48 puta u odnosu na kontrolne biljke.

Za razliku od kineskog kupusa, bijeli kupus i raštika nemaju slobodne fenolne kiseline zastupljene u tako značajnijim koncentracijama kao što je izmjereno u kineskom kupusu. Izlaganje solnom stresu uzrokuje promijene u protokatehinskoj kiselini u listovima bijelog kupusa koja je najizraženija pri 50 mM NaCl. U korijenu bijelog kupusa najveća promjena u koncentraciji vidljiva je kod ferulinske kiseline, koja pri 50 mM NaCl poraste za 4,15 puta u odnosu na kontrolu. Kod raštike najviše se mijenja koncentracija salicilne kiseline, kako u listovima tako i u korijenu. U listovima dolazi do njenog izrazitog porasta pri 200 mM NaCl te je 3,77 puta veća u odnosu na kontrolne biljke. U korijenu raštike sadržaj salicilne kiseline najviše se mijenja prilikom izlaganja koncentraciji soli od 50 mM te je 2,18 puta veći nego u kontroli.

Tablica 10. Sadržaj slobodnih fenolnih kiselina kod kineskog kupusa, bijelog kupusa i raštike. Rezultati su srednja vrijednost \pm SD (n=3), svijetlo siva boja predstavlja najmanje vrijednosti dok tamno zelena najviše vrijednosti. Različita slova predstavljaju statistički značajne razlike za svaku pojedinu fenolnu kiselinu i tkivo posebno, u odnosu na tretmane i vrste ($p < 0,05$).

List							
Fenolne kiseline (nmol/mg s.m.)							
NaCl (mM)	PA	ChA	p-CoA	SiA	FA	SA	
Kineski k.	0	2,76 \pm 0,90 cd	25,36 \pm 4,40 b	199,18 \pm 4,99 a	870,19 \pm 166,68 a	3127,25 \pm 611,81 a	7,48 \pm 2,77 b
	50	1,98 \pm 0,49 cd	50,41 \pm 21,81 b	171,20 \pm 22,69 a	970,07 \pm 154,15 a	3839,89 \pm 254,81 a	7,53 \pm 0,60 b
	100	1,39 \pm 0,35 d	25,87 \pm 3,73 b	152,78 \pm 38,43 a	890,82 \pm 126,44 a	3404,12 \pm 444,60 a	4,37 \pm 0,83 b
	200	1,28 \pm 0,24 d	31,00 \pm 3,58 b	220,70 \pm 71,48 a	942,64 \pm 114,06 a	3380,61 \pm 183,04 a	9,12 \pm 1,38 b
Bijeli k.	0	4,24 \pm 0,33 a-d	116,21 \pm 28,84 a	2,41 \pm 0,47 b	25,04 \pm 5,49 b	50,59 \pm 7,91 b	12,44 \pm 2,81 b
	50	8,05 \pm 2,45 a	53,28 \pm 0,00 b	2,07 \pm 0,96 b	15,13 \pm 4,53 b	31,43 \pm 1,52 b	10,02 \pm 3,18 b
	100	3,61 \pm 0,30 bcd	34,67 \pm 1,82 b	4,48 \pm 0,41 b	17,36 \pm 3,83 b	23,10 \pm 2,66 b	7,13 \pm 0,11 b
	200	6,87 \pm 2,41 ab	35,84 \pm 5,96 b	2,45 \pm 0,52 b	31,57 \pm 10,17 b	25,57 \pm 6,49 b	11,82 \pm 2,26 b
Raštika	0	3,19 \pm 0,63 bcd	29,37 \pm 3,54 b	2,16 \pm 0,29 b	16,65 \pm 1,50 b	48,23 \pm 7,38 b	9,69 \pm 1,51 b
	50	5,36 \pm 0,83 abc	33,60 \pm 3,28 b	3,38 \pm 0,44 b	19,33 \pm 7,47 b	30,03 \pm 12,93 b	7,42 \pm 0,65 b
	100	2,29 \pm 0,12 cd	51,31 \pm 8,89 b	1,83 \pm 0,07 b	9,94 \pm 0,17 b	26,13 \pm 6,19 b	7,44 \pm 1,71 b
	200	2,26 \pm 0,80 cd	34,50 \pm 5,40 b	4,08 \pm 2,09 b	12,69 \pm 0,72 b	36,33 \pm 8,35 b	36,50 \pm 8,10 a
Korijen							
Kineski k.	0	2,68 \pm 0,98 def	1,73 \pm 0,63 d	6,49 \pm 1,01 cd	1,05 \pm 0,07 ab	6,00 \pm 0,17 b-e	65,67 \pm 3,25 b
	50	3,14 \pm 0,46 c-f	1,78 \pm 0,84 d	18,76 \pm 4,38 b	1,44 \pm 0,18 a	10,70 \pm 1,57 abc	190,01 \pm 9,75 a
	100	1,59 \pm 0,41 f	6,17 \pm 1,13 ab	44,10 \pm 4,40 a	0,52 \pm 0,09 bc	11,49 \pm 1,89 ab	163,05 \pm 0,00 a
	200	1,70 \pm 0,73 ef	3,58 \pm 1,39 a-d	15,88 \pm 5,61 bc	1,17 \pm 0,31 a	14,51 \pm 2,04 a	32,86 \pm 7,48 cd
Bijeli k.	0	5,01 \pm 1,53 b-f	3,57 \pm 1,35 a-d	4,32 \pm 1,03 d	0,53 \pm 0,10 bc	2,52 \pm 0,10 e	25,27 \pm 3,93 d
	50	3,43 \pm 1,14 b-f	7,31 \pm 2,21 a	12,00 \pm 0,14 bcd	0,53 \pm 0,11 bc	10,45 \pm 3,73 abc	59,31 \pm 12,21 b
	100	2,94 \pm 1,00 c-f	2,33 \pm 0,93 cd	8,18 \pm 2,39 cd	0,56 \pm 0,22 bc	5,58 \pm 0,53 cde	54,27 \pm 4,62 bc
	200	7,07 \pm 2,84 b-e	1,75 \pm 0,48 d	4,89 \pm 0,26 d	0,36 \pm 0,07 c	5,17 \pm 1,39 cde	12,83 \pm 4,49 d
Raštika	0	7,44 \pm 0,60 bcd	2,26 \pm 0,05 cd	5,19 \pm 0,30 cd	0,50 \pm 0,10 bc	3,47 \pm 0,56 de	29,31 \pm 6,77 cd
	50	8,90 \pm 1,62 b	5,69 \pm 0,89 abc	5,73 \pm 0,20 cd	1,27 \pm 0,33 a	4,17 \pm 0,57 de	63,98 \pm 4,96 b
	100	14,44 \pm 3,07 a	5,24 \pm 1,86 a-d	6,51 \pm 0,51 cd	0,47 \pm 0,02 bc	6,79 \pm 0,33 b-e	24,95 \pm 6,22 d
	200	8,05 \pm 0,07 bc	3,00 \pm 0,75 bcd	7,65 \pm 1,78 cd	0,28 \pm 0,03 c	9,44 \pm 1,03 a-d	15,35 \pm 4,25 d

Na slici 37 prikazana je dvodimenzionalna analiza glavnih komponenata (2D-PCA) slobodnih fenolnih kiselina u listu i korijenu kod biljaka kineskog kupusa (KK), bijelog kupusa (BK) i raštike (R) u odnosu na intenzitet solnog stresa (0-200 mM NaCl).



Slika 37. Dvodimenzionalna analiza glavnih komponentata (2D-PCA) slobodnih fenolnih kiselina izmjenjenih metodom UHPLC-MS/MS kod **a)** lista i **b)** korijena biljaka kineskog kupusa (KK), bijelog kupusa (BK) i raštike (R) nakon izlaganja solnom stresu, 0 (K), 50, 100 i 200 mM NaCl. Crveni simboli označavaju položaj slobodnih fenolnih kiselina u tablicama kao što su protokatehinska kiselina (PA), klorogenska kiselina (ChA), 4-kumarinska kiselina (pCoA), sinapinska kiselina (SiA), ferulinska kiselina (FA) i salicilna kiselina (SA). Plavi simboli prikazuju položaj različitih varijeteta nakon svakog tretmana. Za PCA prikaz je korišteni su rezultati Tablice 6 (prilozi).

Prve dvije glavne komponente, F1 i F2 objasnile su 78,12% kumulativne varijabilnosti izmjerenih parametara u listu i 69,11% istih u korijenu.

Pozicioniranje varijeteta na **slici 37a** upućuje na činjenicu da su veće promjene u fenolnim kiselinama uslijed solnog stresa u listu zabilježene u raštici te se taj varijetet pozicionira u gornjem i donjem lijevom kvadrantu s obzirom na intenzitet solnog stresa. Varijable kontrole i solnih stresova za bijeli i kineski kupus su blisko pozicionirane ukazujući da solni stres nije uzrokovao velike promjene u sadržaju fenolnih kiselina. 2D-PCA također prikazuje odnos fenolnih kiselina s obzirom na koncentraciju soli i varijetet. Pri tom vidimo da su SiA, *p*-CoA i FA pozicionirane blizu kineskog kupusa koji sadrži značajno više koncentracije tih slobodnih fenolnih kiselina u odnosu na ostale varijetete. SA pozicionirana je u blizini raštike, posebno 200 mM NaCl tretmana. PA i ChA pozicionirane su u blizini bijelog kupusa. Pearsonovi linearni koeficijenti (**Tablica 6 u priložima**) pokazali su pozitivne korelacije FA i *p*CoA (0,975) i SiA (0,999) dok je vidljiva negativna korelacija FA s PA (-0,602).

Pozicioniranje varijeteta s obzirom na solni stres i slobodne fenolne kiseline u korijenu (**Slika 37b**), koji su poprilično razbacani kroz različite kvadrante upućuje na činjenicu da solni stres uzrokuje veće promjene u korijenu s obzirom na list kupusnjača. Pri tome je PA pozicionirana u blizini raštike i bijelog kupusa, a ostale fenolne kiseline su bliže varijablama kineskog kupusa. Pearsonovi linearni koeficijenti (**Tablica 6 u priložima**) pokazali su pozitivne korelacije parametara grupiranih u gornjem desnom kvadrantu vezanih uz biljke kineskog kupusa i bijelog kupusa izloženih solnim tretmanima: FA pozitivno korelira s *p*CoA (0,637) i ChA (0,266). Suprotno, primijećena je negativna korelacija FA s PA (-0,390) smještene u gornjem lijevom kvadrantu i vezane uz biljke raštike izložene solnom stresu.

3.2.5. Pred-tretmani kineskog kupusa (*B. rapa* spp. *pekinensis*) fenolnim kiselinama u svrhu povećanja tolerancije na solni stres

Dobiveni rezultati prethodnih i ovog istraživanja ukazuju na činjenicu da je kineski kupus najosjetljivija vrsta na solni stres u usporedbi s ostalim istraženim vrstama. Također ovdje prezentirani rezultati upućuju na činjenicu da otpornije vrste na solni stres sadrže znatno veće količine fenolnih kiselina npr. SiA, FA i SA. Stoga su biljke kineskog kupusa pred-tretirane fenolnim kiselinama (salicilnom (SA), sinapinskom (SiA) i ferulinskom kiselinom (FA)) u rasponu koncentracija (0 μ M, 10 μ M, 50 μ M i 100 μ M) te je praćen njihov odgovor u tretmanu solnog stresa od 150 mM u odnosu na netretirane kontrole u trajanju od 72 sata. Pri tome su praćeni fotosintetski parametri (*in vivo*) svakih 24 sata, a nakon 72 sata biljni materijal je sakupljen, liofiliziran i izmjereni su prolin, polifenolni spojevi, pigmenti, glukozinolati te antioksidacijske aktivnosti.

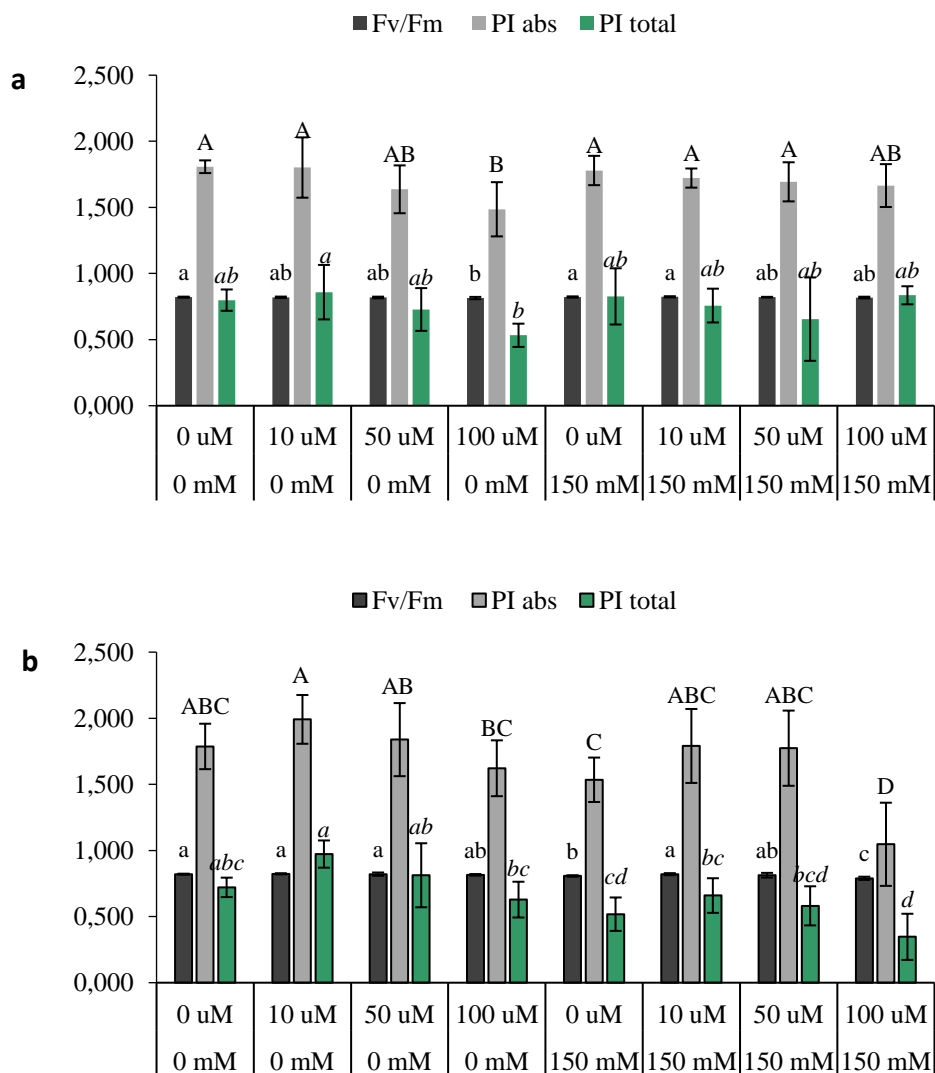
3.2.5.1. Pred-tretmani salicilnom kiselinom (SA)

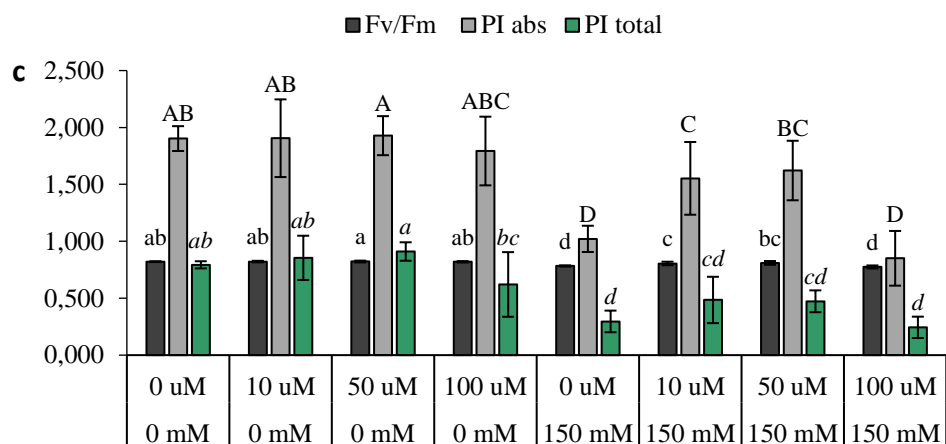
3.2.5.1.1. Fotosintetska efikasnost

Fluorescencija klorofila *a* mjerena je po izlaganju biljaka utjecaju solnog stresa (150 mM NaCl), nakon 24, 48 i 72 sata. Fotosintetski parametri: maksimalni kvantni prinos fotosinteze (F_v/F_m) te indeksi fotosintetske učinkovitosti (PI_{abs} i PI_{total}) prikazani su na **slici 38**.

U kontrolnim biljkama tretiranim s 100 μ M SA 24h od početka izlaganja solnom stresu nije došlo promjena u fotosintetskim parametrima. Nakon 48 i 72h od početka tretmana nisu primijećene značajnije razlike između biljaka koje su tretirane različitim koncentracijama SA i koje su rasle u kontrolnim uvjetima (bez NaCl). Vrijednosti F_v/F_m , PI_{abs} i PI_{total} se statistički značajno smanjuju u listovima nakon 48 i nadalje 72 sata trajanja stresa u odnosu na netretirane kontrole.

Važna je činjenica da su pred-tretmani sa SA od 10 μ M i 50 μ M pokazali pozitivan učinak na fotosintetsku učinkovitost u uvjetima solnog stresa, te su vrijednosti F_v/F_m , PI_{abs} i PI_{total} statistički veće u odnosu na one izmjerene u solnom stresu bez pred-tretmana SA.





Slika 38. Fotosintetski parametri F_v/F_m , PI_{abs} i PI_{total} mjereni u listovima kineskog kupusa tretiranog različitim koncentracijama salicilne kiseline **a)** 24h izlaganja solnom stresu; **b)** 48h nakon izlaganja solnom stresu i **c)** 72h nakon izlaganja solnom stresu.

3.2.5.1.2. Sadržaj i omjeri fotosintetskih pigmenata

U listovima biljaka kineskog kupusa podvrgnutim solnom stresu i tretiranih različitim koncentracijama SA izmjeren je sadržaj pigmenata (klorofil *a*, klorofil *b*, ukupni klorofili, karotenoidi) te određeni omjeriklorofil *a*/klorofil *b* te ukupni klorofili/karotenoidi prikazani u **tablici 11**.

Tretmani sa 10 μM i/ili 50 μM salicilnom kiselinom imaju pozitivan učinak na sadržaj klorofila i karotenoida u odnosu na kontrolu dok 100 μM SA ima inhibitorno djelovanje. Solni stres uzrokuje značajan pad sadržaja klorofila *a* (1,3 puta) i karotenoida (9,1 puta) te posljedično značajno mijenja omjere klorofil *a*/klorofil *b* i klorofili/karotenoidi. Tretmani sa 10 i/ili 50 μM SA u solnom stresu imaju pozitivan učinak na sintezu fotosintetskih pigmenata. Tako tretman s 50 μM SA povećava sadržaj klorofila *a* 1,7 puta, a karotenoida 8,8 puta u odnosu na solni stres bez SA tretmana.

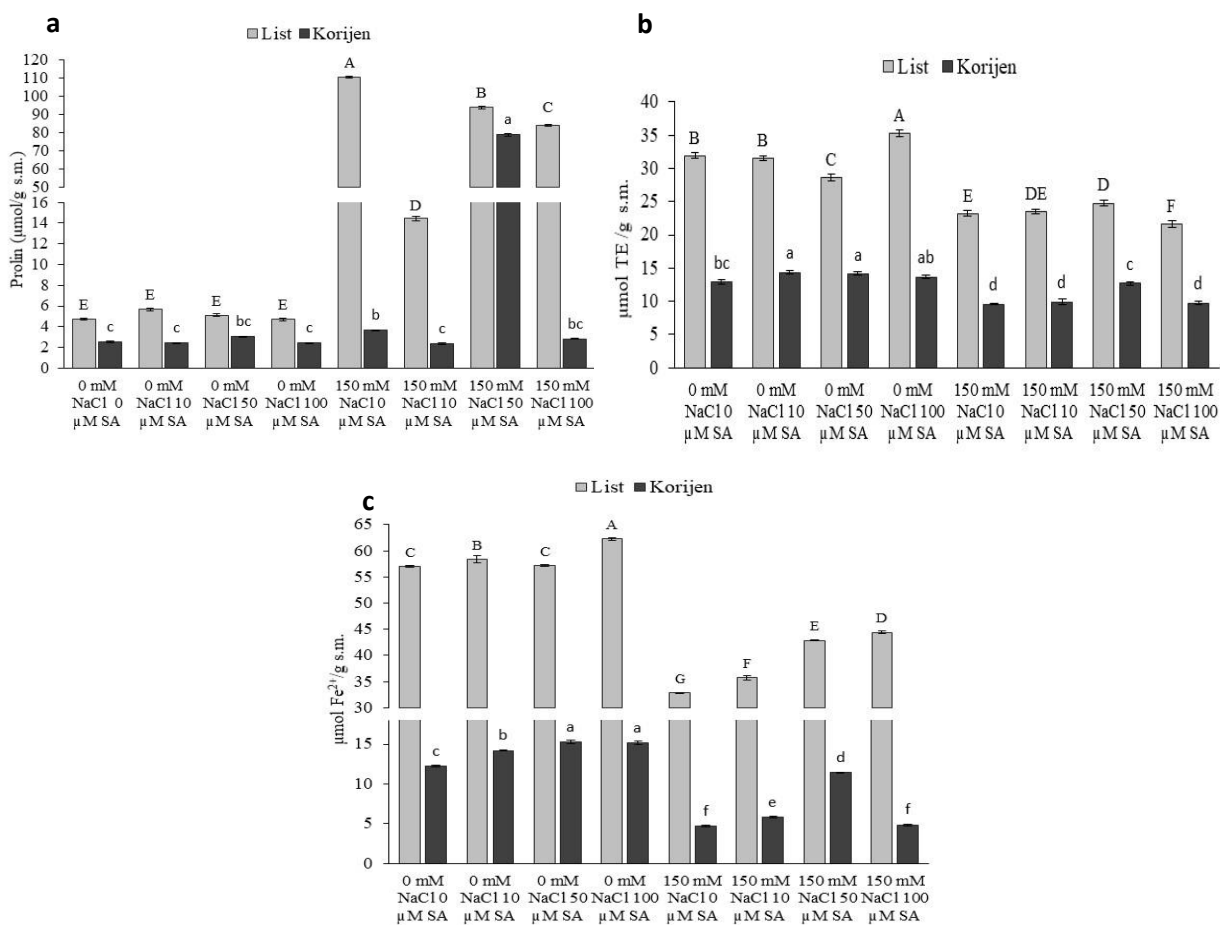
Tablica 11. Sadržaj i omjeri pigmenata kod biljaka kineskog kupusa izloženih solnom stresu (150 mM NaCl) i različitim koncentracijama salicilne kiseline (0 μ M, 10 μ M, 50 μ M i 100 μ M). Rezultati su srednja vrijednost \pm SD (n=3), svijetlo siva boja predstavlja najmanje vrijednosti dok tamno zelena najviše vrijednosti. Različita slova predstavljaju statistički značajne razlike (za svaku kolonu) u odnosu na tretmane (p < 0,05).

Tretman	Klorofil a	Klorofil b	Ukupni klorofili	Karotenoidi	Klorofil a/klorofil b	Klorofili / karotenoidi
	μ g/mg s.m.	μ g/mg s.m.)	μ g/mg s.m.	μ g/mg s.m.		
0 mM NaCl 0 μ M SA	4,85 \pm 0,18 d	2,53 \pm 0,07 e	7,39 \pm 0,24 d	1,55 \pm 0,06 bc	1,92 \pm 0,02 c	4,78 \pm 0,06 cd
0 mM NaCl 10 μ M SA	6,14 \pm 0,06 ab	2,75 \pm 0,06 d	8,89 \pm 0,11 c	1,69 \pm 0,02 a	2,23 \pm 0,03 b	5,26 \pm 0,02 cd
0 mM NaCl 50 μ M SA	6,34 \pm 0,12 a	4,40 \pm 0,09 b	10,74 \pm 0,20 a	1,19 \pm 0,03 d	1,44 \pm 0,02 e	9,05 \pm 0,10 c
0 mM NaCl 100 μ M SA	5,27 \pm 0,18 c	1,30 \pm 0,06 f	6,57 \pm 0,24 e	1,61 \pm 0,04 ab	4,05 \pm 0,06 a	4,08 \pm 0,04 d
150 mM NaCl 0 μ M SA	3,75 \pm 0,05 e	4,86 \pm 0,11 a	8,60 \pm 0,16 c	0,17 \pm 0,01 g	0,77 \pm 0,008 g	50,85 \pm 4,96 a
150 mM NaCl 10 μ M SA	5,85 \pm 0,14 b	4,93 \pm 0,09 a	10,78 \pm 0,24 a	0,64 \pm 0,02 f	1,19 \pm 0,007 f	16,86 \pm 0,11 b
150 mM NaCl 50 μ M SA	6,47 \pm 0,09 a	3,41 \pm 0,05 c	9,88 \pm 0,12 b	1,50 \pm 0,02 c	1,90 \pm 0,02 c	6,58 \pm 0,07 cd
150 mM NaCl 100 μ M SA	3,97 \pm 0,11 e	2,52 \pm 0,05 e	6,49 \pm 0,16 e	0,88 \pm 0,03 e	1,58 \pm 0,01 d	7,40 \pm 0,06 cd

3.2.5.1.3. Sadržaj prolina i antioksidacijski odgovor

Sadržaj prolina i antioksidacijska aktivnost kineskog kupusa izloženog solnom stresu i pred-tretmanima sa SA prikazani su na **slici 39**.

U biljaka tretiranih SA bez aplikacije solnog stresa sadržaj prolina ostaje nepromjenjiv, kako u listu tako i u korijenu što bi upućivalo da aplicirane koncentracije SA ne izazivaju stres kod biljaka. Izlaganje solnom stresu koncentracije 150 mM NaCl uzrokuje značajan porast sadržaja prolina, posebno u listovima (110,43 μ mol/g s.m.). Zanimljivo je da kombinirani tretmani (sol i SA) uzrokuju smanjenje u sadržaju prolina u listovima te je najznačajniji pad koncentracije prolina pri pred-tretmanu s 10 μ M SA, 7,65 puta manja u odnosu na solni stres bez SA pred-tretmana. U korijenu kineskog kupusa najveći porast sadržaja prolina uzrokuje tretman 150 mM NaCl uz pre-tretman 50 μ M SA te je oko 20 puta veća u odnosu na sve ostale tretmane.



Slika 39. Sadržaj prolina (**a**) i antioksidacijska aktivnost izmjerena DPPH metodom (**b**) i FRAP metodom (**c**) kod biljaka kineskog kupusa izloženog solnom stresu koncentracije 150 mM NaCl i tretiranog različitim koncentracijama salicilne kiseline (0 μM , 10 μM , 50 μM i 100 μM). Rezultati su srednja vrijednost \pm SD ($n=3$). Različita velika slova predstavljaju statistički značajne razlike u odnosu na tretmane kod listova dok različita mala slova statistički značajne razlike u odnosu na tretmane kod korijena ($p < 0,05$).

Antioksidacijska aktivnost, mjerena DPPH i FRAP metodom, izraženija je u listovima nego u korijenu. Solni stres (150 mM NaCl) uzrokuje pad antioksidacijske aktivnosti. Prilikom solnog tretmana, pred-tretman sa SA (50 μM) pokazuje pozitivan učinak u listovima i korijenu. Antioksidacijska aktivnost mjerena DPPH metodom je 1,07 puta veća u listovima te 1,32 puta u korijenu u odnosu na solni tretman bez SA pred-tretmana. Antioksidacijska aktivnost mjerena FRAP metodom u listovima je 1,31 puta veća a u korijenu 2,43 puta veća u odnosu na solni tretman bez SA.

3.2.5.1.4. Sadržaj specijaliziranih metabolita

Sadržaj specijaliziranih metabolita (ukupni fenoli, fenolne kiseline, flavonoidi, ukupni flavanoli i glukozinolati) u kineskom kupusu izloženom solnom stresu (150 mM NaCl) i pred-tretiranom različitim koncentracijama SA (0 μ M, 10 μ M, 50 μ M i 100 μ M) mjereni su spektrofotometrijski (Tablica 12).

U listovima kineskog kupusa sadržaj specijaliziranih metabolita viši je kod biljaka tretiranih pojedinim konc. SA bez aplikacije solnog stresa u odnosu na pozitivne kontrole (netretirane biljke). Solni tretmani (150 mM NaCl) uzrokuju značajan pad koncentracije specijaliziranih metabolita osim glukozinolata koji su povišeni uslijed solnog stresa. U kombinaciji s tretmanima sa SA njihov sadržaj se mijenja. Najučinkovitiji tretman u slučaju ukupnih fenola i ukupnih flavanola je s 50 μ M SA gdje dolazi do njihovog porasta u odnosu na biljke tretirane sa soli (1,11 puta i 1,48 puta). Ukupne fenolne kiseline najviše se povećavaju pri s 100 μ M SA gdje je njihova koncentracija 1,14 puta veća u odnosu na biljke tretirane sa soli, dok kod ukupnih flavonoida najznačajnije promijene su prisutne pri tretmanu s 10 μ M SA (1,25 puta). Sadržaj glukozinolata veći je kod biljaka izloženih solnom stresu u odnosu na pozitivne kontrole. Tretmanom sa 100 μ M SA koncentracija glukozinolata se dodatno povećava u solnom stresu; 1,11 puta je veća nego kod biljaka izloženih samo solnom stresu.

U korijenu sadržaj ukupnih fenola, ukupnih fenolnih kiselina i flavonoida viši je kod biljaka tretiranih salicilnom kiselinom u odnosu na pozitivne kontrole. Solni stres uzrokuje značajno smanjenje koncentracije navedenih specijaliziranih metabolita osim glukozinolata. Tretman s 50 μ M SA ima pozitivan učinak na većinu specijaliziranih metabolita u solnom stresu u korijenu.

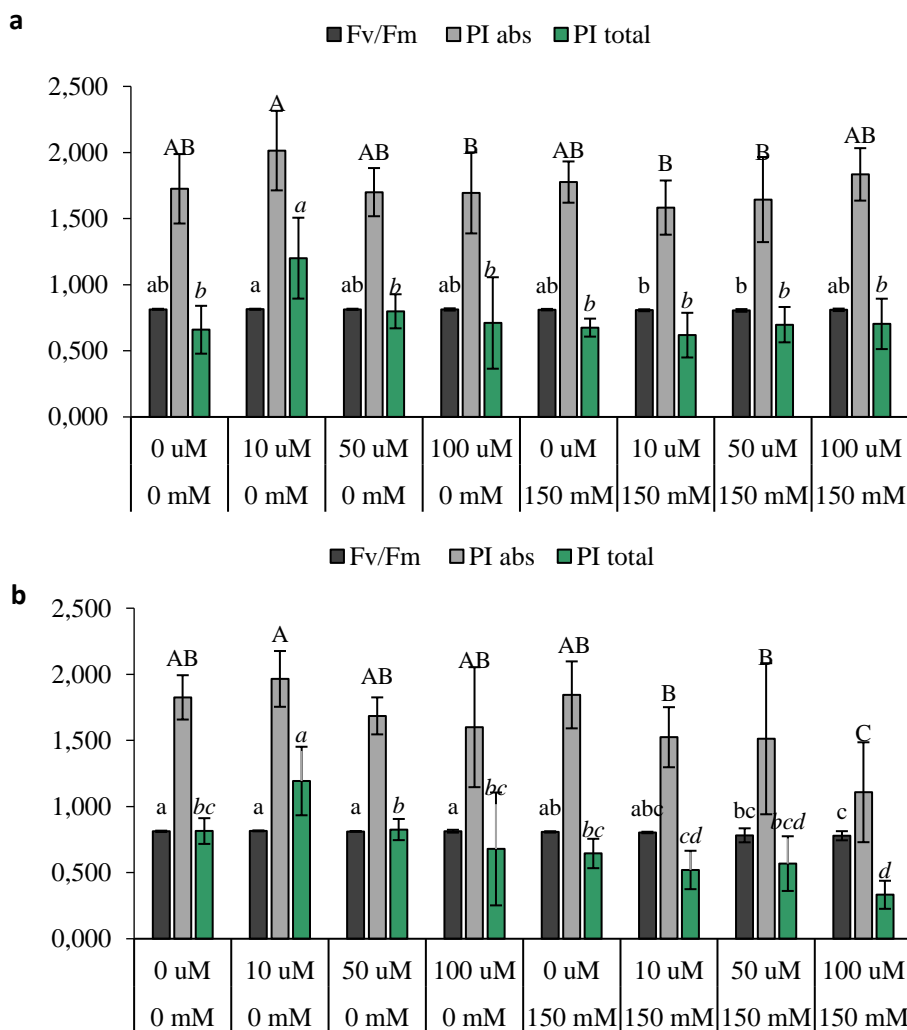
Tablica 12. Sadržaj specijaliziranih metabolita kod biljaka kineskog kupusa podvrgnutih solnom stresu (150 mM NaCl) i različitim koncentracijama SA (0 μ M, 10 μ M, 50 μ M i 100 μ M). Rezultati su srednja vrijednost \pm SD (n=3), svijetlo siva boja predstavlja najmanje vrijednosti dok tamno zelena najviše vrijednosti. Različita slova predstavljaju statistički značajne razlike za svaki pojedini specijalizirani metabolit, u listu i korijenu, u odnosu na tretmane ($p < 0,05$).

List					
Tretman	Ukupni fenoli	Fenolne kiseline	Flavonoidi	Flavanoli	Glukozinolati
	mg GAE/g s.m.	mg CAE/g s.m.	mg CE/g s.m.	μg CE/g s.m.	mg sinigrin/g s.m.
0 mM NaCl 0 μ M SA	27,48 \pm 0,17 b	4,89 \pm 0,02 d	7,88 \pm 0,04 c	58,47 \pm 0,58 b	53,91 \pm 0,84 g
0 mM NaCl 10 μ M SA	29,79 \pm 0,21 a	5,81 \pm 0,06 c	8,84 \pm 0,09 b	69,07 \pm 0,86 a	57,75 \pm 1,01 f
0 mM NaCl 50 μ M SA	25,78 \pm 0,25 c	6,16 \pm 0,06 b	8,94 \pm 0,12 b	58,88 \pm 1,11 b	63,07 \pm 0,52 e
0 mM NaCl 100 μ M SA	30,10 \pm 0,24 a	6,47 \pm 0,05 a	9,59 \pm 0,04 a	43,30 \pm 1,14 d	76,02 \pm 0,70 d
150 mM NaCl 0 μ M SA	22,43 \pm 0,15 e	3,99 \pm 0,07 g	5,74 \pm 0,06 g	31,69 \pm 0,59 f	141,21 \pm 2,05 b
150 mM NaCl 10 μ M SA	21,64 \pm 0,22 f	4,23 \pm 0,03 f	7,16 \pm 0,07 d	34,91 \pm 0,77 e	77,90 \pm 0,63 d
150 mM NaCl 50 μ M SA	24,79 \pm 0,26 d	3,80 \pm 0,01 h	6,10 \pm 0,03 f	46,93 \pm 0,30 c	98,11 \pm 0,92 c
150 mM NaCl 100 μ M SA	22,70 \pm 0,35 e	4,54 \pm 0,05 e	6,66 \pm 0,13 e	42,16 \pm 0,66 d	156,28 \pm 2,49 a
Korijen					
0 mM NaCl 0 μ M SA	10,60 \pm 0,06 e	1,00 \pm 0,03 a	1,24 \pm 0,02 b	21,74 \pm 0,55 d	14,53 \pm 0,29 e
0 mM NaCl 10 μ M SA	12,42 \pm 0,02 c	0,98 \pm 0,03 a	1,47 \pm 0,03 a	19,83 \pm 0,68 d	17,26 \pm 0,46 d
0 mM NaCl 50 μ M SA	11,37 \pm 0,17 d	0,94 \pm 0,04 ab	1,14 \pm 0,01 c	15,33 \pm 0,76 e	18,01 \pm 0,38 d
0 mM NaCl 100 μ M SA	14,01 \pm 0,17 a	0,96 \pm 0,04 a	1,21 \pm 0,03 b	14,18 \pm 0,96 e	19,24 \pm 0,21 c
150 mM NaCl 0 μ M SA	5,10 \pm 0,05 g	0,47 \pm 0,04 d	0,68 \pm 0,02 f	24,48 \pm 0,72 c	22,73 \pm 0,34 a
150 mM NaCl 10 μ M SA	5,40 \pm 0,09 fg	0,59 \pm 0,03 c	0,96 \pm 0,01 d	29,46 \pm 0,65 b	21,38 \pm 0,26 b
150 mM NaCl 50 μ M SA	13,12 \pm 0,15 b	0,86 \pm 0,03 b	1,11 \pm 0,03 c	36,24 \pm 0,96 a	22,67 \pm 0,24 a
150 mM NaCl 100 μ M SA	5,46 \pm 0,06 f	0,41 \pm 0,03 d	0,76 \pm 0,02 e	31,51 \pm 1,00 b	23,43 \pm 0,11 a

3.2.5.2. Pred-tretmani sinapinskom kiselinom (SiA)

3.2.5.2.1. Fotosintetska efikasnost

Rezultati mjerenja fotosintetske učinkovitosti prikazani su na slici 40. U biljkama tretiranim s različitim koncentracijama SiA bez aplikacije soli nema značajnije promijene fotosintetskih parametara u odnosu na kontrolu ni nakon 48 h ni 72 h. U stresiranim biljkama, SiA nije pokazala pozitivni učinak na parametre fotosintetske učinkovitosti.



Slika 40. Fotosintetski parametri F_v/F_m , PI_{abs} i PI_{total} mjereni u listovima kineskog kupusa tretiranog različitim koncentracijama sinapinske kiseline SiA i 150 mM NaCl **a)** 48h nakon izlaganja solnom stresu i **b)** 72h nakon izlaganja solnom stresu.

3.2.5.2.2. Sadržaj i omjeri pigmenata

Kod biljaka kineskog kupusa podvrgnutih solnom stresu i tretiranih različitim koncentracijama sinapinske kiseline mjeren je sadržaj pigmenata (klorofil *a*, klorofil *b*, ukupni klorofili, karotenoidi, klorofil *a*/klorofil *b* te ukupni klorofili/karotenoidi) a rezultati su prikazani u **tablici 13**. Sadržaj pigmenata u skladu je s fotosintetskom učinkovitošću biljaka tj. tretmani SiA nemaju pozitivan učinak na sadržaj klorofila i karotenoida. Dapače ti tretmani uzrokuju pad sadržaja fotosintetskih pigmenata i kod biljaka na koje nije apliciran solni stres ali i uz aplikaciju solnog stresa.

Tablica 13. Sadržaj i omjeri pigmenata kod biljaka kineskog kupusa izloženih solnom stresu (150 mM NaCl) i različitim koncentracijama sinapinske kiseline (SiA) (0 μ M, 10 μ M, 50 μ M i 100 μ M). Rezultati su srednja vrijednost \pm SD (n=3), svijetlo siva boja predstavlja najmanje vrijednosti dok tamno zelena najviše vrijednosti. Različita slova predstavljaju statistički značajne razlike (za svaku kolonu) u odnosu na tretmane ($p < 0,05$).

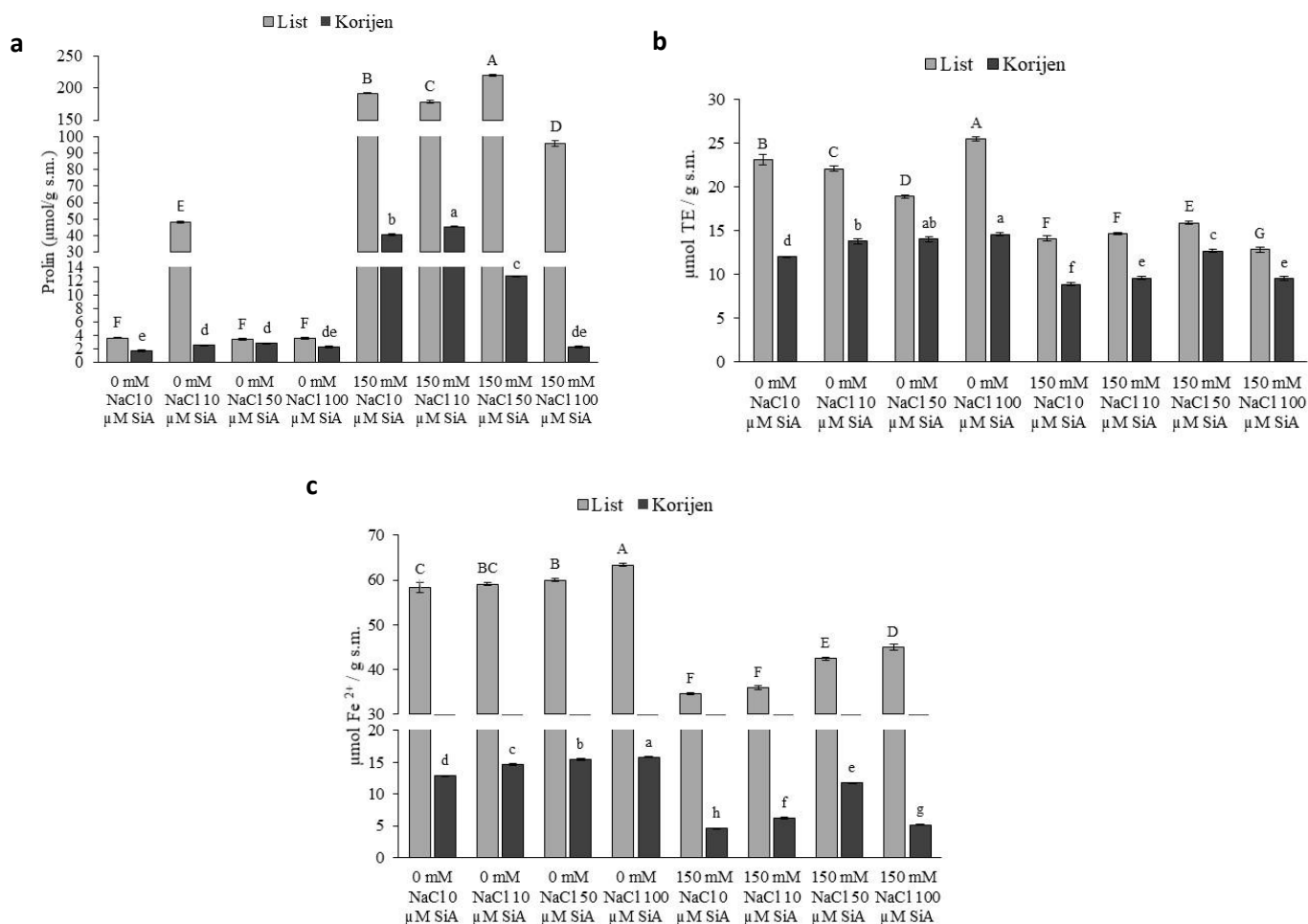
Tretman	Klorofil <i>a</i>	Klorofil <i>b</i>	Ukupni klorofili	Karotenoidi	Klorofil <i>a</i> /klorofil <i>b</i>	klorofili/ karotenoidi
	μ g/mg s.m.	μ g/mg s.m.)	μ g/mg s.m.	μ g/mg s.m.		
0 mM NaCl 0 μ M SiA	10,80 \pm 0,1 a	5,25 \pm 0,05 a	16,06 \pm 0,16 a	2,38 \pm 0,02 a	2,05 \pm 0,002 e	6,74 \pm 0,01 a
0 mM NaCl 10 μ M SiA	9,50 \pm 0,08 b	3,84 \pm 0,02 b	13,35 \pm 0,11 b	2,06 \pm 0,02 b	2,47 \pm 0,01 d	6,47 \pm 0,03 b
0 mM NaCl 50 μ M SiA	9,58 \pm 0,18 b	3,85 \pm 0,06 b	13,43 \pm 0,24 b	2,11 \pm 0,05 b	2,48 \pm 0,02 d	6,36 \pm 0,07 bc
0 mM NaCl 100 μ M SiA	8,54 \pm 0,13 c	3,26 \pm 0,05 c	11,80 \pm 0,18 c	1,87 \pm 0,03 cd	2,62 \pm 0,006 c	6,30 \pm 0,01 cd
150 mM NaCl 0 μ M SiA	8,49 \pm 0,22 c	3,33 \pm 0,07 c	11,83 \pm 0,29 c	1,92 \pm 0,06 c	2,55 \pm 0,01 cd	6,15 \pm 0,05 de
150 mM NaCl 10 μ M SiA	7,61 \pm 0,22 de	2,78 \pm 0,04 d	10,39 \pm 0,05 d	1,71 \pm 0,02 e	2,73 \pm 0,04 b	6,05 \pm 0,10 e
150 mM NaCl 50 μ M SiA	7,34 \pm 0,10 e	2,69 \pm 0,01 de	10,03 \pm 0,12 d	1,78 \pm 0,03 de	2,72 \pm 0,02 b	5,60 \pm 0,03 g
150 mM NaCl 100 μ M SiA	7,80 \pm 0,15 d	2,58 \pm 0,09 e	10,39 \pm 0,25 d	1,78 \pm 0,03 de	3,02 \pm 0,05 a	5,80 \pm 0,05 f

3.2.5.2.3. Sadržaj prolina i antioksidacijski odgovor

Sadržaj prolina i antioksidacijska aktivnost kineskog kupusa izloženog solnom stresu i tretmanima sa sinapinskom kiselinom prikazani su na **slici 41**.

Kod biljaka tretiranih SiA bez aplikacije solnog stresa sadržaj prolina u listovima i korijenu ostaje nepromjenjiv, osim u slučaju 10 μ M SiA gdje je koncentracija prolina drastično porasla (13,27 puta) u odnosu na kontrolu. Izlaganje solnom stresu koncentracije 150 mM NaCl uzrokuje značajan porast sadržaja prolina u odnosu na biljke uzgajane u kontrolnim uvjetima. Predtretman SiA 50 μ M u solnom stresu dodatno povećava sadržaj prolina (218,99 μ mol/g

s.m.). Najznačajniji pad sadržaja prolina u listovima primjećen je pri pred-tretmanu 100 μM Si u solnom stresu, koja je 1,99 puta manja u odnosu na solni stres bez SiA pred-tretmana.



Slika 41. Sadržaj prolina (**a**) i antioksidacijska aktivnost izmjerena DPPH metodom (**b**) i FRAP metodom (**c**) kod biljaka kineskog kupusa izloženog solnom stresu koncentracije 150 mM NaCl i tretiranog različitim koncentracijama sinapsinske kiseline SiA (0 μM , 10 μM , 50 μM i 100 μM). Rezultati su srednja vrijednost \pm SD (n=3). Različita velika slova predstavljaju statistički značajne razlike u odnosu na tretmane kod listova dok različita mala slova statistički značajne razlike u odnosu na tretmane kod korijena ($p < 0,05$).

U korijenu najveći porast sadržaja prolina uzrokuje solni tretman uz 10 μM SiA a najznačajniji pad u odnosu na kontrolu (150 mM NaCl, 0 μM SiA) je pri tretmanu 150 mM NaCl, 100 μM SiA (17,79 puta). Antioksidacijska aktivnost mjerena DPPH i FRAP metodom veća je u listovima nego u korijenu. Solni stres (150 mM NaCl) uzrokuje pad antioksidacijske aktivnosti kako u listu tako i u korijenu. Pred-tretman 50 μM SiA u solnom stresu pokazuje pozitivan učinak na antioksidacijsku aktivnost u listovima i korijenu kod mjerenja i DPPH i FRASP metodom. Mjerenjem putem DPPH metode antioksidacijska aktivnost je 1,13 puta veća u listovima te 1,43 puta u korijenu u odnosu na kontrolu tretiranu samo sa soli. Mjerenjem FRAP metodom

antioksidacijska aktivnost u listovima je 1,23 puta veća a u korijenu 2,53 puta veća u odnosu na tretman samo sa soli.

3.2.5.2.4. Sadržaj specijaliziranih metabolita

Sadržaj specijaliziranih metabolita koji uključuju ukupne fenole, fenolne kiseline, flavonoide, ukupne flavanole i glukozinolate) kod kineskog kupusa izloženog solnom stresu (150 mM NaCl) i tretiranog različitim koncentracijama sinapinske kiseline (0 μ M, 10 μ M, 50 μ M i 100 μ M SiA) mjereni su spektrofotometrijski (**Tablica 14**).

U listovima kineskog kupusa sadržaj specijaliziranih metabolita, viši je kod biljaka tretiranih određenim konc. SiA u odnosu na pozitivne kontrole (netretirane biljke). Solni stres (150 mM NaCl) uzrokuje značajan pad koncentracije specijaliziranih metabolita osim glukozinolata koji se značajno povećavaju kao odgovor na stres. U kombiniranim tretmanima određene konc. SiA imaju pozitivan učinak na sadržaj specijaliziranih metabolita osim glukozinolata u odnosu na solni tretman bez aplikacije SiA.

U korijenu sadržaj ukupnih fenola, ukupnih fenolnih kiselina, flavonoida i glukozinolata viši je kod biljaka uzgojenih u kontrolnim uvjetima (bez NaCl) uz aplikaciju SiA u odnosu na pozitivne kontrole. Pozitivan učinak SiA nije primjećen u slučaju flavanola. Solni stres uzrokuje smanjenje koncentracije ukupnih fenola, fenolnih kiselina i flavonoida dok su flavanoli i glukozinolati povišeni u odgovoru na solni stres u odnosu na pozitivne kontrole. Tretmani sa SiA u solnom stresu poništavaju negativan učinak soli. Tako npr. 50 μ M SiA statistički značajno povećava sadržaj ukupnih fenola (3,63 puta veća u odnosu biljke tretirane samo sa soli), i flavanola (1,26 puta u odnosu na biljke tretirane samo sa soli). U slučaju glukozinolata 100 μ M SiA uzrokuje značajan porast sadržaja koji je 1,16 puta veći nego kod biljka tretiranih samo sa soli.

Ovi rezultati su u skladu s antioksidacijskim aktivnostima mjenjenim u uzorcima lista i korijena, što je logično ako znamo da fenolni spojevi posjeduju značajnu antioksidacijsku aktivnost.

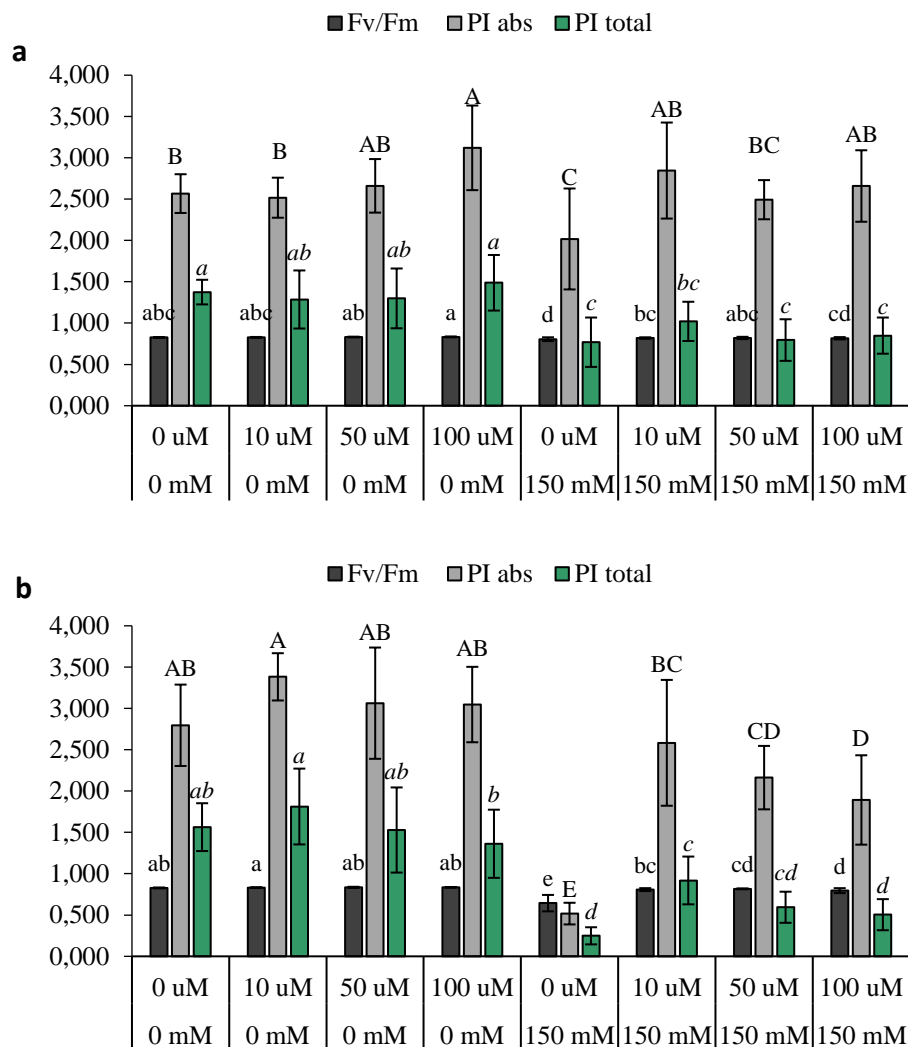
Tablica 14. Sadržaj specijaliziranih metabolita kod biljaka kineskog kupusa podvrgnutih solnom stresu (150 mM NaCl) i različitim koncentracijama sinapinske kiseline SiA (0 μ M, 10 μ M, 50 μ M i 100 μ M). Rezultati su srednja vrijednost \pm SD (n=3), svijetlo siva boja predstavlja najmanje vrijednosti dok tamno zelena najviše vrijednosti. Različita slova predstavljaju statistički značajne razlike za svaki pojedini specijalizirani metabolit, posebno u listu i korijenu, u odnosu na tretmane ($p < 0,05$).

List					
Tretman	Ukupni fenoli	Fenolne kiseline	Flavonoidi	Flavanoli	Glukozinolati
	mg GAE/g s.m.	mg CAE/g s.m.	mg CE/g s.m.	μ g CE/g s.m.	mg sinigrin/g s.m.
0 mM NaCl 0 μ M SiA	28,09 \pm 0,41 b	5,18 \pm 0,09 d	8,09 \pm 0,09 d	63,46 \pm 1,43 b	58,76 \pm 0,30 g
0 mM NaCl 10 μ M SiA	28,95 \pm 0,17 a	6,00 \pm 0,05 c	8,71 \pm 0,07 c	64,70 \pm 0,85 b	61,11 \pm 0,70 g
0 mM NaCl 50 μ M SiA	28,56 \pm 0,10 ab	6,43 \pm 0,01 b	8,93 \pm 0,04 b	71,67 \pm 0,88 a	64,75 \pm 0,71 f
0 mM NaCl 100 μ M SiA	27,14 \pm 0,12 c	6,64 \pm 0,01 a	9,31 \pm 0,01 a	41,44 \pm 0,65 d	76,45 \pm 1,44 e
150 mM NaCl 0 μ M SiA	22,68 \pm 0,13 f	4,87 \pm 0,009 e	5,53 \pm 0,007 g	29,85 \pm 0,52 f	171,47 \pm 0,90 a
150 mM NaCl 10 μ M SiA	22,87 \pm 0,15 ef	5,08 \pm 0,04 d	5,64 \pm 0,04 g	37,04 \pm 0,76 e	79,78 \pm 0,79 d
150 mM NaCl 50 μ M SiA	24,99 \pm 0,24 d	5,16 \pm 0,06 d	6,90 \pm 0,05 e	44,06 \pm 0,34 c	98,76 \pm 1,69 c
150 mM NaCl 100 μ M SiA	23,45 \pm 0,24 e	4,79 \pm 0,05 e	6,42 \pm 0,04 f	39,05 \pm 0,90 de	158,32 \pm 1,66 b
Korijen					
0 mM NaCl 0 μ M SiA	9,68 \pm 0,03 b	1,08 \pm 0,01 c	1,28 \pm 0,02 b	24,71 \pm 0,28 d	15,01 \pm 0,28 f
0 mM NaCl 10 μ M SiA	11,18 \pm 0,14 ab	1,14 \pm 0,02 b	1,55 \pm 0,04 a	22,21 \pm 0,61 e	16,10 \pm 0,09 e
0 mM NaCl 50 μ M SiA	10,89 \pm 0,07 ab	1,17 \pm 0,01 b	1,46 \pm 0,02 a	20,25 \pm 0,30 f	18,08 \pm 0,36 d
0 mM NaCl 100 μ M SiA	9,90 \pm 0,08 ab	1,25 \pm 0,02 a	1,34 \pm 0,02 b	18,82 \pm 0,62 g	20,61 \pm 0,27 c
150 mM NaCl 0 μ M SiA	3,52 \pm 0,06 c	0,54 \pm 0,01 f	0,60 \pm 0,01 e	26,80 \pm 0,51 c	22,80 \pm 0,28 b
150 mM NaCl 10 μ M SiA	5,53 \pm 3,04 c	0,67 \pm 0,02 e	0,81 \pm 0,02 d	30,34 \pm 0,47 b	21,08 \pm 0,19 c
150 mM NaCl 50 μ M SiA	12,77 \pm 0,13 a	0,90 \pm 0,01 d	1,30 \pm 0,02 b	33,65 \pm 0,63 a	23,59 \pm 0,51 b
150 mM NaCl 100 μ M SiA	5,76 \pm 0,10 c	0,45 \pm 0,01 g	1,03 \pm 0,04 c	29,75 \pm 0,32 b	24,66 \pm 0,30 a

3.2.5.3. Predtretmani ferulinskom kiselinom (FA)

3.2.5.3.1. Fotosintetska efikasnost

Rezultati parametara fotosintetske učinkovitosti F_v/F_m , PI_{abs} i PI_{total} prikazani su na **slici 42**. Značajni porast PI_{abs} parametra kod biljaka uzgajanima u kontrolnim uvjetima bez aplikacije soli primijećen je nakon 48h tretmanom sa 100 μM FA u odnosu na kontrolu (0 mM NaCl, 0 μM FA). Izlaganje solnom stresu smanjuje fotosintetsku učinkovitost nakon 48 h a posebno nakon 72 h. Pred-tretmani s FA rezultirali su pozitivnim učinkom na fotosintezu (sve tri koncentracije). Posebno pozitivan učinak FA zabilježen je nakon 72 h solnog tretmana uz 10 μM FA.



Slika 42. Fotosintetski parametri F_v/F_m , PI_{abs} i PI_{total} mjereni u listovima kineskog kupusa tretiranog različitim koncentracijama ferulinske kiseline (FA) i soli (150 mM NaCl) **a)** 48h nakon izlaganja solnom stresu i **b)** 72h nakon izlaganja solnom stresu.

3.2.5.3.2. Sadržaj i omjeri pigmenata

Rezultati mjerenja pigmenata (klorofil *a*, klorofil *b*, ukupni klorofili, karotenoidi, klorofil *a*/klorofil *b* te ukupni klorofili/karotenoidi) prikazani u **tablici 15**. Koncentracija klorofila *a*, klorofila *b*, ukupnih klorofila te karotenoida viša je kod biljaka tretiranih sa različitim koncentracijama FA u odnosu na pozitivne kontrole (ne tretirane biljke). Solni stres značajno smanjuje koncentraciju fotosintetskih pigmenata, a pred-tretmani s FA ublažavaju efekt solnog stresa. Kod kombiniranih tretmana najbolji učinak ima tretman sa 10 μ M FA gdje u odnosu na kontrolu tretiranu samo sa soli dolazi do statistički značajnog porasta koncentracije pigmenata.

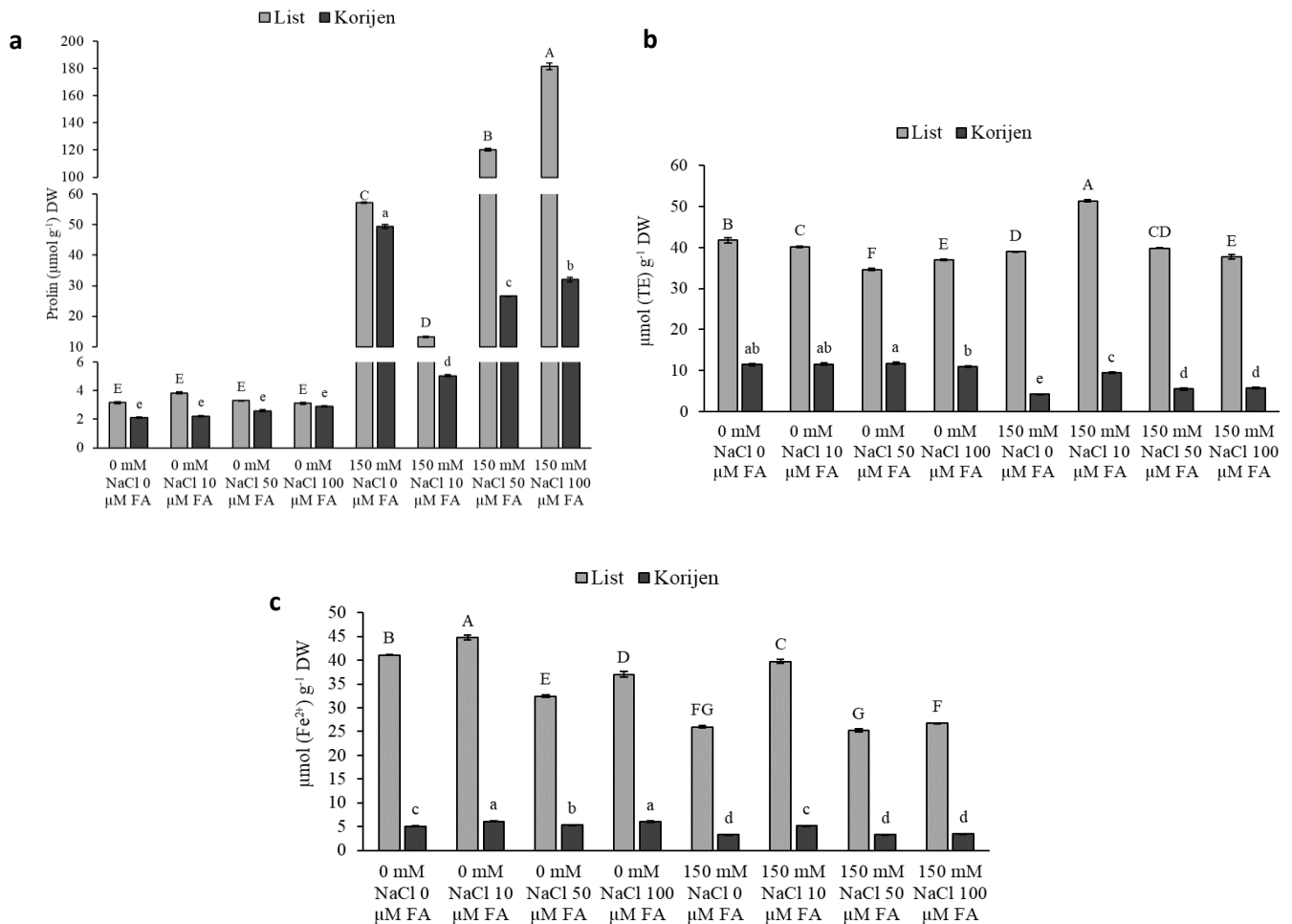
Tablica 15. Sadržaj i omjeri pigmenata kod biljaka kineskog kupusa izloženih solnom stresu (150 mM NaCl) i različitim koncentracijama ferulinske kiseline (FA) (0 μ M, 10 μ M, 50 μ M i 100 μ M). Rezultati su srednja vrijednost \pm SD (n=3), svijetlo siva boja predstavlja najmanje vrijednosti dok tamno zelena najviše vrijednosti. Različita slova predstavljaju statistički značajne razlike (za svaku kolonu) u odnosu na tretmane (p < 0,05).

Tretman	Klorofil <i>a</i>	Klorofil <i>b</i>	Ukupni klorofili	Karotenoidi	Klorofil <i>a</i> /klorofil <i>b</i>	klorofili/karotenoidi
	μ g/mg s.m.	μ g/mg s.m.)	μ g/mg s.m.	μ g/mg s.m.		
0 mM NaCl 0 μ M FA	6,51 \pm 0,20 bc	2,68 \pm 0,08 b	9,20 \pm 0,29 bc	1,40 \pm 0,03 b	2,43 \pm 0,004 d	6,53 \pm 0,04 bcd
0 mM NaCl 10 μ M FA	7,15 \pm 0,20 a	2,70 \pm 0,11 b	9,85 \pm 0,31 a	1,46 \pm 0,03 ab	2,64 \pm 0,04 a	6,71 \pm 0,07 ab
0 mM NaCl 50 μ M FA	6,17 \pm 0,08 c	2,55 \pm 0,04 bc	8,73 \pm 0,12 c	1,31 \pm 0,01 c	2,41 \pm 0,003 d	6,65 \pm 0,05 abc
0 mM NaCl 100 μ M FA	6,79 \pm 0,09 ab	2,95 \pm 0,009 a	9,75 \pm 0,10 ab	1,50 \pm 0,02 a	2,30 \pm 0,02 e	6,46 \pm 0,06 cd
150 mM NaCl 0 μ M FA	4,66 \pm 0,01 e	1,86 \pm 0,02 e	6,53 \pm 0,04 e	1,02 \pm 0,007 e	2,50 \pm 0,03 bcd	6,39 \pm 0,05 d
150 mM NaCl 10 μ M FA	6,26 \pm 0,17 c	2,45 \pm 0,03 c	8,72 \pm 0,20 c	1,46 \pm 0,05 ab	2,55 \pm 0,03 b	5,97 \pm 0,08 e
150 mM NaCl 50 μ M FA	5,39 \pm 0,09 d	2,19 \pm 0,05 d	7,59 \pm 0,14 d	1,12 \pm 0,02 d	2,45 \pm 0,02 cd	6,75 \pm 0,08 a
150 mM NaCl 100 μ M FA	5,02 \pm 0,19 de	1,99 \pm 0,12 e	7,02 \pm 0,31 de	1,09 \pm 0,03 de	2,52 \pm 0,05 bc	6,40 \pm 0,09 d

3.2.5.3.3. Sadržaj prolina i antioksidacijski odgovor

Sadržaj prolina i antioksidacijska aktivnost kineskog kupusa izloženog solnom stresu i tretmanima sa FA prikazani su na **slici 43**. Kod biljaka kineskog kupusa tretiranih FA bez aplikacije solnog stresa sadržaj prolina u listovima i korijenu ostaje nepromjenjiv. Aplikacija solnog stresa (150 mM NaCl) uzrokuje značajan porast sadržaja prolina u odnosu na biljke uzgajane u kontrolnim uvjetima (bez NaCl). Dodatni porast koncentracije prolina u listovima je kod aplikacije 50 i 100 μ M FA (181,52 μ mol/g s.m.) u solnom stresu. Tretman s 10 μ M FA

uzrokuje značajan pad sadržaja prolina u listovima pri tretmanu te je 4,30 puta manja u odnosu na biljke koje su tretirane samo sa soli. U korijenu sadržaj prolina prati trend kao u listovima tj. značajan porast dešava se u solnom stresu u odnosu na netretirane kontrole. Pred-tretman s 10 μM FA u solnom stresu značajno smanjuje koncentraciju prolina (9,78 puta manja nego kod biljaka tretiranih samo sa soli), dok više konc. FA povećavaju razinu prolina kao kod listova.



Slika 43. Sadržaj prolina (**a**) i antioksidacijska aktivnost izmjerena DPPH metodom (**b**) i FRAP metodom (**c**) kod biljaka kineskog kupusa izloženog solnom stresu koncentracije 150 mM NaCl i tretiranog različitim koncentracijama ferulinske kiseline (FA) (0 μM , 10 μM , 50 μM i 100 μM). Rezultati su srednja vrijednost \pm SD (n=3). Različita velika slova predstavljaju statistički značajne razlike u odnosu na tretmane kod listova dok različita mala slova statistički značajne razlike u odnosu na tretmane kod korijena ($p < 0,05$).

Antioksidacijska aktivnost mjerena putem DPPH i FRAP metoda, veća je u listovima nego u korijenu. Solni stres (150 mM NaCl) značajno smanjuje antioksidacijsku aktivnost i u listu i u korijenu u odnosu na pozitivne kontrole. Tretmani s 10 μM FA pokazuju pozitivan učinak na antioksidacijsku aktivnost (mjerenu DPPH) u solnom stresu i u listu (1,29 puta veće) i u korijenu (2,26 puta veća u odnosu na biljke tretirane samo sa soli). Slično, antioksidacijske aktivnosti mjerene FRAP metodom također potvrđuje rezultate dobivene DPPH metodom te je najveći porast antioksidacijske aktivnosti u listovima i korijenu pri primjeni tretmana 10 μM FA, gdje u odnosu na biljke tretirane samo sa soli porast i u listovima i u korijenu iznosi 1,53 puta.

3.2.5.3.4. Sadržaj specijaliziranih metabolita

Sadržaj specijaliziranih metabolita koji uključuju ukupne fenole, fenolne kiseline, flavonoide, ukupne flavanole i glukozinolate kod kineskog kupusa izloženog solnom stresu (150 mM NaCl) i tretiranog različitim koncentracijama ferulinske kiseline (FA) (0 μ M, 10 μ M, 50 μ M i 100 μ M) mjereni su spektrofotometrijski (**Tablica 16**).

U listovima kineskog kupusa koncentracija ukupnih fenola i flavanola povećana je s tretmanom 10 μ M FA u odnosu na pozitivne kontrole. Solni tretmani (150 mM NaCl) uzrokuju značajan pad koncentracije specijaliziranih metabolita osim glukozinolata koji su značajno povećani s obzirom na netretirane biljke. Pozitivan učinak FA vidljiv je pri konc. 10 μ M u solnom stresu gdje pozitivno utječe na sadržaj specijaliziranih metabolita osim glukozinolata koji se smanjuju (3,93 puta u odnosu na solni tretman bez aplikacije FA).

U korijenu, sadržaj ukupnih fenola, ukupnih fenolnih kiselina, i glukozinolata viši je kod biljaka tretiranih FA u odnosu na pozitivne kontrole. Solni stres uzrokuje smanjenje koncentracije fenolnih metabolita dok su glukozinolati povećani. Tretman s 10 μ M FA u solnom stresu ima pozitivan učinak na fenolne spojeve tj. sadržaj ukupnih fenola je 3,24 puta veća u odnosu biljke tretirane samo sa soli. Tretmani s nižim koncentracijama FA smanjuju sadržaj glukozinolata u solnom stresu, dok 100 μ M FA uzrokuje značajan porast njihove koncentracije (1,57 puta) u odnosu na kontrolu u solnom stresu.

Folijarna aplikacija FA, posebno 10 μ M FA ima pozitivan učinak na sadržaj fenolnih spojeva u solnom stresu što je u pozitivnoj korelaciji s antioksidacijskim aktivnostima prikazanim na **slici 39**.

Tablica 16. Sadržaj specijaliziranih metabolita kod biljaka kineskog kupusa podvrgnutih solnom stresu (150 mM NaCl) i različitim koncentracijama ferulinske kiseline (0 μ M, 10 μ M, 50 μ M i 100 μ M). Rezultati su srednja vrijednost \pm SD (n=3), svijetlo siva boja predstavlja najmanje vrijednosti dok tamno zelena najviše vrijednosti. Različita slova predstavljaju statistički značajne razlike za svaki pojedini specijalizirani metabolit, posebno u listu i korijenu, u odnosu na tretmane ($p < 0,05$).

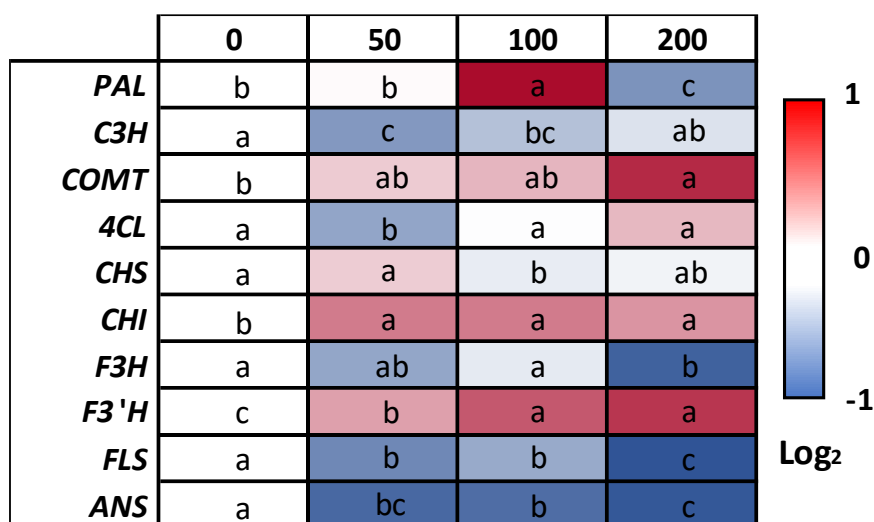
List					
Tretman	Ukupni fenoli	Fenolne kiseline	Flavonoidi	Flavanoli	Glukozinolati
	mg GAE/g s.m.	mg CAE/g s.m.	mg CE/g s.m.	μ g CE/g s.m.	mg sinigrin/g s.m.
0 mM NaCl 0 μ M FA	32,66 \pm 0,40 c	6,91 \pm 0,08 a	5,63 \pm 0,03 a	66,46 \pm 0,19 bc	70,01 \pm 0,89 c
0 mM NaCl 10 μ M FA	35,03 \pm 0,20 a	6,01 \pm 0,02 b	5,69 \pm 0,04 a	75,57 \pm 0,79 a	70,87 \pm 1,42 c
0 mM NaCl 50 μ M FA	25,52 \pm 0,04 d	4,10 \pm 0,04 g	4,12 \pm 0,01 d	65,38 \pm 0,55 c	74,21 \pm 0,49 c
0 mM NaCl 100 μ M FA	32,45 \pm 0,11 c	5,36 \pm 0,03 c	5,24 \pm 0,04 b	58,27 \pm 0,93 d	71,95 \pm 1,55 c
150 mM NaCl 0 μ M FA	23,57 \pm 0,04 e	4,32 \pm 0,01 f	3,81 \pm 0,01 f	51,02 \pm 0,67 f	273,53 \pm 4,85 a
150 mM NaCl 10 μ M FA	34,22 \pm 0,12 b	5,25 \pm 0,03 c	4,85 \pm 0,01 c	67,97 \pm 0,93 b	69,67 \pm 1,36 c
150 mM NaCl 50 μ M FA	23,60 \pm 0,18 e	4,84 \pm 0,04 d	3,71 \pm 0,03 g	44,04 \pm 0,57 g	191,40 \pm 1,83 b
150 mM NaCl 100 μ M FA	24,07 \pm 0,13 e	4,52 \pm 0,03 e	3,97 \pm 0,03 e	53,08 \pm 0,54 e	279,84 \pm 7,61 a
Korijen					
0 mM NaCl 0 μ M FA	9,50 \pm 0,06 e	1,30 \pm 0,01 c	1,27 \pm 0,03 a	30,92 \pm 0,65 a	30,46 \pm 0,38 f
0 mM NaCl 10 μ M FA	11,84 \pm 0,06 c	2,09 \pm 0,01 a	1,18 \pm 0,01 b	23,63 \pm 1,00 c	43,98 \pm 0,48 d
0 mM NaCl 50 μ M FA	10,10 \pm 0,05 d	1,28 \pm 0,02 c	0,98 \pm 0,03 d	28,77 \pm 0,70 b	36,29 \pm 0,73 e
0 mM NaCl 100 μ M FA	13,59 \pm 0,07 a	1,42 \pm 0,01 b	1,08 \pm 0,02 c	28,35 \pm 0,65 b	54,35 \pm 0,43 c
150 mM NaCl 0 μ M FA	3,76 \pm 0,10 g	0,74 \pm 0,01 e	0,74 \pm 0,02 f	15,93 \pm 0,48 d	75,33 \pm 1,32 b
150 mM NaCl 10 μ M FA	12,18 \pm 0,10 b	0,67 \pm 0,01 f	0,84 \pm 0,03 e	24,55 \pm 0,71 c	41,61 \pm 0,12 d
150 mM NaCl 50 μ M FA	4,96 \pm 0,08 f	0,96 \pm 0,01 d	0,92 \pm 0,02 d	17,38 \pm 0,54 d	31,63 \pm 0,68 f
150 mM NaCl 100 μ M FA	5,16 \pm 0,10 f	0,93 \pm 0,02 d	0,69 \pm 0,01 f	15,79 \pm 0,57 d	118,57 \pm 3,71 a

3.3. Molekularna i funkcionalna istraživanja u kupusnjača uslijed solnog stresa

Pored analitičkih istraživanja specijaliziranih metabolita (posebno fenolnih spojeva), provedena su istraživanja transkripata gena i aktivnosti enzima uključenih u fenilpropanoidni biosintetski put u klijancima kineskog kupusa (*B. rapa*) te funkcionalna istraživanja koristeći dostupne mutante uročnjaka (*A. thaliana*) u tom biosintetskom putu.

3.3.1. Analiza transkripata gena fenilpropanoidnog biosintetskog puta

Analiza transkripata slijedećih gena fenilpropanoidnog biosintetskog puta provedena je u klijancima kineskog kupusa izloženima različitim koncentracijama soli (50-200 mM) NaCl: fenilalanin-amonij liaze (PAL); cinamat 4-hidroksilaze (C4H); 4- kumarat koenzim A ligaze (4CL); cinamat 3- hidroksilaze (C3H); kava kiselina 3-O-metiltransferaze (COMT); halkon sintaze (CHS); halkon izomeraze (CHI); flavanon 3- hidroksilaze (F3H); flavonoid 3`-hidroksilaze (F3`H); flavonol sintaze (FLS) i antocijanidin sintaze (ANS). Dobiveni rezultati prikazani su na **slici 44**, a shematski prikaz zbirnih rezultata razine transkripata i aktivnosti pripadajućih enzima prikazan je na **slici 46**.



Slika 44. Prikaz razine transkripata gena fenilpropanoidnog biosintetskog puta. Rezultati su srednja vrijednost \pm SD (n=9), plava boja predstavlja smanjenje razine ekspresije dok crvena povećanje razine ekspresije. Provedena je statistička usporedba pojedinih transkripta gena uslijed solnog stresa (50-200 mM NaCl) u odnosu na njegovu kontrolu (0 mM NaCl), gdje različita slova predstavljaju statistički značajne razlike ($p < 0,05$).

Na temelju dobivenih rezultata vidljivo je da solni stres utječe na razinu transkripcije gena fenilpropanoidnog biosintetskog puta. PAL je prvi enzim fenilpropanoidnog puta te katalizira pretvorbu L-fenilalanina do cimetine kiseline. Na **slici 44** vidljivo je da koncentracija soli od 100 mM NaCl uzrokuje statistički značajno povećanje razine transkripta *PAL* gena, međutim, koncentracija soli od 200 mM dovodi do inhibicije njegove transkripcije u odnosu na kontrolu. Smanjena razina transkripta gena za *4CL* enzim, koji omogućuje stvaranja *p*-kumaril-CoA,

primijećena je kod koncentracije 50 mM NaCl u odnosu na kontrolu. U sintezi hidroksicimetnih kiselina, kao što je ferulinska kiselina, i njihovih derivata važnu ulogu imaju C3H i COMT enzimi. Kava kiselina nastaje preko *p*-kumarinske kiseline te je za njezinu sintezu ključan C3H čija je ekspresija smanjena prilikom izlaganja solnom stresu posebno pri koncentraciji soli od 50 mM. Ekspresija gena za COMT enzim se kontinuirano povećavala prilikom aplikacije solnog stresa te je statistički značajna pri koncentraciji soli od 200 mM NaCl. U putu biosinteze flavonoida ključni enzimi su CHS, CHI i F3H. Od spomenutih enzima jedino je razina transkripta gena za CHI povećana prilikom izlaganja solnom stresu u sve tri aplicirane koncentracije NaCl. Ekspresija gena za CHS enzim značajno je smanjena kod 100 mM NaCl u odnosu na kontrolu. Aplikacija solnog stresa uzrokuje smanjenje razine ekspresije gena za F3H enzim te je pri koncentraciji soli od 200 mM NaCl najizraženija. Nadalje, značajno povećanje razine transkripta gena *F3'H* izmjereno je pri koncentracijama soli od 100 mM i 200 mM. F3'H enzim sudjeluje u putu biosinteze flavonoida te katalizira pretvorbu dihidrokaempferola u dihidrokvercetin. Razina transkripcije *FLS* i *ANS* gena, koji su dio biosintetskog puta flavanola gdje se u konačnici sintetiziraju kvercetin i kaempferol, smanjena je prilikom aplikacije solnog stresa (50-200 mM NaCl), gdje je u oba enzima najveće smanjenje ekspresije pri koncentraciji soli od 200 mM NaCl.

3.3.2. Mjerenje aktivnosti enzima fenilpropanoidnog biosintetskog puta

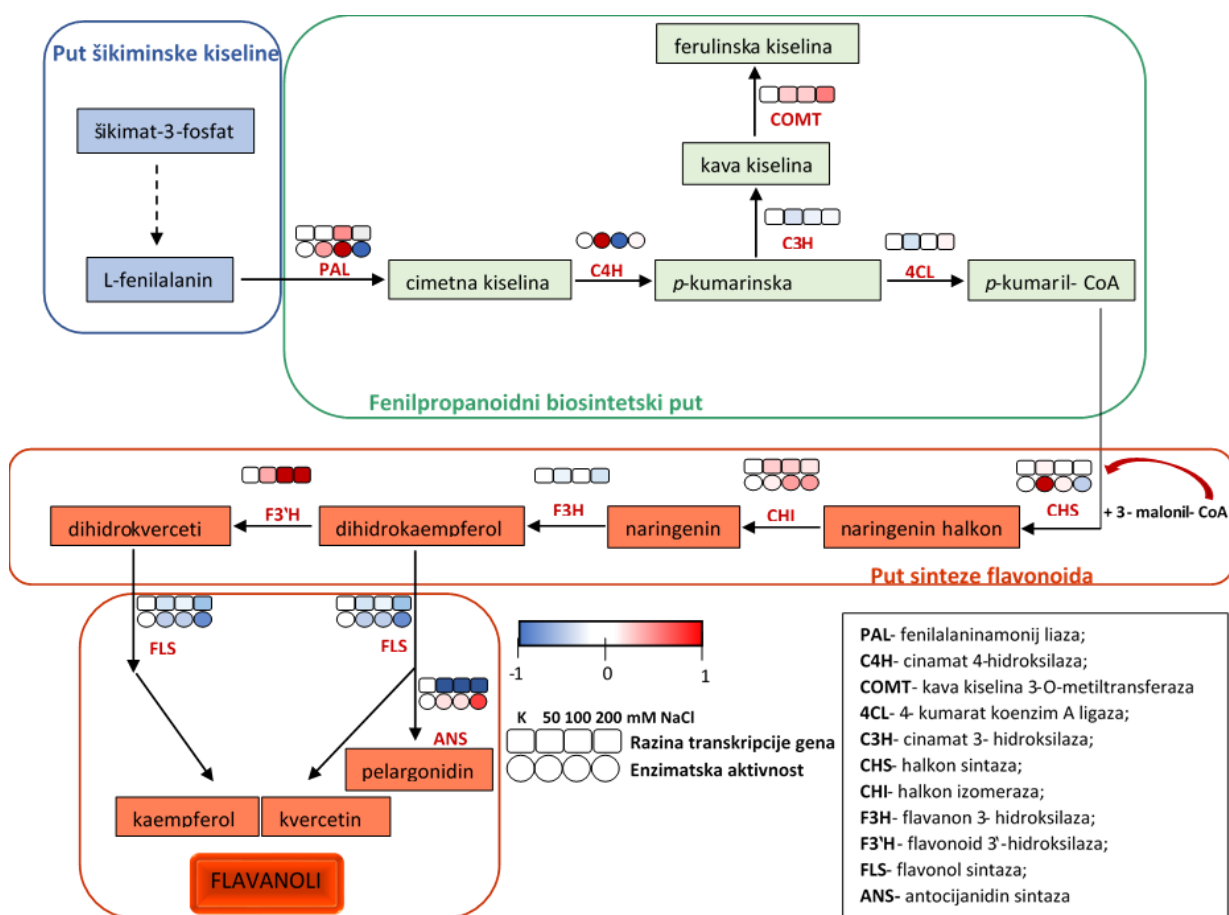
Izmjerena je enzimska aktivnost 6 enzima fenilpropanoidnog biosintetskog puta u klijancima kineskog kupusa u uvjetima solnog stresa (50-200 mM NaCl) u odnosu na netretirane kontrole: fenilalaninamonij liaze (PAL); cinamat 4-hidroksilaze (C4H); halkon sintaze (CHS); halkon izomeraze (CHI); flavonol sintaze (FLS) i antocijanidin sintaze (ANS). Dobiveni rezultati prikazani su na **slici 45** dok je shematski prikaz biosintetskog puta s rezultatima analize transkriptata gena i aktivnostima pripadajućih enzima zbrino prikazan na **slici 46**.

	Kontrola	50 mM NaCl	100 mM NaCl	200 mM NaCl
PAL	c	b	a	d
C4H	b	a	c	b
CHS	c	a	b	d
CHI	c	b	a	a
FLS	a	b	b	c
ANS	b	b	b	a

Slika 45. Prikaz aktivnosti enzima fenilpropanoidnog biosintetskog puta. Rezultati su srednja vrijednost \pm SD (n=9), plava boja predstavlja smanjenju razinu aktivnosti dok crvena povećanu razinu aktivnosti. Provedena je statistička usporedba svakog pojedinog enzima izloženog solnom stresu (50-200 mM NaCl) u odnosu na njegovu kontrolu (0 mM NaCl), gdje različita slova predstavljaju statistički značajne razlike ($p < 0,05$).

Iz priloženih rezultata je vidljivo da solni stres (50-200 mM NaCl) uzrokuje promijene aktivnosti enzima. Aktivnost prvog enzima biosintetskog puta (PAL) povećana je prilikom aplikacije solnog stresa od 50 mM (9,31 puta) i 100 mM (17,75 puta) u odnosu na kontrolu dok koncentracija soli od 200 mM uzrokuje smanjenje PAL aktivnosti 12,31 puta u odnosu na kontrolu. Aktivnost C4H enzima povećana je pri niskoj konc. soli (9,80 puta) u odnosu na kontrolu dok koncentracija soli od 100 mM uzrokuje drastično smanjenje aktivnosti C4H enzima koja je u odnosu na 50 mM koncentraciju soli za oko 10 puta manja. Povećana aktivnost izmjerena je kod CHI enzima u skladu s rastućom konc. soli te u ANS enzima pri najvišoj koncentraciji soli. Oba enzima sudjeluju u putu biosinteze flavonoida. U odnosu na kontrolu najveća aktivnost CHI enzima je oko 1,5 puta veća pri koncentracijama 100 mM i 200 mM NaCl, dok je kod ANS enzima aktivnost pri koncentraciji od 200 mM NaCl oko 1,79 puta veća u odnosu na kontrolu. Aktivnost CHS enzima povećana je pri koncentracijama soli od 50 mM i 100 mM, s naglaskom na 50 mM koncentraciju NaCl gdje je aktivnost u odnosu na kontrolu 5,85 puta veća. Koncentracija soli od 200 mM uzrokuje pad aktivnosti CHS enzima (2,5 puta) u odnosu na kontrolu. Jedini od mjerenih enzima kod kojeg izlaganje solnom stresu, bez obzira na koncentraciju, uzrokuje smanjenje aktivnosti je FLS enzim. Najznačajniji pad njegove aktivnosti je pri najvišoj koncentraciji soli (200 mM NaCl), te je za 5,88 puta manja u odnosu na kontrolu.

Na **slici 46** prikazana je shema fenilpropanoidnog biosintetskog puta s rezultatima analiza transkripata gena i aktivnosti enzima tog puta u klijancima kineskog kupusa. Nažalost nismo bili u mogućnosti izmjeriti sve enzime uz pripadajuće gene biosintetskog puta. Iz priloženog je vidljivo da su transkripcije gena *PAL* kao i aktivnost PAL enzima povećane u solnom stresu, posebno kod 100 mM NaCl. Nadalje razine transkripata gena *C4H* i *COMT* su također povećani uslijed solnog stresa. U putu sinteze flavonoida transkripcija *CHS* gena nije značajno povećana dok je aktivnost enzima značajna kod niskih koncentracija soli. Transkripcija gena *CHI* i aktivnost enzima se podudaraju te su povećane u uvjetima stresa. Nadalje u biosintetskom putu flavanola ekspresija gena *FLS* i *ANS* je inhibirana. Aktivnost enzima *FLS* inhibirana je solnim stresom dok je aktivnost *ANS* enzima aktivirana.

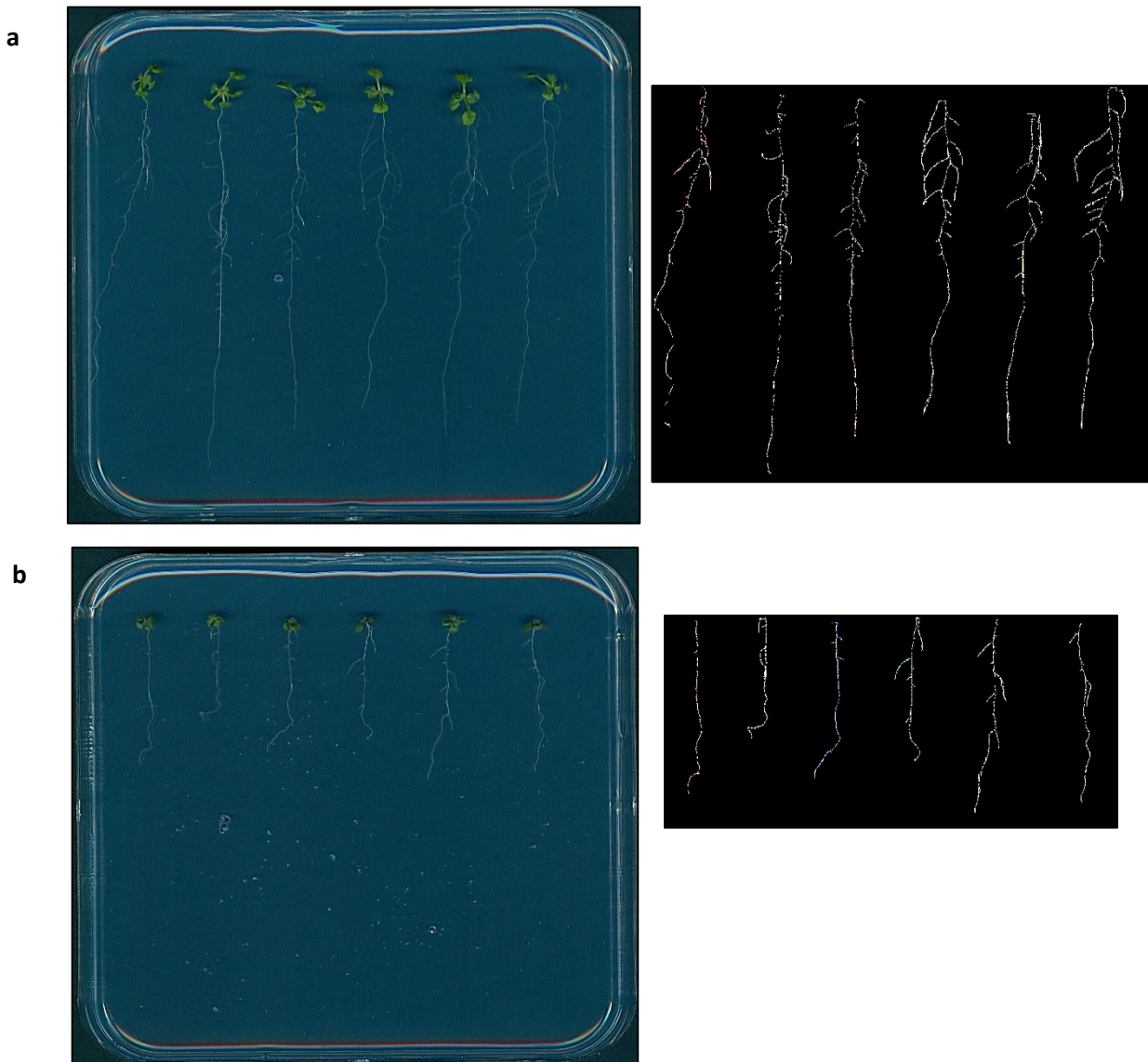


Slika 46. Shema fenilpropanoidnog biosintetskog puta i razine transkripata gena i aktivnosti pripadajućih enzima. Provedena je statistička usporedba svakog pojedinog transkripta ili enzima izloženog solnom stresu (50-200 mM NaCl) u odnosu na njegovu kontrolu (0 mM NaCl), gdje različita slova predstavljaju statistički značajne razlike ($p < 0,05$).

3.3.3. Funkcionalna istraživanja provedena na uročnjaku (*Arabidopsis thaliana*)

Uloga specifičnih gena fenilpropanoidnog biosintetskog puta u uvjetima solnog stresa ispitana je korištenjem mutanti uročnjaka koji imaju jednu ili više mutacija u genima tog biosintetskog puta (Materijal i metode, Tablica 3). Biljke su morfološki analizirane u uvjetima stresa u odnosu na njihove kontrole gdje je praćena dinamika rasta i razvoja te duljina i razgranatost korijena te su rezultati prikazani u **tablici 17**.

Na **slici 47**, prikazane su biljke uročnjaka *PAL1* mutante u uvjetima solnog stresa (150 mM NaCl) i pripadajuće kontrole.



Slika 47. Reprezentativna slika *PAL1* mutante **a)** kontrola i **b)** 150 mM NaCl. Lijevo je prikazana fotografija *PAL1* mutante na MS podlozi a desno slika korijena nakon obrade fotografije u EZ-Rhizo 2 programu.

Kao što je vidljivo na **slici 47** i u **tablici 17**, kod svih mutanata uročnjaka, uključujući i WT Col-0, izlaganje solnom stresu (150 mM NaCl) uzrokuje statistički značajno smanjenje rasta glavnog korijena. Također, razgranatost korijena kod svih mutanata, osim u slučaju *COMT* mutante, veća je kod onih uročnjaka koji su rasli bez izlaganja solnom stresu te jedino kod *fah1-7* i *fah1-7, tt3-1* mutanata ta razlika nije statistički značajna. Jedina mutanta kod koje solni stres uzrokuje povećani broj lateralnih korijena u odnosu na kontrolu je *COMT*. Kada govorimo o srednjoj duljini lateralnih korijena, nema statistički značajne razlike između mutanti koje su rasle u kontrolnim uvjetima u odnosu na one izložene solnom stresu, međutim, na temelju tablice 17 može se zaključiti da je srednja duljina lateralnih korijena kod mutanti izloženih solnom stresu manja u odnosu na kontrole.

Tablica 17. Morfološka analiza mutanti uročnjaka s mutacijom jednog ili više gena fenilpropanoidnog biosintetskog puta podvrgnutih solnom stresu (150 mM NaCl) u odnosu na njihove kontrole. Provedena je statistička usporedba unutar pojedinog varijeteta mutanata izloženih solnom stresu (150 mM NaCl) u odnosu na njihovu kontrolu (0 mM NaCl), gdje različita slova predstavljaju statistički značajne razlike ($p < 0,05$).

Mutanta	Duljina glavnog korijena (cm)	Broj lateralnih korijena	Raspon duljine lateralnog korijena (cm)	Srednja duljina lateralnih korijena (cm)
<i>WT Col-0</i> 0 mM NaCl	10,48±2,05 a	131,64±58,31 a	0,4-1,2	0,97±0,51 a
<i>WT Col-0</i> 150 mM NaCl	5,04±0,71 b	35,72±20,78 b	0,2-0,8	0,51±0,11 a
<i>fah1-7</i> 0 mM NaCl	7,79±2,29 a	57,66±7,58 a	0,03-0,11	0,09±0,07 a
<i>fah1-7</i> 150 mM NaCl	4,63±1,06 b	52,00±19,56 a	0,02-0,09	0,06±0,03 a
<i>fah1-7, tt3-1</i> 0 mM NaCl	8,12±2,99 a	65,66±19,08 a	0,02-0,12	0,08±0,05 a
<i>fah1-7, tt3-1</i> 150 mM NaCl	4,88±0,66 b	56,80±11,90 a	0,01-0,08	0,04±0,02 a
<i>PAL1</i> 0 mM NaCl	10,86±1,71 a	132,75±55,67 a	0,07-0,2	0,09±0,05 a
<i>PAL1</i> 150 mM NaCl	4,70±0,47 b	54,91±22,15 b	0,01-0,09	0,06±0,04 a
<i>PAL2</i> 0 mM NaCl	9,18±2,09 a	86,16±31,84 a	0,2-1,1	0,61±0,22 a
<i>PAL2</i> 150 mM NaCl	4,32±1,21 b	45,25±21,46 b	0,1-0,9	0,58±0,38 a
<i>PAL3</i> 0 mM NaCl	8,98±2,66 a	109,63±38,10 a	0,2-0,9	0,62±0,28 a
<i>PAL3</i> 150 mM NaCl	3,53±1,20 b	38,63±11,86 b	0,08-0,5	0,35±0,1 a
<i>PAL4</i> 0 mM NaCl	10,30±2,57 a	98,45±32,14 a	0,09-0,7	0,42±0,22 a
<i>PAL4</i> 150 mM NaCl	3,61±1,06 b	61,00±25,87 b	0,05-0,6	0,29±0,10 a
<i>COMT</i> 0 mM NaCl	9,75±2,85 a	69,80±14,53 b	0,01-0,3	0,07±0,04 a
<i>COMT</i> 150 mM NaCl	5,56±1,38 b	83,08±32,05 a	0,008-0,09	0,03±0,02 a

4. RASPRAVA

Stres se definira kao bilo koji abiotički (salinitet, povišena temperatura, deficit vode, itd.) ili biotički čimbenik (uzročnici bolesti, biljojedi) koji ograničava normalan rast i razvoj biljaka ili na bilo koji način uzrokuje smanjenja prinosa različitih poljoprivrednih kultura (Grime 1977). Poljoprivreda je tako sa sve izražajnijim klimatskim promjenama pred ozbiljnim izazovima. Procjene su da će do 2050. godine potreba za proizvodnjom hrane porasti za 70% (Fróna i sur., 2019) i činjenica je da se produktivnost usjeva ne povećava paralelno s potražnjom hrane. Niža produktivnost, u većini slučajeva, pripisuje se raznim abiotičkim stresorima među kojima je i povećani salinitet tla. Gubitak obradivog zemljišta uslijed zasoljenosti tla u izravnom je sukobu s rastućom populacijom što predstavlja veliki izazov za poljoprivredu kako bi se osigurale globalne potrebe za hranom (Pareek i sur., 2008). Povišeni salinitet tla negativno utječe i na uzgoj kupusnjača, kao važnih tradicionalnih i komercijalnih poljoprivrednih kultura na područjima Sredozemlja (Zhang i sur. 2014). Stoga je u svrhu očuvanja sigurnosti poljoprivredne proizvodnje i hrane vrlo važno istražiti učinak čimbenika stresa na biljke te mehanizme tolerancije (Shanker i Venkateswarlu 2011).

U ovom istraživanju okarakteriziran je odgovor tri vrste kupusnjača, kineskog kupusa (*B. rapa* spp. *pekinensis*), bijelog kupusa (*B. oleracea* var. *capitata*) i raštike (*B. oleracea* var. *acephala*) na izloženost kratkotrajnom solnom stresu (24 h) na fiziološkoj i biokemijskoj razini. Odgovor je praćen u dva razvojna stadija: stadij klijanaca i stadij četiri do pet tjedna starih hidroponski uzgojenih biljaka. Razlog interesa za navedenih vrsta je zbog njihove različite tolerancije na povišeni salinitet gdje je od navedenih varijeteta kineski kupus najosjetljivija vrsta a raštika najotpornija (Pavlović i sur. 2019). Također, valja napomenuti da je kineski kupus prva komercijalno dostupna vrsta kupusnjača koja ima sekvencioniran genom (Hou i sur., 2013) pa je moguće provoditi istraživanja na molekularnoj razini te pratiti ekspresije gena od interesa (mjerjenje razine ekspresije gena uključenih u fenilpropanoidni metabolizam). Bijeli kupus i raštika su tradicionalno važne poljoprivredne kulture u Hrvatskoj iako je za sada raštika ograničena na mala poljoprivredna gospodarstva i privatnu proizvodnju dok je uzgoj i prerada bijelog kupusa od komercijalnog značaja.

Poseban naglasak istraživanja stavljen je na ulogu specijaliziranih metabolita kao što su polifenoli, karotenoidi i glukozinolati u odgovoru na povišeni salinitet kod tri vrste klijanaca i hidroponski uzgojenih kupusnjača. Funkcionalna istraživanja provedena su na biljkama uočnjaka (*Arabidopsis thaliana*) izloženima solnom stresu gdje se koristio divlji tip i linije s mutacijom u jednom ili više gena uključenih u fenilpropanoidni biosintetski put.

Za postizanje uvjeta solnog stresa korištena je sol NaCl i to u koncentracijama od 50, 100 i 200 mM. Utvrđivanjem električne vodljivosti (EC) tla može se procijeniti prisutnost slobodnih iona tj. prisutnost topljivih soli u tlu. U prirodi, slanost tla mjeri se u jedinicama (dS/m) električne provodljivosti (EC), gdje 1 dS/m odgovara koncentraciji NaCl od 10 mM. Tla koja imaju električnu vodljivost veću od 4 dS/m (40 mM soli) karakteriziraju se kao slana tla. Međutim, povišenim salinitetom tla smatra se EC od 8 dS/m do 12 dS/m (80-120 mM NaCl) te može uzrokovati gubitke u prinosu poljoprivrednih usjeva (Bogunovic et al. 2017). Iz navedenih podataka može se zaključiti da koncentracije soli korištene u ovom istraživanju mogu biti prisutne i u prirodnom okruženju.

4.1. Vrste roda *Brassica* i otpornost na solni stres

Zbog svojih značajnih ekonomskih i nutritivnih vrijednosti rod *Brassica* vrlo je značajan u ljudskoj prehrani te zauzima treće mjesto među svim vrstama. Međutim, njihov rast i prinos znatno su smanjeni u uvjetima solnog stresa. Točnije, smatra se da je rod *Brassica* relativno osjetljiv na salinitet u uvjetima klijanja sjemena i ranom rastu i razvoju biljaka (Ashraf i McNeilly 2004). Također, postoji značajna razlika u toleranciji na salinitet između pojedinih vrsta unutar roda *Brassica*. Odnosi među kultiviranim vrstama *Brassica* bile su u velikoj mjeri razjašnjene citološkim radom Morinaga (1934). Prema njegovoj hipotezi, vrste s velikim brojem kromosoma kao što su *B. napus* ($2n = 38$, AACC), *B. juncea* ($2n = 36$, AABB) i *B. carinata* ($2n = 34$, BBCC) su amfidiploidi koji se u paru kombiniraju s vrstama koje imaju mali broj kromosoma kao što su *B. nigra* ($2n = 16$, BB), *B. oleracea* ($2n = 18$, CC), i *B. rapa* ($2n = 20$, AA). Ova hipoteza je potvrđena prema teoriji U trokuta (1935.) (Slika 1). Fenomen interspecifične hibridizacije doveo je do evolucije tetraploidne vrste *Brassica*. Tri su osnovna pristupa koji se trenutno koriste za stvaranja kupusnjača otpornijih na solni stres 1. probir postojećih genotipova; 2. konvencionalni uzgoj za razvijanje linija otpornih na sol i 3. stvaranje transgenih biljaka za uvođenje novih gena ili za promjenu ekspresijske razine postojećih gena koje utječu na stupanj tolerancije solnog stresa (Pareek i sur., 2008). Tolerancija na sol vrlo je složena osobina biljnih vrsta pa tako i kupusnjača pošto njome upravljaju brojni mehanizmi na staničnoj, tkivnoj i organskoj razini ili na nivou cijele biljke. Većina vrsta iz roda *Brassica* klasificirana je kao umjereno tolerantna na sol s time da amfidiploidne vrste (*B. carinata*, *B. juncea* i *B. napus*) su tolerantnije na sol od diploidnih vrsta (*B. campestris*, *B. nigra*, *B. oleracea* i *B. rapa*) (Kumar, 1995). Također, brojna istraživanja potkrepljuju činjenicu da se poliploidne vrste općenito bolje nose s nepovoljnim okolišnim čimbenicima od svojih diploidnih predaka. Iz toga je proizašla pretpostavka da veća tolerancija na solnih stres prisutna kod amfidiploida potječe od genoma *B. campestris* i *B. oleracea* L. (Ashraf i sur., 2001).

4.1.1. Fiziološki pokazatelji odgovora na solni stres

U ovim istraživanjima korištene su slijedeće vrste/varijeteti: kineski kupus (*B. rapa* spp. *Pekinensis*) bijeli kupus (*B. oleracea* var. *capitata*) i raštika (*B. oleracea* var. *acephala*) za koje je prethodnim istraživanjima dokazana različita osjetljivost na solni stres i hormonska pozadina te osjetljivosti/tolerancije (Pavlović i sur. 2019).

Stupanj stresa kod klijanaca spomenutih vrsta praćen je jednostavnim i pouzdanim pokazateljima osjetljivosti biljaka na solni stres tj. testom inhibicije rasta korijena i akumulacije biomase uslijed solnih tretmana.

Na temelju dobivenih rezultata (Slika 21 i Slika 22b) vidljivo je da kod kineskog kupusa kao najosjetljivije vrste na solni stres u odnosu druga dva varijeteta, imamo najizraženiju inhibiciju u rastu korijena i porastu biomase. Bijeli kupus i raštika također pokazuju osjetljivost na izlaganje solnom stresu, međutim u manjoj mjeri u usporedbi s kineskim kupusom. Od svih triju varijeteta raštika se pokazala kao najotpornija vrsta te je vidljivo da se najbolje nosi s višim koncentracijama soli.

Prema literaturnim podacima, kao što je već i spomenuto vrste iz roda *Brassica* smatraju se umjereno tolerantnima na sol, međutim osjetljivost je ovisna o kultivaru (Pareek i sur., 2008)

što je potkrepljeno i dobivenim rezultatima. Nadalje stupanj osjetljivosti/tolerancije također ovisi i o razvojnom stadiju biljke (Pessaraki i sur., 2015.). Klijanci i mlađe biljke pokazale su se osjetljivijima na solni stres u odnosu na razvijenije i odrasle biljke. Naime i u ovom radu zamjećeno je da jedan dan stari klijanci značajno reagiraju na stres inhibicijom rasta u samo 24 sata tretmana, dok je kod odraslih hidroponski uzgojenih biljaka eventualno uočeno smanjenje turgora posebno u starim listovima pri najvišoj koncentraciji soli (200 mM). Nedavna istraživanja pokazala su da je fotosintetska učinkovitost bila značajnije smanjena u biljaka kineskog kupusa u usporedbi s biljkama bijelog kupusa i kelja nakon 24 sata solnog tretmana u hidroponskom uzgoju (Pavlović i sur. 2019). Smanjena sposobnost fotosintetskog sustava bi svakako i kod odraslih biljaka dugoročno (u produženom solnom stresu) dovela do inhibicije rasta i smanjenja biomase.

4.1.2. Biokemijski pokazatelji odgovora na solni stres

Vidljivi učinci solnog stresa, prvenstveno u vidu inhibicije rasta svakako su posljedica niza metaboličkih promjena koje se dešavaju kao odgovor na prisutnost povećanog saliniteta. Odgovor na solni stres genski je reguliran, a očituje se u svim aspektima od promjena u transkripciji gena, prijenosu signala, metabolizmu ugljikohidrata, ionskoj homeostazi, metabolizmu dušika, fotosintezi, sintezi i akumulaciji specijaliziranih metabolita itd. (Kalifa i sur. 2004).

Solni stres uzrokuje višestruki stresni učinak: ionski stres uzrokovan toksičnim koncentracijama iona (uglavnom Na^+), osmotski stres uzrokovan smanjenjem unosa vode i oksidativni stres potaknut povećanjem razine ROS čestica (Liang i sur., 2018.).

Važan čimbenik odgovora biljaka na solni stres je održavanje ionske i osmotske homeostaze (Zagorchev i sur. 2013). Solni tretmani doveli su do porasta sadržaja iona Na^+ prvenstveno kod kineskog i bijelog kupusa u odnosu na njihove kontrole. Suprotno, sadržaj iona K^+ prilikom izlaganja solnom stresu praktički ostaje nepromjenjiv (**Slika 23a**). Također, pri najvišoj koncentraciji soli (200 mM NaCl) odnos Na^+/K^+ kod kineskog kupusa značajno je veći u odnosu na druga dva varijeteta (**Slika 23b**). Očito je da je akumulacija Na^+ uslijed solnog stresa pojačana u osjetljivijih vrsta kao što je ovdje kineski kupus u odnosu na tolerantnije vrste, bijeli kupus i posebno raštiku (Siringam i sur., 2011). U konačnici, dobiveni rezultati su vidljiv pokazatelj toksičnosti soli koja je najizraženija pri 200 mM NaCl.

Činjenica je da održavanje omjera K^+/Na^+ predstavlja jedan od ključnih mehanizama tolerancije na salinitet u unutar različitih genotipova roda *Brassica*, gdje vrlo važnu ulogu ima model SOS signalizacije. Kod tolerantnijih vrsta prisutna je znatno viša razina transkripcije gena za mehanizme homeostaze iona (SOS1 Na^+/K^+ antiporter i njegovi aktivatori SOS2 i SOS3 te NHX1 Na^+/H^+ vakuolni antiporter) (**Slika 13**). Na temelju toga, tolerantnije vrste imaju veći omjer K^+/Na^+ u svim dijelovima biljke (Li i sur., 2013). Treba napomenuti da sposobnost održavanja ionske homeostaze uvelike ovisi i o vremenskom periodu izloženosti solnom stresu. Kao što je već navedeno prije u tekstu, u rodu *Brassica* razlikujemo vrste otpornije i osjetljivije na solni stres ovisno o tome da li su poliploidi ili diploidi. Prema tome, tolerantniji vrste roda *Brassica* kao npr. *B. juncea* sposobna je održati omjer K^+/Na^+ i do 24 sata pri

izloženosti koncentraciji soli od 200 mM NaCl, što osjetljivije vrste u rodu *Brassica* nisu sposobne. Međutim, iza tog perioda od 24h izloženosti solnom stresu omjer K^+/Na^+ pada (Brini i Masmoudi, 2012). Nadalje, zadržavanje soli u zoni korijena i stabljike štiti listove biljke od toksičnog učinka soli. Transport Na^+ iona iz korijena u listove obavlja se ksilemom biljaka prolaskom iona kroz neselektivne ionske kanale. Također, Na^+ ioni se vraćaju u stanice korijena putem transportera HKT1 da bi se smanjila količina soli u listovima jer su upravo oni primarno mjesto toksičnog učinka (**Slika 13**) (Saibo i sur. 2017). Ioni Na^+ mogu zamijeniti ione Ca^{2+} čime dolazi do promjene permeabilnosti membrane i oštećenja. Analize makro-elemenata uslijed solnih tretmana pokazale su da sadržaj Ca^{2+} iona pada u sve tri vrste kupusnjača prilikom izlaganja koncentraciji soli od 200 mM. Od mikro-elemenata pokazano je da bijeli kupus i raštika sadrže veće količine Fe i Zn u odnosu na kineski kupus (**Slika 24b**). Solni stres (200 mM NaCl) kod kineskog kupusa ne utječe bitno na sadržaj mikro-elemenata. Suprotno, koncentracija soli od 200 mM kod bijelog kupusa uzrokuje blagi pad koncentracije Fe i Zn dok je kod raštike vidljiv značajan porast koncentracije Fe i Zn izlaganjem solnom stresu (200 mM NaCl).

Kao odgovor na osmotsku komponentu solnog stresa u biljkama dolazi od akumulacije prolina. Mnogobrojna istraživanja upućuju na to da postoji pozitivna povezanost između nakupljanja prolina i tolerancije biljaka na stres. Postojeća literatura ukazuje da, iako prolin djeluje kao osmolit, također igra važnu ulogu za vrijeme stresa kao kelator metala (veže na sebe metalne i druge ione) te kao antioksidativna obrambena molekula. Nadalje, ako se primjenjuje egzogeno u niskim koncentracijama, povećava toleranciju biljaka na stres (Dar i sur., 2016).

Rezultati dobiveni u ovom istraživanju ukazuju da u klijancima kao i u listovima hidroponski uzgojenih biljaka, kod sva tri varijeteta, dolazi do porasta prolina paralelno s porastom koncentracije soli (**Slika 25, Slika 34**). Suprotno, u korijenu odraslih biljaka akumulacija prolina ne prati taj trend te je značajan postat primijećen tek pri najvišoj koncentraciji soli (200 mM NaCl) (**Slika 34**). Smatra se da nakupljanje prolina na mnogo načina pridonosi toleranciji prema stresu. Budući da prolin djeluje kao molekularni šaperon, u stanju je održavati integritet proteina i pojačati aktivnost različitih enzima (Yokota, 2003). Brojna istraživanja prezentiraju prolin kao antioksidans, gdje ističu njegovu ulogu kao sredstvo za uklanjanje ROS čestica (Matysik i sur., 2002). Također, Saadia i sur. (2012) pratili su učinak solnog stresa na ekspresiju gena za enzime uključene u metabolizam prolina u dva varijeteta *B. napus* s različitom tolerancijom na solni stres. Pojačana ekspresija gena $\Delta 1$ -pirolin-5-karboksilata sintaze1 (P5CS1) bila je prisutna u oba varijeteta uslijed solnog tretmana i tkivno specifična tj. viša razina transkripta detektirana je u korijenu tolerantnije linije, dok je maksimalna ekspresija primijećena u izdancima osjetljive linije.

Kao rezultat oksidacijskog stresa javlja se akumulacija ROS čestica. Pošto su ROS čestice vrlo reaktivne, njihova prekomjerna proizvodnja, uzrokovana stresnim uvjetima, vrlo je toksična za biljne stanice kao i za proteine, lipide i nukleinske kiseline što u konačnici rezultira oštećenjem stanica i u konačnici može dovesti i do smrti stanice (Gill i Tuteja, 2010). U ovom radu izmjerene su ROS čestice (SO i H_2O_2) *in vivo* u korijenu klijanaca kineskog kupusa, bijelog kupusa i raštike (**Slika 26, Slika 27**). S povećanjem koncentracije soli dolazi do izraženije akumulacije SO i H_2O_2 . Od istraživana tri varijeteta, najveća akumulacija ROS čestica

primijećena je kod kineskog kupusa što ide u prilog osjetljivosti te vrste na solni stres. S druge strane, povećana proizvodnja ROS čestica tijekom stresa također djeluje kao signal za aktivaciju biosintetskih puteva važnih u obrani biljke u stresnim stanjima (Gill i Tuteja, 2010).

Glutation predstavlja važan stanični antioksidans i često se koristi kao jedan od markera stresa. Sadržaj GSH mjereno je indirektno praćenjem intenziteta fluorescencije specifične boje monoklorbiaminom (MCB) *in vivo* u korijenu klijanaca kupusnjača (**Slika 27c**). Rezultati pokazuju da je sadržaj GSH najznačajnije povećan kod kineskog kupusa ovisno o koncentraciji dok je to povećanje kod bijelog kupusa i raštike manjeg intenziteta.

GSH je dio askorbat-glutation ciklus, koji se osim u citosolu, odvija u različitim organelima (mitohondrijima, plastidima i peroksisomima) (Mohammadi i sur., 2018). U konačnici, indikator redoks ravnoteže tijekom detoksikacije H_2O_2 čini odnos između konverzije reduciranog GSH i njegove oksidirane forme GSSG. Ovo je takozvani proces regeneracije askorbata, koji se smatra jednim od najjačih antioksidansa budući da može donirati elektrone velikom broju enzimatski i ne-enzimatskih reakcija. Glutation je važan antioksidans koji potencijalno uklanja $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 i najreaktivniji hidroksilni radikal (HO^{\cdot}) (Gómez-Cadenas i sur., 2016).

4.2. Uloga specijaliziranih metabolita u solnom stresu

Više biljke razvile su različite adaptivne mehanizme za smanjenje oksidativnih oštećenja nastalih uslijed solnog stresa, sintezom različitih antioksidanasa. Među njima, polifenolni spojevi poput fenolnih kiselina, flavonoida, flavanola, antocijana itd. igraju važnu ulogu u uklanjanju slobodnih radikala (Mahmoudi i sur. 2011). Svakako, pored navedenih polifenolnih spojeva, moramo spomenuti i glukozinolate, specijalizirane metabolite vrlo karakteristične za rod *Brassica* koji imaju važnu ulogu u biotskom stresu i obrani od herbivora ali i sve značajniju ulogu u abiotskom stresu (Neugart i sur., 2018) .

4.2.1. Glukozinolati u solnom stresu

Glukozinolati su spojevi koji sadrže dušik i sumpor te su kemijski stabilni u normalnim uvjetima. U uvjetima kada su biljna tkiva i stanice oštećene ili izložene nekom obliku stresa, dolazi do hidrolize glukozinolata putem enzima mirozinaze. U tim procesima nastaju spojevi kao što su izotiocijanati, nitrili, tiocijanati, epitionirili i oksazolidin (Martínez-Ballesta i sur., 2015). Među navedenim spojevima posebna je pažnja posvećena izotiocijanatima jer su uključeni u obranu biljaka od različitih štetnih utjecaja iz okoline, dok kod ljudi konzumacija povrća koje sadrži glukozinolate, poput brokule, kelja i prokulica ima antikancerogeni učinak (Traka i Mithen, 2009).

Iako neke studije ukazuju da čimbenici okoliša, poput svjetlosti, promijena temperature, saliniteta i suše mogu utjecati na sastav glukozinolata, njihova fiziološka uloga kao odgovor na abiotski stres još uvijek nije potpuno razjašnjena (López-Berenguer i sur., 2009).

U ovoj doktorskoj disertaciji glukozinolati su mjereni spektrofotometrijskom metodom. Rezultati pokazuju da se kod kineskog kupusa razina glukozinolata značajno povećava s povećanjem koncentracije soli. Isti trend porasta koncentracije glukozinolata prisutan je i kod ostala dva varijeteta, bijelog kupusa i raštike.

Poznato je da različiti varijeteti imaju različitu toleranciju na solni stres te brojna istraživanja ukazuju na važnost glukozinolata u obrani biljaka od utjecaj štetnih vanjskih čimbenika (Yuan i sur., 2010). Martínez-Ballesta i sur. (2013) ispitali su fiziološki značaj glukozinolata i proizvoda njihove hidrolize u odgovoru različitih biljaka iz roda *Brassica* na različite abiotičke stresove (povećani salinitet, suša, ekstremne temperature i intenzitet svjetlosti). Zaključili su da egzogeni dodatak produkata hidrolize glukozinolata može ublažiti određene stresne uvjete zbog svog utjecaja na određene proteine ali molekularni mehanizmi koji su uključeni u ovaj odgovor su nepoznati i zahtijevaju daljnja istraživanja. Njihova istraživanja su pokazala da se sadržaj glukozinolata povećava u biljkama brokule u slučaju povećanog saliniteta gdje je pri koncentraciji od 40 mM NaCl došlo do velikog povećanja sadržaja glukozinolata dok je pri koncentraciji soli od 80 mM primijećen pad koncentracije glukozinolata. Iste rezultate gdje pri aplikaciji većih koncentracija soli dolazi do pada koncentracije glukozinolata potvrđeno je i u istraživanju López-Berenguer i sur. (2008).

4.2.2. Polifenolni spojevi u solnom stresu

Fenoli su jedna od glavnih skupina biljnih specijaliziranih metabolita, uključujući preko 9000 različitih spojeva. Posjeduju širok spektar bioloških funkcija u biljkama, poput zaštite od UV zračenja, zaštite od patogena, pigmentacije radi privlačenja oprašivača i zaštite od reaktivnih kisikovih čestica nastalih kada aerobni ili fotosintetski metabolizam oslabe različiti okolišni stresori, poput solnog stresa (Sharma i sur., 2019). Sadržaj fenola u biljkama i njihovo antioksidacijsko djelovanje ovise o biološkim čimbenicima i okolišnim uvjetima (temperatura, slanost, suša i intenzitet svjetlosti). Literaturni navodi sugeriraju da akumulacija polifenolnih spojeva (povećana ili smanjena) u odgovoru na salinitet ovisi o biljnoj vrsti/varijetetu, razvojnom stadiju biljke, koncentraciji aplicirane soli, trajanju izloženosti solnom stresu (Waskiewicz i sur., 2013). U ovdje prezentiranim istraživanjima glavne grupe polifenolnih spojeva (ukupni polifenoli, flavonoidi, flavanoli, fenolne kiseline) izmjerene su spektrofotometrijski, a fenolne kiseline su dodatno detaljno analizirane UHPLC-MS/MS metodom. Solni stres potaknuo je promjene u razini polifenola kako u klijancima (**Tablica 1 prilozi**) tako i u korijenu i listovima istraživanih kupusnjača (**Tablica 9**). U klijancima kineskog kupusa zabilježen je pad sadržaja ukupnih fenola i flavonoida u solnom stresu u odnosu na kontrolu. Sadržaj ukupnih fenolnih kiselina i ukupnih flavanola raste kod raštike prilikom solnih tretmana; porast ukupnih fenolnih kiselina izmjeren je pri nižim koncentracijama soli (50 mM i 100 mM NaCl) dok je razina ukupnih flavanola najviše pri 200 mM NaCl.

Benincasa i sur. (2017) istražili su utjecaj solnog stresa (25, 50, 100, 200 mM NaCl) na sadržaj fenolnih spojeva kod vrste *Brassica napus* var. *oleifera* (rotkvice). Zaključili su da je do najvećeg porasta ukupnih fenola došlo prilikom izlaganja koncentraciji soli od 50 mM NaCl dok su veće

koncentracije uzrokovale pad njihovog sadržaja. Također, koncentracije soli od 25 i 50 mM NaCl prouzročile su porast koncentracije ukupnih flavonoida.

Wang i sur. (2010) ispitivali su utjecaj solnog stresa (10, 50 i 100 mM NaCl) na ukupni sadržaj fenola u klijanima starim 3 i 5 dana. Izlaganje koncentraciji od 100 mM NaCl dovelo je do značajnog povećanja sadržaja ukupnih fenola. Ovime su došli do zaključka da solni stres (100 mM NaCl) može poboljšati hranjivu vrijednost klijanaca rotkvice, te da bi klijanje u uvjetima odgovarajuće koncentracije soli moglo biti jedan od korisnih načina za poboljšanje hranjive vrijednosti rotkvice.

4.2.3. Fenolne kiseline u solnom stresu

Fenolne kiseline su značajna grupa polifenolnih spojeva. Predstavljaju važne zaštitne komponente biljnih stanica obzirom da imaju značajnu antioksidacijsku aktivnost. Biljke u različitim fazama rasta imaju različit sadržaj fenolnih kiselina. Velika akumulacija fenolnih kiselina u biljaka primijećena je u reproduktivnoj fazi, te se pretpostavlja da se na taj način biljke brane od štetnih utjecaja okoline u osjetljivoj životnoj fazi. Biljke pšenice izložene solnom stresu imaju smanjeni sadržaj fenolnih kiselina kako u listovima tako i u korijenu (Ashraf i sur., 2010). Nadalje, Ashraf i sur., (2001) su izvijestili da biljke pšenice izložene solnom stresu (0 i 150 mM NaCl) mogu imati različitu koncentraciju fenolnih kiselina ovisno o razvojnom stadiju, gdje su pratili njihov sadržaj kod klijanaca, vegetativnog i reproduktivnog stadija pšenice. Najveći sadržaj fenolnih kiselina bio je prisutan u reproduktivnoj fazi.

U našim istraživanjima detaljnije su analizirane fenolne kiseline u klijanima i hidroponski uzgojenim biljkama uslijed solnih tretmana UHPLC-MS/MS metodom. Ukupno je detektirano deset fenolnih kiselina u sve tri vrste klijanaca gdje ih je šest (PA, pHBA, pCoA, SiA, FA i SA) detektirano u slobodnom obliku i konjugiranom obliku dok su preostale četiri (GaA, CaA, VA i SyA) detektirane isključivo nakon postupka hidrolize tj. u konjugiranom obliku. Kod odraslih biljaka mjeren je sadržaj slobodnih fenolnih kiselina te je detektirano ukupno šest fenolnih kiselina (PA, ChA, pCoA, SiA, FA i SA).

Usporedbom kontrolnih, netretiranih klijanaca kineskog kupusa, bijelog kupusa i raštike, najviši sadržaj ukupnih fenolnih kiselina izmjeren je u raštici (8,4 nmol mg⁻¹ s.m.), zatim u bijelom kupusu (7,3 nmol mg⁻¹ s.m.) te u kineskom kupusu (6,0 nmol mg⁻¹ s.m.). Najzastupljenija fenolna kiselina u sve tri vrste bila je SiA (79–84% od ukupnih fenolnih kiselina) što je ranije potvrđeno za mnoge vrste roda *Brassica* (Velasco i sur., 2011; Cartea i sur., 2011; Ayaz, i sur., 2008; Bhinu i sur., 2009; Oszmiański i sur., 2013). Ostale fenolne kiseline bile su manje zastupljene (u rasponu 0,6–6,4% od ukupnih fenolnih kiselina). Odabrane vrste kupusnjača značajno su se razlikovale u razini pojedinih fenolnih kiselina što upućuje na zaključak da je akumulacija fenolnih kiselina vrsno specifična. Kineski kupus imao je veće količine VA i SA u odnosu na ostale vrste, dok je bijeli kupus imao najviše razine FA i SyA, a raštika je bila vrlo bogat CaA i SiA. Tako je već u netretiranim klijanima uočeno da je prethodno utvrđena tolerancija na solni stres u pozitivnoj korelaciji sa sadržajem fenolnih kiselina: raštika > bijeli kupus > kineski kupus. Opće je zapažanje da su razine slobodnih oblika fenolnih kiselina bile niske u ukupnom sadržaju, što sugerira da su fenolne kiseline uglavnom

konjugirane kao glikozidi i vezane na staničnoj stijenci što je u skladu s literaturnim podacima (Goleniowski i sur., 2013).

U uvjetima solnog stresa, značajno smanjenje u sadržaju fenolnih kiselina zabilježeno je u kineskom kupusu u usporedbi s odgovarajućom kontrolom. Razine slobodne PA, *p*CoA i SA bile su značajno smanjena pri najvišim konc. soli (200 mM NaCl), dok je CaA smanjena pri svim solnim tretmanima u usporedbi s kontrolom. Sadržaj fenolnih kiselina nije se značajno promijenio u bijelom kupusu uslijed solnog stresa. U raštici je zabilježen značajan pad CaA (ukupno) i SA (slobodni oblik) na 100 i 200 mM NaCl, pad *p*CoA u svim koncentracijama soli i značajan porast sadržaja slobodne FA pri 200 mM NaCl. Uspoređujući odnos hidroksicimetnih i hidroksibenzojevih fenolnih kiselina uočeno je da je raštika imala najvišu razinu ukupnih hidroksicimetnih kiselina, zatim bijeli te kineski kupus (**Slika 32**). Odnos ukupnih hidroksicimetnih i ukupnih hidroksibenzojevih kiselina bio je 11,2 u raštici, 7,8 u bijelom kupusu i 6,5 u kineskom kupusu. Uslijed solnog stresa, taj se omjer kontinuirano povećavao te je postigao 12,1 u raštici, 8,6 u bijelom kupusu i 7,7 u kineskom kupusu na 200 mM NaCl.

Važno je napomenuti da dobivene rezultate potkrepljuju literaturni podatci gdje su Garrido-Frenich i sur. (2016) primijetili porast sadržaja hidroksicimetnih kiselina kod rajčice izložene solnom stresu. Također, Gupta i De (2017) objavili su slično istraživanje na biljkama riže izložene solnom stresu gdje je primijećen porast sadržaja hidroksicimetnih kiselina a poseban naglasak je na 4HBA i FA. Hidroksicimetne kiseline pokazuju veće antioksidativno djelovanje u odnosu na hidroksibenzojeve kiseline, jer se smatra da njihov bočni lanac $\text{CH} = \text{CH} - \text{COOH}$ posjeduje jača donatorska i radikalno stabilizirajuća svojstva (Michalak, 2006). Stoga možemo zaključiti da vrste sa višim sadržajem hidroksicimetnih kiselina imaju veći antioksidacijski potencijal u neutraliziranju ROS čestica i time bolja obrambena svojstva u uvjetima stresa. Veća tolerancija raštike i bijelog kupusa na solni stres u usporedbi s kineskim kupusom može se tako povezati s višim razinama hidroksicimetnih kiselina (SiA, CaA i FA). Nadalje, bijeli kupus i raštika sadrže veći sadržaj konjugiranih fenolnih kiselina na stanične stijenske (SiA, FA i *p*CoA) od kineskog kupusa. Objavljeni podaci pokazuju da su FA i *p*CoA uključene u mehanizme tolerancije na solni stres kod riže (Minh i sur. 2016). Gupta i De (2017) su pokazali da sorte riže otporne na solni stres akumuliraju FA i *p*CoA kao ključne komponente vezane za stvaranje staničnih stijenki. CaA je povišena u solnom stresu kod nekih *Echinacea* sp. (Sabra i sur. 2012).

Hidroksicimetne kiseline vrlo su učinkoviti antioksidansi, ovisno o svojoj strukturi (Piazzon i sur. 2012). Dokazani slijed antioksidacijske efikasnosti je: kava kiselina > sinapinska kiselina > klorogenska kiselina > ferulinska kiselina > *p*-kumarinska kiselina (Nićiforović i sur. 2014). S obzirom na zastupljenost i profil fenolnih kiselina u istraženih kupusnjača može se povući korelacija s antioksidacijskim aktivnostima izmjerenim u tim vrstama (**Slika 28**, **Slika 35**). Pri tome treba napomenuti da fenolne kiseline nisu jedini spojevi u ovih uzoraka koje doprinose antioksidacijskoj aktivnosti. Kod klijanaca FRAP metoda jasno pokazuje da najveću antioksidacijsku aktivnost ima raštika nakon čega slijedi bijeli kupus te u konačnici kineski kupus. Izlaganje solnom stresu (50-200 mM NaCl) nije dovelo do značajnijih promjena ni u jednom od varijeteta, te taj trend prati i DPPH metoda. Kod odraslih biljaka, za razliku od klijanaca, postoje određena odstupanja ovisno o konc. soli i tkivu.

U skupini hidroksibenzojevih kiselina, utvrđen je značajan pad sadržaja SA u kineskom kupusu (2,8 puta) u odnosu na raštiku (1,4 puta) i bijeli kupus (1,3 puta) pri 200 mM NaCl. Rezultati upućuju na zaključak da su tolerantnije vrste sposobne održavati prilično nepromijenjene razine SA u odnosu na osjetljivije. SA je poznata signalna molekula koja sudjeluje u odgovoru na abiotički stres. Tretmani biljaka sa SA i derivatima smanjuju oksidativni stres koji nastaje u uvjetima povećanog saliniteta (Hasanuzzaman i sur. 2017). Korelacije između endogenih razina SA i tolerancije na solni stres su kontroverzne u raznim studijama. Istraživanje na mutantama s promijenjenim endogenim koncentracijama SA nije pokazalo jasan obrazac ponašanja tijekom solnog stresa. Neke su studije pokazale da mutanta *A. thaliana* NahG s nedostatkom SA ima povećani rast u odnosu na biljke divljeg tipa i SA-hiperakumulacijsku (*snc1*) mutantu tijekom solnog stresa. Međutim, u drugim studijama SA-hiperakumulacijska mutanta (*siz1*) je pokazivala povećani rast, dok je značajna inhibicija rasta primijećena u biljkama s nedostatkom SA (*NahG*, *sid2* i *eds5*) tijekom solnog stresa (Jayakannan i sur. 2015).

Kod odraslih biljaka kineskog kupusa, bijelog kupusa i raštike također su vidljive promijene u sastavu fenolnih kiselina prilikom izlaganja solnom stresu. Te promijene su više-manje ovise o koncentraciji soli te o biljnom tkivu (**Tablica 10**). Generalno možemo zaključiti da niže koncentracije soli mogu djelovati stimulatивно na akumulaciju nekih fenolnih kiselina dok visoke koncentracije djeluju inhibitoryno.

Dobiveni rezultati mogu se povezati s objavljenim istraživanjima gdje su Zhongxiang i sur. (2008) mjerili sadržaj fenolnih kiselina kod *B. juncea*, Coss. podvrgnute solnom stresu (5% i 10% NaCl). Viša konc. soli uzrokovala je značajnije smanjenje u sadržaju fenolnih kiselina u odnosu na nižu koncentraciju soli i kontrolne biljke.

4.2.4. Potencijalna primjena fenolnih kiselina za poboljšanje tolerancije na stres

S obzirom na saznanje da su neke fenolne kiseline (npr. SiA, FA, SA) povezane s povećanom tolerancijom kupusnjača na solni stres postavili smo pitanje: Mogu li pred-tretmani osjetljivijih vrsta kupusnjača (u ovom slučaju kineskog kupusa) odabranim fenolnim kiselinama poboljšati toleranciju na solni stres?

Stoga su biljke kineskog kupusa uzgojene hidroponski i tretirane pojedinačno SA, SiA i FA (u rasponu konc. 10-100 μ M) u uvjetima solnog stresa (150 mM NaCl).

Uloga SA u jačanju mehanizama tolerancije na solni stres je istraživana u mnogim kulturama, uključujući *Vicia faba*, *Brassica juncea*, *Medicago sativa* i *V. radiata* (Khan i sur., 2014). Li i sur. (2014) objavili su da tretman biljaka *Torreya grandis* sa SA (50 μ M) ima pozitivan učinak u solnom stresu (50 mM NaCl) na prinos biomase te sadržaj klorofila u odnosu na biljke izložene solnom stresu bez SA tretmana. Također, zaključili su da povećani sadržaj klorofila i aktivnost antioksidacijskih enzima privremeno aktiviraju fotosintetski proces te time ublažavaju oksidativni stres kod biljaka. Vlastiti rezultati tretmana kineskog kupusa sa SA u solnom stresu (150 mM NaCl) u skladu su s literaturnim podacima. Pozitivni učinak pred-tretmana sa SA u solnom stresu očituje se smanjenjem prolina što bi značilo manje stanje stresa u odnosu na solne tretmane bez SA (**Slika 39a**) u povećanju antioksidacijske aktivnosti (**Slika 39 b,c**),

povećanju pojedinih grupa polifenolnih spojeva (npr. flavanola) (**Tablica 10**) te povećanju fotosintetske učinkovitosti (**Slika 38**) i sadržaju fotosintetskih pigmenata (**Tablica 11**). Učinak ovisi o konc. SA, a pozitivni učinci uglavnom su zabilježeni kod tretmana 10 μM i 50 μM SA.

SiA je raširena u biljnom svijetu (voće, povrće, žitarice, sjemenke uljarica i neki začini i ljekovito bilje) i kao takva je česta u prehrani ljudi. SiA i njeni derivati značajno su zastupljeni u vrsta roda *Brassica* (kupus, kelj, bijeli kupus, repa i brokula) (Vallejo i sur., 2002). SiA pokazuje antioksidativno, antimikrobno, protuupalno i antikancerogeno djelovanje. 4-vinilsiringol (proizvod dekarboksilacije sinapinske kiseline) je snažno antioksidativno i antimutageno sredstvo. Uglavnom zbog svoje antioksidativne aktivnosti, SiA ima široku uporabu u preradi hrane, kozmetici i farmaceutskoj industriji (Nićiforović i sur., 2014). Najznačajnija uloga SiA u obrani biljaka od nepovoljnih okolišnih uvjeta je snažna antioksidativna aktivnost gdje je 20 μM SiA uspjela inhibirati 33,2% DPPH radikla (Kikuzaki i sur., 2002). Prema dobivenim rezultatima aplicirana SiA, posebno koncentracije 100 μM , smanjuje sadržaj prolina kako u listovima tako i u korijenu (**Slika 41a**) što bi upućivalo na smanjeni stupanj stresa u donosu na solne tretmane. Kako je već prije spomenuto jedna od najznačajnijih uloga SiA je velika antioksidacijska aktivnost, a to potkrepljuju rezultati na **slici 41 b,c**. Jasno je vidljivo da tretman sa 100 μM SiA uzrokuje porast antioksidacijske aktivnosti kod biljaka tretiranih isključivo SiA, bez aplikacije soli (NaCl), ali i u uvjetima solnog stresa. Nadalje, tretman sa SiA uzrokuje promijene u sadržaju specijaliziranih metabolita (ukupni fenoli, fenolne kiseline, flavonoidi, flavanoli i glukozinolati) (**Tablica 14**). Pozitivan učinak SiA vidljiv je aplikacijom 50 μM i 100 μM SiA, gdje koncentracija ukupnih fenola, fenolnih kiselina, flavonoida, flavanola raste u odnosu na solne tretmane bez SiA. Tretmani sa SiA nepokazuju značajan pozitivan utjecaj na parametre fotosintetske učinkovitosti (**Slika 40**) ali imaju negativan utjecaj na sadržaj fotosintetskih pigmenata (**Tablica 13**). Tretmani su uzrokovali pad sadržaja fotosintetskih pigmenata i kod biljaka tretiranih sa SiA bez aplikacije solnog stresa ali i kod biljaka podvrgnutih kombiniranom tretmanu (**Tablica 13**).

Nadalje, FA je visoko zastupljena prirodna fenolna fitokemikalija prisutna u sjemenu i listovima biljaka. Možemo ju naći u slobodnom obliku i kao konjugat gdje može biti kovalentno vezana na polisaharide biljnih staničnih stijenki, glikoproteine, poliamine, lignin i hidroksi masne kiseline (Kumar i sur., 2014). FA igra vitalnu ulogu u osiguravanju krutosti staničnog zida i stvaranju drugih važnih organskih spojeva poput diferulinske kiseline i kurkumina (Anson i sur., 2009). FA pokazuje širok spektar bioloških aktivnosti te je snažan antioksidans, ima protuupalno, antimikrobno, antialergijsko, antikarcinogeno, antivirusno i vazodilacijsko djelovanje. Također, sudjeluje u keliranju metala, modulaciji aktivnosti enzima, aktivaciji transkripcijskih čimbenika i ekspresiji gena (Zhao i Moghadasian, 2008). Tretman kineskog kupusa sa 10 μM FA pokazao je pozitivan učinak u solnom stresu tj. uzrokuje značajan pad sadržaja prolina (**Slika 43a**) što bi upućivalo na smanjenje stresnog učinka soli (150 mM NaCl). Također je zamjećen porast sadržaja fenolnih spojeva (**Tablica 16**) i pozitivan učinak na antioksidacijsku aktivnost u solnom stresu kako u listu tako i u korijenu (**Slika 43b, c**). Pred-tretmani s FA, neovisno o koncentraciji, pozitivno utječu na fotosintezu a najbolji učinak ima 10 μM FA nakon 72 h solnog tretmana. Solni stres značajno smanjuje koncentraciju fotosintetskih pigmenata, međutim, pred-tretmani s FA ublažavaju negativan efekt solnog

stresa (**Tablica 15**). Od kombiniranih tretmana aplikacija 10 μ M FA ima najbolji učinak te u odnosu na kontrolu tretiranu sa 150 mM NaCl dolazi do statistički značajnog porasta koncentracije pigmenata.

Egzogena primjena fenolnih kiselina posebno sinapinske kiseline, praćeno kava kiselinom, ferulinskom i *p*-kumarinskom kiselinom pokazala je pozitivan učinak na biljke pšenice u solnom stresu (Kaur i sur., 2017). Peroksidacija lipida smanjila se ili je ostala bez utjecaja, dok je razina H₂O₂ maksimalno pala uslijed tretmana kava kiselinom. Kapacitet uklanjanja hidroksilnih radikala u pšenici uzgojenoj pod jakim stresom soli povećan je na maksimum nakon tretmana kava kiselinom i sinapinskom kiselinom.

4.3. Kako solni stres djeluje na fenilpropanoidni biosintetski put, na razini transkripcije gena i aktivnosti enzima?

Solni stres rezultira generiranjem ROS čestica poput superoksidnih aniona, vodikovog peroksida i hidroksilnih iona. Takvi uvjeti zahtijevaju aktiviranje kompleksnog antioksidativnog sustava kako bi se tako generirane ROS čestice što prije neutralizirale i kako bi se njihov negativan učinak sveo na najmanju moguću mjeru. Kao što je već spomenuto, polifenolni spojevi imaju vrlo važnu ulogu u takvim okolnostima stresa i pomažu u uklanjanju štetnih ROS čestica u biljkama izloženih solnom stresu (Davaritouchaee i sur., 2019). Polifenoli su uglavnom sintetizirani fenilpropanoidnim biosintetskim putem. U okolnostima stresa dolazi do stimulacije određenih komponenti fenilpropanoidnog biosintetskog puta što rezultira povećanom proizvodnjom i akumulacijom različitih fenolnih spojeva koji imaju snažan antioksidativni potencijal. Neke se fenolne kiseline, kao što su kava kiselina, cimetna kiselina, galna kiselina, ferulinska kiselina i vanilinska kiselina akumuliraju u biljkama u uvjetima solnog stresa (Bistgani, i sur., 2019). Biosinteza antocijanina također je inducirana u biljkama duhana koje rastu na zasoljenim tlima (Sharma i sur., 2019).

Na temelju analize razine transkripata gena (**Slika 44**) i (**Slika 45**) vidljivo je da solni stres utječe na razinu transkripcije gena fenilpropanoidnog biosintetskog puta. Prvi enzim fenilpropanoidnog puta je *PAL* čija je razina transkripcije značajno povećana pri koncentraciji soli od 100 mM NaCl, međutim, koncentracija soli od 200 mM uzrokuje snažnu inhibiciju njegove transkripcije kada uspoređujemo s kontrolom. Također, aktivnost *PAL* enzima povećana je prilikom aplikacije soli od 100 mM NaCl a smanjena pri izlaganju koncentraciji soli od 200 mM NaCl. Koncentracija soli od 200 mM se pokazala visokoinhibitorna za razne metaboličke procese, čak letalna za klijance kupusnjača te ne čudi činjenica da inhibitorno djeluje i na razini transkripcije gena i aktivnosti enzima. Može se zaključiti da slabiji ili umjereni solni stres aktivira i ekspresiju gena i aktivnost enzima *PAL* koji je prvi u fenilpropanoidnom biosintetskom putu i odgovoran za sintezu različitih grupa polifenolnih spojeva. To saznanje je u skladu s metabolomičkim analizama koje su pokazale povećanje sadržaja određenih grupa polifenolnih spojeva u uvjetima stresa (npr. specifično flavanoli u klijancima kineskog kupusa, te flavonoidi i fenolne kiseline kod bijelog kupusa i raštike, **slika 29**). Nadalje, blagi solni stres (50 mM) povećava aktivnost *C4H* enzima koji katalizira pretvorbu cimetne u *p*-kumarinsku kiselinu. *C3H* i *COMT* enzimi važni su u sintezi hidroksicimetnih kiselina. Ekspresija gena za

COMT enzima (koji omogućuje nakupljanje ferulinske kiseline) je povećana aplikacijom solnog stresa. Sinteza *p*-kumaril-CoA, prekursora flavonoida omogućeno je aktivnošću 4CL enzima čija je razina transkripta gena povećana pri višim konc. soli. Enzimi CHS, CHI i F3H i F3'H važni su u putu biosinteze flavonoida. Ekspresija *CHS* gena i aktivnost CHS enzima blago je povećana u solnom stresu. Povećana razina transkripta gena za CHI kao i aktivnost enzima izmjerena je prilikom izlaganja solnom stresu, bez obzira na koncentraciju soli. Solni stres uzrokuje smanjenje razine ekspresije gena *F3H* a povećava značajno razinu transkripta *F3'H*. Razina ekspresije gena za FLS i ANS enzime, koji su dio biosintetskog puta flavanola, smanjena je prilikom izlaganja solnom stresu neovisno o koncentraciji aplicirane soli, dok je aktivnost FLS enzima bila inhibirana, aktivnost ANS enzima aktivirana je u uvjetima solnog stresa. Ovakvi rezultati potvrđuju činjenicu da razina ekspresije gena za određeni enzim i enzimatska aktivnost istog nisu nužno usklađeni jer u regulaciji ekspresije transkripta može sudjelovati više gena i neovisna je o enzimatskoj aktivnosti (Rivero i sur., 2016).

Fenilalanin-amonij liaza (PAL), cinamat 4-hidroksilaza (C4H) i *p*-kumaroil koenzim A ligaza (4CL) djeluju u prvom, drugom i trećem koraku fenilpropanoidnog biosintetskog puta. Sinteza *p*-kumaroil CoA iz fenilalanina poznata je kao opći biosintetski put fenilpropanoida (Cuong i sur., 2020). Ferulinska kiselina sintetizira se iz *p*-kumarske kiseline djelovanjem 4-hidroksicinamat 3-hidroksilaze (C3H) i kava kiselina 3-O-metiltransferaze (COMT). U sljedećim koracima dihidrokaempferol se sintetizira iz *p*-kumaroil CoA djelovanjem halkon sintaze (CHS), halkon izomeraze (CHI) i flavon 3-hidroksilaze (F3H). Zatim flavonoidna 3'-hidroksilaza (F3'H) katalizira sintezu dihidrokvercetin. Enzim flavonol sintaza (FLS) koristan je za pretvorbu dihidrokvercetin u kvercetin. Dihidroflavonol-4 reduktaza (DFR) katalizira pretvorbu dihidrokvercetin u leukocijanidin, a zatim se dalje pretvara u epikatehin (Cuong i sur., 2020).

Biosinteza fenola u stresnom okruženju regulirana je izmijenjenim aktivnostima različitih ključnih enzima fenolnih biosintetskih putova poput PAL (fenilalanin-amonij liaza) i CHS (halkon sintaza) (Cuong i sur., 2020). Klijanci pšenice izloženi su solnom stresu (50-200 mM NaCl) te je praćena razina ekspresije pojedinih gena fenilpropanoidnog biosintetskog puta. Solni stres (200 mM NaCl) uzrokovao je povećanu ekspresiju *PAL* i *CHS* gena. Pri aplikaciji soli od 50 mM NaCl došlo je do snažnog povećanja ekspresije *F3H*, *FLS* i *DFR* gena dok koncentracija soli od 100 i 200 mM uzrokuje smanjenje razine njihove ekspresije u odnosu na kontrolu. Također, razina ekspresije *COMT* gena značajno je smanjena pri koncentraciji soli od 200 mM. Također, utvrđeno je da je aktivnost enzima (PAL, C4H i C3H) također povećana prilikom izlaganja biljaka pamuka koncentracijama soli od 50 i 100 mM NaCl te to implicira moguću ulogu ovih enzima u toleranciji na solni stres (Aadil i sur., 2020.).

4.4. Funkcionalna istraživanja na mutantama uročnjaka (*A. thaliana*) u fenilpropanoidnom putu

Kao modelna biljka, uročnjak (*A. thaliana*) je pomogao u rasvjetljavanju mnogih detalja o fenilpropanoidnom putu, njegovim enzimima te međusobnoj povezanosti tog puta s biljnim metabolizmom u cjelini.

Uročnjak i drugi pripadnici Brassicaceae posebno su poznati po akumuliranju raznih estera sinapata, uključujući sinapoilkolin koji se nakuplja u sjemenkama i sinapoilmalat koji se nakuplja u lišću (Milkowski i sur., 2004). Promijene u ekspresiji gena fenilpropanoidnog puta rezultiraju smanjenjem razine sinapoilmalata u lišću. Ovo smanjenje, pak, dovodi do karakteristične crvene fluorescencije biljaka pod UV svjetlom, uslijed smanjenja fluorescencije sinapoilmalata i povećane fluorescencije klorofila koja se javlja kada fotosintetski aparat nije zaštićen od UV zračenja (Chapple i sur., 1992). Ovaj fenotip doveo je do brze izolacije fenilpropanoidnih mutanata i do identifikacije mnogih gena povezanih s metabolizmom fenilpropanoida (Stout i Chapple, 2004). Ovaj pristup, zajedno s biokemijskim pristupima kod drugih vrsta, dao je stajalište da su u mnogim slučajevima fenilpropanoidni geni članovi različitih genetskih obitelji te da njihova izolacija i karakterizacija može pružiti važne naznake o evoluciji enzima u sekundarnom metabolizmu biljaka.

Također, Soltanloo i sur., 2017 proveli su istraživanje utjecaja solnog stresa na rast *Arabidopsis* mutante (linija otporna na sol, 73-M4-30). Ta linija dobivena je gama zračenjem i ispitivana na toleranciju soli u poljoprivrednim ispitivanjima s obzirom na divlji tip. Studije su provedene u fazi klijanja kako bi se usporedio rast divljih i mutiranih linija pod solnim stresom. Nakon 4 dana od izlaganja različitim koncentracijama NaCl (0, 100, 200 i 300 mM) došlo je do inhibicije rasta korijena. Korijeni mutirane linije u usporedbi s divljim tipom bili su kraći u odsutnosti NaCl. Izlaganje solnom stresu dovelo je do inhibicije rasta korijena i mutanata i divljeg tipa. Ipak, inhibicija rasta bila je izraženija kod divljeg tipa u odnosu na mutante.

PAL kodira mala obitelj gena u biljkama s četiri člana u *A. thaliana*; PAL1 – PAL4 (Raes i sur., 2003). Veliki broj studija pokazao je da ekspresija PAL gena reagira na razne podražaje iz okoliša, uključujući infekciju patogenima, mehaničke ozljede, iscrpljivanje hranjivih tvari, UV zračenje, ekstremne temperature, suša, solni stres i sl. (Dixon i Paiva, 1995). Brojne studije također su koristile molekularne i genetske pristupe za manipulaciju PAL gena u svrhu funkcionalnih istraživanja te praćenja rasta i razvoja biljaka izloženih različitim stresnim podražajima iz okoliša.

Da bi se odredile biološke funkcije cijele obitelji gena *PAL*, Chen i sur., (2010) generirali su dva neovisna skupa pojedinačnih, dvostrukih, trostrukih i četverostrukih mutanata za četiri gena *PAL* kod *A. thaliana*. Njihova analiza ovih mutanata generirala je nove i važne informacije o raznim ulogama genetske porodice u rastu, razvoju biljaka i odgovorima na uvjete okoliša. Ispitali su utjecaj različitih koncentracija NaCl kao i utjecaj suše na rast *pal1 pal2* dvostrukih mutanata u odnosu na divlji tip. U tim istraživanjima nisu pronađene značajne razlike između divljeg tipa i dvostrukih mutanata u toleranciji na sol ili osmotski stres. Za ispitivanje tolerancije na sušu 7 tjedana stare *Arabidopsis* biljke prenesene su u komoru za rast s približno 50% vlažnosti. Biljke dvostrukih mutanata *pal1 pal2* bile su značajno manje od biljaka divljeg tipa

tijekom prva 3 tjedna nakon klijanja. Za test tolerancije na sušu odabrali su relativno stare biljke kako bi osigurali da su sve testirane biljke slične veličine i svježih mase. Biljke divljeg tipa pokazale su veliko uvenuće otprilike 2 tjedna nakon prestanka zalijevanja. Dvostruki mutanti *pal1 pal2* nakon 2 tjedna bili su svijetlozelene boje i pokazivali su vrlo malo uvenuće. Iz ovih rezultata se može zaključiti da su mutacije u PAL1 i PAL2 genima povećale toleranciju biljaka na stres suše.

UV-B zračenje sastavni je dio sunčeve svjetlosti i može nanijeti štetu genomu i fotosintetskom sustavu biljaka. Chen i sur., (2010) također su usporedili spomenute *pal1 pal2* dvostruke mutante s biljkama divljeg tipa zbog osjetljivosti na kratkotrajnu izloženost UV-B svjetlosti. Izlaganje biljaka divljeg tipa $1,24 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ UV-B svjetlosti tijekom 4 sata nije uzrokovalo očigledne ozljede ili folijarnu dehidraciju. Suprotno tome, kod dvostrukih mutantata *pal1 pal2* došlo je do uvenuća zbog folijarne dehidracije i nakon kratkotrajnog izlaganja UV-B svjetlu. Na temelju rezultata, zaključili su da mutacije prisutne u PAL1 i PAL2 uzrokuju povećanu osjetljivost na UV-B zračenje.

Na temelju rezultata mojih istraživanja i korištenih mutanata (**Tablica 3**) te prikaza na **Slici 47** i u **Tablici 17** možemo zaključiti da je kod svih mutanata uročnjaka, uključujući i WT Col-0, došlo do značajnog smanjenja rasta glavnog korijena prilikom izlaganja solnom stresu (150 mM NaCl). Kada se baziramo na razgranatost korijena također možemo vidjeti da je veća kod onih mutanti uročnjaka koje su rasle bez utjecaja solnog stresa i jedino kod *fah1-7* i *fah1-7, tt3-1* mutanata ta razlika nije statistički značajna. *COMT* je jedina mutanta kod koje solni stres uzrokuje povećani broj lateralnih korijena u odnosu na kontrolu. Svakako su potrebna dodatna istraživanja da bi se donijeli jednoznačni zaključci o ulozi pojedinih gena fenilpropanoidnog puta u solnom stresu.

5. ZAKLJUČCI

- ✓ Kratkoročni solni stres (24 h) ima negativan utjecaj na rast korijena i biomasu klijanaca u sva tri varijeteta kupusnjača ovisno o koncentraciji apliciranog NaCl (50-200 mM).
- ✓ Na temelju fizioloških i biokemijskih parametara utvrđeno je da su varijeteti vrste *B. oleracea* (bijeli kupus i raštika) tolerantniji u odnosu na vrstu *B. rapa* (kineski kupus).
- ✓ Izlaganjem solnom stresu klijanci i odrasle biljke u sve tri vrste kupusnjača pojačano akumuliraju ione Na⁺ uz nemogućnost održavanja fiziološkog K⁺/Na⁺ omjera u solnom stresu. Također, dolazi do promjena u sastavu nekih mikro i makro- elemenata. Te promjene su izraženije u osjetljivoj vrsti (*B. rapa*).
- ✓ Kao posljedica solnog stresa dolazi do povećane akumulacije ROS u tretiranim biljkama, te dolazi do povećanja sadržaja glutaciona i prolina.
- ✓ Tolerantnije vrste (raštika i bijeli kupus) uslijed stresa akumuliraju veće količine fenolnih spojeva (flavonoida, flavanola i fenolnih kiselina) u odnosu na osjetljivije.
- ✓ Od fenolnih kiselina, hidroksicimetne kiseline, posebno FA i SiA su značajnije prisutne u tolerantnijih vrsta u stresu tj. raštike i bijelog kupusa u odnosu na kineski kupus, dok se SA (hidroksibenzojeva kiselina) najznačajnije smanjuje u kineskom kupusu u odnosu na ostale.
- ✓ Pred-tretman kineskog kupusa, kao najosjetljivije vrste, sa SA i FA pokazali su jasan pozitivan učinak na biljke uslijed solnog stresa tj. poboljšana je fotosintetska učinkovitost, sadržaj pigmenata, antioksidacijska aktivnost itd.
- ✓ Solni stres utječe na fenilpropanoidni biosintetski put na razini ekspresije gena (npr. povećava razinu transkriptata PAL, COMT, CHI, F3'H) kao i aktivnosti enzima (npr. povećava aktivnost PAL, C4H, CHS) te posljedično uzrokuje promjene u akumulaciji polifenolnih spojeva.
- ✓ Funkcionalna istraživanja na mutantima uročnjaka koji imaju jednu ili više mutacija u genima fenilpropanoidnog biosintetskog puta pokazala su da svi mutanati uročnjaka, uključujući i divlji tip (WT Col-0), imaju značajno inhibiran rast glavnog korijena te broj i duljinu lateralnog korijenja prilikom izlaganja solnom stresu (150 mM NaCl). Jedini izuzetak je COMT mutant kod kojeg solni stres uzrokuje povećani broj lateralnih korijena u odnosu na kontrolu.

6. LITERATURA

- Aadil H N, Jha S, Parekh V, Rajkumar B K, Ramani H R, Kapadiya C, Singh D. 2020. Dissection of phenylpropanoid pathway during salt stress in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). IJCS, 8(1), 21-29. DOI: <https://doi.org/10.22271/chemi.2020.v8.i1a.8303>
- Abideen Z, Koyro H, Huchzermeyer B, Zaheer M A, Bilquees G, Khan A. 2014. Moderate salinity stimulates growth and photosynthesis of *Phragmites karka* by water relations and tissue specific ion regulation. Environmental and Experimental Botany, Volume 105: 70-76. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2014.04.009>
- Adem G D, Roy S J, Zhou M. 2014. Evaluating contribution of ionic, osmotic and oxidative stress components towards salinity tolerance in barley. BMC Plant Biol 14, 113. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-14-113>
- Agati G, Azzarello E, Pollastri S, Tattini M. 2012. Flavonoids as antioxidants in plants: Location and functional significance. Plant Science 196:67-76. DOI:10.1016/j.plantsci.2012.07.014
- Aghajanzadeh T, Hawkesford M J, De Kok L J. 2014. The significance of glucosinolates for sulfur storage in Brassicaceae seedlings. Frontiers in Plant Science, 5, 704. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00704>
- Ahmed N U, Park J, Jung H J. 2015. Anthocyanin biosynthesis for cold and freezing stress tolerance and desirable color in *Brassica rapa*. Funct Integr Genomics 15, 383–394. <https://doi.org/10.1007/s10142-014-0427-7>
- Alarcón-Flores M I, Romero-González R, Martínez Vidal J L, Garrido Frenich A. 2016. Multiclass determination of phenolic compounds in different varieties of tomato and lettuce by ultra high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. International Journal of Food Properties, 19(3), 494-507. <https://doi.org/10.1080/10942912.2014.978010>
- Almeida D M, Oliveira M M, Saibo N J. 2017. Regulation of Na⁺ and K⁺ homeostasis in plants: towards improved salt stress tolerance in crop plants. Genetics and molecular biology, 40(1), 326-345. <http://dx.doi.org/10.1590/1678-4685-gmb-2016-0106>
- Alonso J M, Stepanova A N, Leisse T J, Kim C J, Chen H, Shinn P, Gadriab C. 2003. Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. Science, 301(5633), 653-657. DOI: 10.1126/science.1086391
- Amirjani M. 2012. Estimation of wheat responses to "high" heat stress. American-Eurasian Journal of Sustainable Agriculture, 6(4): 222-233.
- Anson N M, van den Berg R, Havenaar R, Bast A, Haenen G R. 2009. Bioavailability of ferulic acid is determined by its bioaccessibility. Journal of Cereal Science, 49(2), 296-300. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2008.12.001>
- Armengaud P, Sulpice R, Miller A J, Stitt M, Amtmann A, Gibon Y. 2009. Multilevel analysis of primary metabolism provides new insights into the role of potassium nutrition for

- glycolysis and nitrogen assimilation in Arabidopsis roots. *Plant Physiology*, 150(2), 772-785. DOI: <https://doi.org/10.1104/pp.108.133629>
- Ashraf M, Rauf H. 2001. Inducing salt tolerance in maize (*Zea mays* L.) through seed priming with chloride salts: Growth and ion transport at early growth stages. *Acta Physiologiae Plantarum*, 23(4), 407-414
- Ashraf M, McNeilly T. 2004. Salinity tolerance in Brassica oilseeds. *Critical reviews in plant Sciences*, 23(2), 157-174. <https://doi.org/10.1080/07352680490433286>
- Ashraf M A, Ashraf M, Ali Q. 2010. Response of two genetically diverse wheat cultivars to salt stress at different growth stages: leaf lipid peroxidation and phenolic contents. *Pak J Bot*, 42(1), 559-565
- Austin S, Tavakoli M, Christi P, Seifert J, Mattarei A, De Stefani D, Zoratti M, Nowikovsky K. 2017. LETM1-Mediated K⁺ and Na⁺ Homeostasis Regulates Mitochondrial Ca²⁺ Efflux. *Front. Physiol.* <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00839>
- Ayaz F A, Hayirlioglu-Ayaz S, Alpay-Karaoglu S, Grúz J, Valentová K, Ulrichová J, Strnad M. 2008. Phenolic acid contents of kale (*Brassica oleraceae* L. var. *acephala* DC.) extracts and their antioxidant and antibacterial activities. *Food Chem.* 107, 19–25
- Bacchetti T, Tullii D, Masciangelo S, Gesuita R, Skrami E, Brugè F, Silvestri S, Orlando P, Tiano L, Ferretti G. 2014. Effect of black and red cabbage on plasma carotenoid levels, lipid profile and oxidized low density lipoprotein. *Journal of Functional Foods*, Volume 8:128-137. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.02.020>
- Bartwal A, Mall R, Lohani P, Guru S K, Sandeep A. 2012. Role of Secondary Metabolites and Brassinosteroids in Plant Defense Against Environmental Stresses. *J Plant Growth Regul* 32, 216–232. <https://doi.org/10.1007/s00344-012-9272>
- Benzie I F, Strain J J. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Analytical biochemistry*, 239(1), 70-76. <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292>
- Bhinu V-S, Ulrike A, Schäfer U A, Li R, Huang J, Hannoufa A. 2009. Targeted modulation of sinapine biosynthesis pathway for seed quality improvement in Brassica napus. *Transgenic Res.* 18, 31–44.
- Bistgani Z E, Hashemi M, DaCosta M, Craker L, Maggi F, Morshedloo M R. 2019. Effect of salinity stress on the physiological characteristics, phenolic compounds and antioxidant activity of *Thymus vulgaris* L. and *Thymus daenensis* Celak. *Industrial Crops and Products*, 135, 311-320. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.04.055>
- Blanco-Ulate B, Amrine K C, Collins T S, Rivero R M, Vicente A R, Morales-Cruz A, Ebeler S E. 2015. Developmental and metabolic plasticity of white-skinned grape berries in response to *Botrytis cinerea* during noble rot. *Plant physiology*, 169(4), 2422-2443. DOI: <https://doi.org/10.1104/pp.15.00852>

- Bordi A. 2010. The influence of salt stress on seed germination, growth and yield of canola cultivars. *Not Bot Hort Agrobot Cluj* 38:128–133
- Bottema S, Sarpaki. 2003. Environmental change in Crete: a 9000-year record of Holocene vegetation history and the effect of the Santorini eruption. *The Holocene*. <https://doi.org/10.1191/0959683603hl659rp>
- Brand-Williams W, Cuvelier M E, Berset C L W T. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food science and Technology*, 28(1), 25-30
- Brini F, Masmoudi K. 2012. Ion transporters and abiotic stress tolerance in plants. *ISRN molecular biology*, 2012. <https://doi.org/10.5402/2012/927436>
- Brkanac S R, Gerić M, Gajski G, Vujčić V, Garaj-Vrhovac V, Kremer D, Domijan A M. 2015. Toxicity and antioxidant capacity of *Frangula alnus* Mill. bark and its active component emodin. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 73(3), 923-929. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2015.09.025>
- Carillo P, Gibon Y. 2011. Protocol: extraction and determination of proline. PrometheusWiki
- Cartea M E, Francisco M, Soengas P, Velasco P. 2011. Phenolic Compounds in Brassica Vegetables. *Molecules*, Volumen 16:251-280. <https://doi.org/10.3390/molecules16010251>
- Cartea M E, Velasco P. 2008. Glucosinolates in *Brassica* foods: bioavailability in food and significance for human health. *Phytochem Rev* 7:213–229. DOI10.1007/s11101-007-9072-2
- Chakraborty K, Bose J, Shabala L, Eyles A, Shabala S. 2016. Evaluating relative contribution of osmotolerance and tissue tolerance mechanisms toward salinity stress tolerance in three Brassica species. *Physiologia Plantarum* 158: 135–151. doi:10.1111/ppl.12447
- Chapple C C S, Vogt T, Ellis B E, Somerville C R. 1992. An Arabidopsis mutant defective in the general phenylpropanoid pathway. *The Plant Cell*, 4(11), 1413-1424. DOI: <https://doi.org/10.1105/tpc.4.11.1413>
- Chaudhary A, Rampal G, Sharma U, Thind T S, Singh B, Vig A P, Arora S. 2012. Anticancer, antioxidant activities and GC-MS analysis of glucosinolates in two cultivars of broccoli. *Med Chem Drug Disc*, 2(2), 30-37.
- Chen L, Gnanaraj C, Arulselvan P, El-Seedie H, Teng H. 2019. A review on advanced microencapsulation technology to enhance bioavailability of phenolic compounds: Based on its activity in the treatment of Type 2 Diabetes. *Trends in Food Science & Technology*, Volume 85: 149-162. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.11.026>
- Cheng F, Wu J, Wang X. 2014. Genome triplication drove the diversification of *Brassica* plants. *Hortic Res* 1, 14024 <https://doi.org/10.1038/hortres.2014.24>
- Chutipaijit S., Cha-um S, Sompornpailin K, Luang K. 2012. An evaluation of water deficit tolerance screening in pigmented indica rice genotypes. *Pak. J. Bot.*, 44(1): 65-72

- Clarke D B. 2010. Glucosinolates, structures and analysis in food. *Analytical Methods*, 2(4), 310-325. DOI: 10.1039/B9AY00280D
- Cos P, Ying L, Calomme M, Hu JP, Cimanga K, Van Poel B, Pieters L, Vlietinck AJ, Vanden Berghe D. 1998. Structure-activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers. *J Nat Prod*. 61(1):71-6. doi: 10.1021/np970237h. PMID: 9461655.
- Crozier A, Jaganath B I, Clifford M N. 2006. *Plant Secondary Metabolites: Occurrence, structure and Role in the Human Diet*. Blackwell Publishing Ltd. DOI:10.1002/9780470988558
- Crozier A, Jaganath I, Clifford M N. 2007. Phenols, Polyphenols and Tannins: An Overview. In book: *Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure and Role in the Human Diet*. DOI: 10.1002/9780470988558.ch1
- Cuong D M, Kwon S J, Nguyen B V, Chun S W, Kim J K, Park S U. 2020. Effect of Salinity Stress on Phenylpropanoid Genes Expression and Related Gene Expression in Wheat Sprout. *Agronomy*, 10(3), 390
- Dai J, Mumper R J. 2010. Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties. *Molecules*, Volumen 15: 7313-7352. <https://doi.org/10.3390/molecules15107313>
- Dar M I, Naikoo M I, Rehman F, Naushin F, Khan F A. 2016. Proline accumulation in plants: roles in stress tolerance and plant development. In *Osmolytes and plants acclimation to changing environment: emerging omics technologies* (pp. 155-166). Springer, New Delhi. https://doi.org/10.1007/978-81-322-2616-1_9
- Davaritouchaee M, Hiscox W C, Martinez-Fernandez J, Fu X, Mancini R J, Chen S. 2019. Effect of reactive oxygen species on biomass structure in different oxidative processes. *Industrial Crops and Products*, 137, 484-494. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.05.063>
- Del Carmen Martínez-Ballesta M, Moreno D A, Carvajal M. 2013. The Physiological Importance of Glucosinolates on Plant Response to Abiotic Stress in Brassica. *Int. J. Mol. Sci.* 2013, 14, 11607-11625
- Demetriou G, Neonakia C, Navakoudis E, Kotzabasis K. 2007. Salt stress impact on the molecular structure and function of the photosynthetic apparatus—The protective role of polyamines. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics*, Volume 1767: 272-280. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2007.02.020>
- Dixon R A, Paiva N L. 1995. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *The plant cell*, 7(7), 1085. doi: 10.1105/tpc.7.7.1085
- Emebu P K, Anyika J U. 2011. Proximate and Mineral Composition of Kale (*Brassica oleracea*) Grown in Delta State, Nigeria. *Pakistan Journal of Nutrition*, Volujen 10: 190-194

- Esfandiari E, Shekari F, Shekari F, Esfandiari M. 2007. The effect of salt stress on antioxidant enzymes' activity and lipid peroxidation on the wheat seedling. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 35(1), 48.
- Falcinelli B, Sileoni V, Marconi O, Perretti G, Quinet M, Lutts S, Benincasa P. 2017. Germination under Moderate Salinity Increases Phenolic Content and Antioxidant Activity in Rapeseed (*Brassica napus* var *oleifera* Del.) Sprouts. *Molecules* 22, 1377
- Farhangi-Abriz S, Torabian S. 2017. Antioxidant enzyme and osmotic adjustment changes in bean seedlings as affected by biochar under salt stress. *Ecotoxicology and environmental safety*, 137, 64-70. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.11.029>
- Fichman Y, Gerdes S Y, Kovács H, Szabados L, Zilberstein A, Csonka L N. 2014. Evolution of proline biosynthesis: enzymology, bioinformatics, genetics, and transcriptional regulation. *Biol. Rev.* 90: 1065–1099. doi: 10.1111/brv.12146
- Francisco M, Tortosa M, Martínez-Ballesta M. del Carmen, Velasco P, García-Viguera C, Moreno D A. 2016. Nutritional and phytochemical value of Brassica crops from the agri-food perspective. *Annals of Applied Biology* ISSN 0003-4746. <https://doi.org/10.1111/aab.12318>
- Franke R, Hemm M R, Denault J W, Ruegger M O, Humphreys J M, Chapple C. 2002. Changes in secondary metabolism and deposition of an unusual lignin in the ref8 mutant of *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, Volumen 30: 47-59. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2002.01267.x>
- Fróna D, Szenderák J, Harangi-Rákos M. 2019. The Challenge of Feeding the World. *Sustainability*, 11(20), 5816. <https://doi.org/10.3390/su11205816>
- Gawlik-Dziki U. 2008. Effect of hydrothermal treatment on the antioxidant properties of broccoli (*Brassica oleracea* var. *botrytis italica*) florets. *Food Chemistry*, Volume 109: 393-401. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.12.058>
- Ghasemzadeh A, Ghasemzadeh N. 2011. Flavonoids and phenolic acids: Role and biochemical activity in plants and human. *Journal of Medicinal Plants Research*, Volumen 5: 6697- 6703. DOI: 10.5897/JMPR11.1404
- Gill S S, Tuteja N. 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant physiology and biochemistry*, 48(12), 909-930. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2010.08.016>
- Goleniowski M, Bonfill M, Cusido R, Palazón J. 2013. Phenolic acids. In *Natural Products*. Ramawat K G, Mérillon J M, Eds.; Springer: Berlin, Germany
- Grime J P. 1977. Evidence for the existence of three primary strategies in plants and its relevance to ecological and evolutionary theory. *The American Naturalist*, 111(982), 1169-1194

- Gruz J, Novák O, Strnad M. 2008. Rapid analysis of phenolic acids in beverages by UPLC–MS/MS. *Food chemistry*, 111(3), 789-794.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.05.014>
- Gupta P, De B. 2017. Differential responses of cell wall bound phenolic compounds in sensitive and tolerant varieties of rice in response to salinity. *Plant signaling & behavior*, 12(10), e1379643. <https://doi.org/10.1080/15592324.2017.1379643>
- Gutbrodt B, Dorn S, Unsicker S B, Mody K. 2012. Species-specific responses of herbivores to within-plant and environmentally mediated between-plant variability in plant chemistry. *Chemoecology* 22, 101–111
- Guzmán-Pérez V, Bumke-Vogt C, Schreiner M, Mewis I, Borchert A, Pfeiffer A F H. 2016. Benzylglucosinolate Derived Isothiocyanate from *Tropaeolum majus* Reduces Gluconeogenic Gene and Protein Expression in Human Cells. *PLoS ONE* 11(9): e0162397. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0162397>
- Hasanuzzaman M, Nahar K, Bhuiyan T F, Anee T I, Inafuku M, Oku H, Fujita M. 2017. Salicylic acid: an all-rounder in regulating abiotic stress responses in plants. *Phytohormones-Signaling Mechanisms and Crosstalk in plant development and stress responses*, 31-75.
- Heinze M, Hanschen F S, Wiesner-Reinhold M, Baldermann S, Gräfe J, Schreiner M, Neugart S. 2018. Effects of Developmental Stages and Reduced UVB and Low UV Conditions on Plant Secondary Metabolite Profiles in Pak Choi (*Brassica rapa* ssp. *chinensis*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 66: 1678-1692. DOI: 10.1021/acs.jafc.7b03996
- Hernández-Ruiz J, Arnao M B. 2018. Relationship of Melatonin and Salicylic Acid in Biotic/Abiotic Plant Stress Responses. *Agronomy* 8, no. 4: 33. <https://doi.org/10.3390/agronomy8040033>
- Hrncirik K, Valusek J, Velisek J. 2001. Investigation of ascorbigen as a breakdown product of glucobrassicin autolysis in *Brassica* vegetables. *Eur Food Res Technol* 212, 576–581
<https://doi.org/10.1007/s002170100291>
- Huang D, Ou B, Prior R L. 2005. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(6), 1841-1856.
<https://doi.org/10.1021/jf030723c>
- Huang J, Gu M, Lai Z, Fan B, Shi K, Zhou Y H, Chen Z. 2010. Functional analysis of the Arabidopsis *PAL* gene family in plant growth, development, and response to environmental stress. *Plant physiology*, 153(4), 1526-1538. DOI: <https://doi.org/10.1104/pp.110.157370>
- Hu W, Kawaoka A, Tsai C, Lung J, Osakabe K, Ebinuma H, Chiang V L. 1998. Compartmentalized expression of two structurally and functionally distinct 4-coumarate:CoA ligase genes in aspen (*Populus tremuloides*). *PNAS* 95 (9): 5407-5412.
<https://doi.org/10.1073/pnas.95.9.5407>

- Höglind M, Morten S, Semenov M A. 2013. Assessing uncertainties in impact of climate change on grass production in Northern Europe using ensembles of global climate models. *Agricultural and Forest Meteorology*, Volume 170: 103-113. <https://doi.org/10.1016/j.agrformet.2012.02.010>
- Ignat I, Volf I, Popa V I. 2011. A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chemistry* 126(4). DOI: 10.1016/j.foodchem.2010.12.026
- Iyengar E R R, Reddy M P. 1996. Photosynthesis in highly salt tolerant plants. *Handbook of photosynthesis*. Marshal Dekar, Baten Rose, USA, 909.
- Jahangir M, Abdel-Faridab B I, Hye Kyong K, Young Hae C, Verpoorte R. 2009. Healthy and unhealthy plants: The effect of stress on the metabolism of *Brassicaceae*. *Environmental and Experimental Botany*, Volume 67: 23-33. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2009.06.007>
- Jayakannan M, Bose J, Babourina O, Shabala S, Massart A, Poschenrieder C, Rengel,Z. 2015. The NPR1-dependent salicylic acid signalling pathway is pivotal for enhanced salt and oxidative stress tolerance in Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany*, 66(7), 1865- 1875. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru528>
- Jensen C R, Mogensen V, Mortensen G, Fieldsen J, Milford G, Andersen M, Thage J. 1996. Seed glucosinolate, oil and protein contents of field-grown rape (*Brasica napus* L.) affected by soil drying and evaporative demand. *Field Crops Res*, 47, 93–105
- Ji H, Pardo J M, Batelli G, Van Oostend M J., Bressan R A, Li X. 2013. The Salt Overly Sensitive (SOS) Pathway: Established and Emerging Roles. *Molecular Plant*, Volume 6: 275-286. <https://doi.org/10.1093/mp/sst017>
- Kalifa Y, Perlson E, Gilad A, Konrad Z, Scolnik P A, Bar-Zvi D. 2004. Over-expression of the water and salt stress-regulated Asr1 gene confers an increased salt tolerance. *Plant, cell & environment*, 27(12), 1459-1468. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2004.01251.x>
- Kapoor D, Singh S, Kumar V, Romero R, Prasad R, Singh J. 2019. Antioxidant enzymes regulation in plants in reference to reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS). *Plant Gene*, 19, 100182. <https://doi.org/10.1016/j.plgene.2019.100182>
- Karp A, Shield I. 2008. Bioenergy from plants and the sustainable yield challenge. *New Phytologist* 179: 15–32. doi: 10.1111/j.1469-8137.2008.02432.x
- Kaur H, Bhardwaj R D, Grewal S K. 2017. Mitigation of salinity-induced oxidative damage in wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings by exogenous application of phenolic acids. *Acta Physiol. Plant*, 39, 221–236
- Kazazić, S.P. 2004. Antioksidacijska i antiradikalska aktivnost flavonoida. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju*, 55 (4), 279-290. Preuzeto s <https://hrcak.srce.hr/257>

- Khan M A M, Ulrichs C H, Mewis I. 2011. Drought stress—Impact on glucosinolate profile and performance of phloem feeding cruciferous insects. *Acta Hort* 917, 111–117
- Khan M I R, Asgher M, Khan N A. 2014. Alleviation of salt-induced photosynthesis and growth inhibition by salicylic acid involves glycinebetaine and ethylene in mungbean (*Vigna radiata* L.). *Plant Physiology and Biochemistry*, 80, 67-74. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2014.03.026>
- Kikuzaki H, Hisamoto M, Hirose K, Akiyama K, Taniguchi H. 2002. Antioxidant properties of ferulic acid and its related compounds. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(7), 2161-2168. <https://doi.org/10.1021/jf011348w>
- Klopsch R, Witzela K, Börnerb A, Schreiner M, Hanschen F S. 2017. Metabolic profiling of glucosinolates and their hydrolysis products in a germplasm collection of *Brassica rapa* turnips. *Food Research International*, Volume 100: 392-403. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.04.016>
- Koch, M A, Lemmel C. 2019. Zahora, a new monotypic genus from tribe Brassiceae (*Brassicaceae*) endemic to the Moroccan Sahara. *PhytoKeys*, 135, 119–131. <https://doi.org/10.3897/phytokeys.135.46946>
- Kumar S, Pandey A K. 2013. Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview", *The Scientific World Journal*, vol. 2013, Article ID 162750, 16 pages. <https://doi.org/10.1155/2013/162750>
- Kumar N, Pruthi V. 2014. Potential applications of ferulic acid from natural sources. *Biotechnology Reports*, 4, 86-93. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2014.09.002>
- Kurth E, Cramer G R, Läuchli A, Epstein E. 1986. Effects of NaCl and CaCl₂ on Cell Enlargement and Cell Production in Cotton Roots. *Plant Physiology Dec* 1986, 82 (4) 1102-1106; DOI: 10.1104/pp.82.4.1102
- Lado J, Rodrigo M J, López-Climent M, Gómez-Cadenas A, Zacarías L. 2016. Implication of the antioxidant system in chilling injury tolerance in the red peel of grapefruit. *Postharvest Biology and Technology*, 111, 214-223. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2015.09.013>
- Lazarević B, Poljak M. 2019. *Fiziologija bilja*. ISBN 978-953-7878-99-3 (WEB)
- Li J, Ding Q, Wang F, Zhang Y. 2018. Genome-wide gene expression profiles in response to downy mildew in Chinese cabbage (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*). *Eur J Plant Pathol* 151, 861–873 (). <https://doi.org/10.1007/s10658-018-1427-6>
- Liang W, Ma X, Wan P, Liu L. 2018. Plant salt-tolerance mechanism: A review. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Volume 495: 286-291. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.11.043>
- Lichtenthaler H K, Buschmann C. 2001. Extraction of photosynthetic tissues: chlorophylls and carotenoids. *Current protocols in food analytical chemistry*, 1(1), F4-2

- Liu H, Carvalhais L C, Schenk P M, Dennis P G. 2018. Activation of the salicylic acid signalling pathway in wheat had no significant short-term impact on the diversity of root-associated microbiomes. *Pedobiologia*, Volume 70: 6-11. <https://doi.org/10.1016/j.pedobi.2018.08.001>
- Liu H, Chen Y, Hu T, Zhang S, Zhang Y, Zhao T, Yu H, Kang Y. 2016. The influence of light-emitting diodes on the phenolic compounds and antioxidant activities in pea sprouts. *Journal of Functional Foods*, Volume 25: 459-465. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2016.06.028>
- Lopez-Berenguer C, Martínez-Ballesta M D C, Moreno D A, Carvajal M, Garcia-Viguera C. 2009. Growing hardier crops for better health: salinity tolerance and the nutritional value of broccoli. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(2), 572-578. <https://doi.org/10.1021/jf802994p>
- Mageney V, Baldermann S, Albach D C. 2016. Intraspecific Variation in Carotenoids of *Brassica oleracea* var. *sabellica*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 64: 3251-3257. DOI: 10.1021/acs.jafc.6b00268
- Mahmoudi H, Kaddour R, Huang J, Nasri N, Olfa B, M'Rah S, Ouerghi, Z. 2011. Varied tolerance to NaCl salinity is related to biochemical changes in two contrasting lettuce genotypes. *Acta Physiologiae Plantarum*, 33(5), 1613-1622. DOI 10.1007/s11738-010-0696-2
- Malakar S. 2017. Bioactive food chemicals and gastrointestinal symptoms: a focus of salicylates. *Journal of Gastroenterology and Hepatology Foundation and John Wiley & Sons Australia, Ltd.* <https://doi.org/10.1111/jgh.13702>
- Manchanda G, Garg N. 2011. Alleviation of salt-induced ionic, osmotic and oxidative stresses in *Cajanus cajan* nodules by AM inoculation, *Plant Biosystems - An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*, 145:1, 88-97, DOI: 10.1080/11263504.2010.539851
- Martínez-Ballesta M, Moreno-Fernández D A, Castejón D, Ochando C, Morandini P A, Carvajal M. 2015. The impact of the absence of aliphatic glucosinolates on water transport under salt stress in *Arabidopsis thaliana*. *Frontiers in plant science*, 6, 524. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00524>
- Martínez-Sánchez A, Gil-Izquierdo A, Gil M I, Ferreres F. 2008. A Comparative Study of Flavonoid Compounds, Vitamin C, and Antioxidant Properties of Baby Leaf *Brassicaceae* Species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56: 2330-2340. DOI: 10.1021/jf072975+
- Martinez V, Mestre T C, Rubio F, Girones-Vilaplana A, Moreno D A, Mittler R, Rivero R M. 2016. Accumulation of flavonols over hydroxycinnamic acids favors oxidative damage protection under abiotic stress. *Frontiers in plant science*, 7, 838. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00838>

- Martinović N, Abramović H, Ulrih N P. 2019. Inhibition of copper-induced lipid peroxidation by sinapic acid and its derivatives in correlation to their effect on the membrane structural properties. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*, Volume 1861: 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2018.10.008>
- Matysik J, Alia Bhalu B, Mohanty P. 2002. Molecular mechanisms of quenching of reactive oxygen species by proline under stress in plants.-*Curr. Sci.* 82: 525-532
- Meinke D W, Cherry J M, Dean C, Rounsley S D, Koornneef M. 1998. *Arabidopsis thaliana*: A Model Plant for Genome Analysis. *American Association for the Advancement of Science*. Volumen 282: 662-682. DOI: 10.1126/science.282.5389.662
- Michalak A. 2006. Phenolic compounds and their antioxidant activity in plants growing under heavy metal stress. *Polish Journal of Environmental Studies* 15:523-530
- Milkowski C, Baumert A, Schmidt D, Nehlin L, Strack D. 2004. Molecular regulation of sinapate ester metabolism in *Brassica napus*: expression of genes, properties of the encoded proteins and correlation of enzyme activities with metabolite accumulation. *The Plant Journal*, 38(1), 80-92. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2004.02036.x>
- Minh L T, Khang D T, Ha P T T, Tuyen P T, Minh T N, Quan N V, Xuan T D. 2016. Effects of salinity stress on growth and phenolics of rice (*Oryza sativa* L.). *International Letters of Natural Sciences*, 57
- Mlinarić S, Čupić T, Popović S, Jurković V, Begović L, Cesar V, Lepeduš H. 2017. Photochemistry of thylakoid membranes in two peacultivars with different leaf colouration. *Theor. Exp. Plant Physiol.* 29: 13-24. DOI 10.1007/s40626-016-0082-6
- Mohammadi H, Ghorbanpour M, Brestic M. 2018. Exogenous putrescine changes redox regulations and essential oil constituents in field-grown *Thymus vulgaris* L. under well-watered and drought stress conditions. *Industrial Crops and Products*, 122, 119-132. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.05.064>
- Morinaga T. 1934. Interspecific hybridization in *Brassica*. *Cytologia*, 6(1), 62-67. <https://doi.org/10.1508/cytologia.6.62>
- Munns R, Gilliam M. 2015. Salinity tolerance of crops – what is the cost? *New Phytologist* 208: 668–673. doi: 10.1111/nph.13519
- Murashige T, Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*, 15(3), 473-497.
- Müller R, Morant M, Jarmer H, Nilsson L, Nielsen T H. 2007. Genome-Wide Analysis of the *Arabidopsis* Leaf Transcriptome Reveals Interaction of Phosphate and Sugar Metabolism. *Plant Physiology* Jan 2007, 143 (1) 156-171; DOI: 10.1104/pp.106.090167
- Neugart S, Baldermann S, Hanschen F S, Klopsch R, Wiesner-Reinhold M, Schreiner M. 2018. The intrinsic quality of brassicaceous vegetables: How secondary plant metabolites

- are affected by genetic, environmental, and agronomic factors. *Scientia Horticulturae*, 233, 460–478. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.12.038>
- Nićiforović N, Abramović H. 2014. Sinapic acid and its derivatives: Natural sources and bioactivity. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(1), 34–51. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12041>
- Nieves-Cordones M, Ródenas R, Lara A, Martínez V, Rubio F. 2018. The combination of K⁺ deficiency with other environmental stresses: What is the outcome? *Physiologia Plantarum* 165: 264–276. doi:10.1111/ppl.12827
- Oszmiański J, Kolniak-Ostek J, Wojdyło A. 2013. Application of ultra performance liquid chromatography photodiode detector-quadrupole/time of flight-mass spectrometry (UPLC-PDA-Q/TOF-MS) method for the characterization of phenolic compounds of *Lepidium sativum* L. sprouts. *Eur. Food Res. Technol.* 236, 699–706
- Pang Q, Guo J, Chen S, Chen Y, Zhang L, Fei M, Yan X. 2012. Effect of salt treatment on the glucosinolate-myrosinase system in *Thellungiella salsuginea*. *Plant and soil*, 355(1-2), 363-374. <https://doi.org/10.1007/s11104-011-1108-0>
- Parihar P, Singh S, Singh R, Singht P V, Prasad S M. 2015. Effect of salinity stress on plants and its tolerance strategies: a review. *Environ Sci Pollut Res* 22, 4056–4075. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3739-1>
- Pavlović I, Mlinarić S, Tarkowská D, Oklestkova J, Novák O, Lepeduš H, Vujčić Bok V, Radić Brkanac S, Strnad M, Salopek-Sondi B. 2019. Early Brassica crops responses to salinity stress: A comparative analysis between Chinese cabbage, white cabbage, and kale. *Frontiers in Plant Science*, 10, 450. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00450>
- Pessarakli M, Haghghi M, Sheibanirad A. 2015. Plant responses under environmental stress conditions. *Advances in plants & Agriculture research*, 2(6), 00073
- Piazzon A, Vrhovsek U, Masuero D, Mattivi F, Mandoj F, Nardini M. 2012. Antioxidant activity of phenolic acids and their metabolites: synthesis and antioxidant properties of the sulfate derivatives of ferulic and caffeic acids and of the acyl glucuronide of ferulic acid. *Journal of agricultural and food chemistry*, 60(50), 12312-12323. <https://doi.org/10.1021/jf304076z>
- Piotr S, Grazyna K. 2005. Antioxidant defense in the leaves of C3 and C4 plants under salinity stress. *Physiologia Plantarum* 125: 31–40. doi: 10.1111/j.1399-3054.2005.00534.x
- Prior R L, Wu X, Schaich K. 2005. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(10), 4290-4302. <https://doi.org/10.1021/jf0502698>
- Purty R S, Kumar G, Singla-Pareek S L. 2008. Towards salinity tolerance in Brassica: an overview. *Physiol Mol Biol Plants* 14, 39–49. <https://doi.org/10.1007/s12298-008-0004-4>

- Qu C, Fu F, Lu K, Zhang K, Wang R, Xu X, Li J. 2013. Differential accumulation of phenolic compounds and expression of related genes in black-and yellow-seeded *Brassica napus*. *Journal of experimental botany*, 64(10), 2885-2898. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert148>
- Raes J, Rohde A, Christensen J H, Van de Peer Y, Boerjan W. 2003. Genome-wide characterization of the lignification toolbox in Arabidopsis. *Plant physiology*, 133(3), 1051-1071. DOI: <https://doi.org/10.1104/pp.103.026484>
- Raiola A, Errico A, Petruk G, Monti D M, Barone A, Rigano M M. 2018. Bioactive Compounds in Brassicaceae Vegetables with a Role in the Prevention of Chronic Diseases. *Molecules* 2018, 23, 15
- Raza A, Razzaq A, Mehmood S S, Zou X, Zhang X, Lv Y, Xu J. 2019. Impact of Climate Change on Crops Adaptation and Strategies to Tackle Its Outcome: A Review. *Plants* 8, no. 2: 34. <https://doi.org/10.3390/plants8020034>
- Robbins R J. 2003. Phenolic Acids in Foods: An Overview of Analytical Methodology. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51 (10), 2866-2887. DOI: 10.1021/jf026182t
- Rodriguez-Delgado M A, Gonzalez-Hernandez G, Conde-Gonzalez J E, Perez-Trujillo J P. 2002. Principal component analysis of the polyphenol content in young red wines. *Food Chemistry*, 78, 523–532
- Saadia M, Jamil A, Akram N A, Ashraf M. 2012. A study of proline metabolism in canola (*Brassica napus* L.) seedlings under salt stress. *Molecules*, 17(5), 5803-5815. <https://doi.org/10.3390/molecules17055803>
- Sabra A, Daayf F, Renault S. 2012. Differential physiological and biochemical responses of three Echinacea species to salinity stress. *Scientia Horticulturae*, 135, 23-31. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2011.11.024>
- Saha P, Chatterjee P, Biswas A K. 2010. NaCl pretreatment alleviates salt stress by enhancement of antioxidant defense system and osmolyte accumulation in mungbean (*Vigna radiata* L. Wilczek). *Indian Journal of Experimental Biology*, Volume 48: 593-60
- Schmidt R, Bancroft I. 2011. *Genetics and Genomics of the Brassicaceae*. Springer, New York, NY. <https://doi.org/10.1007/978-1-4419-7118-0>
- Seddon J M, Umed M D, Ajani A, Sperduto R D. 1994. Dietary Carotenoids, Vitamins A, C, and E, and Advanced Age-Related Macular Degeneration. *JAMA* 272(18):1413-1420. doi:10.1001/jama.1994.03520180037032
- Sekmen H A, Ozgur R, Uzilday B, Turkan I. 2014. Reactive oxygen species scavenging capacities of cotton (*Gossypium hirsutum*) cultivars under combined drought and heat induced oxidative stress. *Environmental and Experimental Botany*, Volume 99: 141-149. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2013.11.010>

- Serrano R, Rodriguez-Navarro A. 2001. Ion homeostasis during salt stress in plants. *Current Opinion in Cell Biology*, Volume 13: 399-404. [https://doi.org/10.1016/S0955-0674\(00\)00227-1](https://doi.org/10.1016/S0955-0674(00)00227-1)
- Shanker A, Venkateswarlu B. 2011. *Abiotic stress in plants: mechanisms and adaptations*. BoD–Books on Demand
- Sharma A, Shahzad B, Rehman A, Bhardwaj R, Landi M, Zheng B. 2019. Response of phenylpropanoid pathway and the role of polyphenols in plants under abiotic stress. *Molecules*, 24(13), 2452. <https://doi.org/10.3390/molecules24132452>
- Sheahan J J, Rechnitz G A. 1993. Differential visualization of transparent testa mutants in *Arabidopsis thaliana*. *Analytical Chemistry*, 65(7), 961-963. <https://doi.org/10.1021/ac00055a022>
- Siringam K, Juntawon, N, Cha-um S, Kirdmanee C. 2011. Salt stress induced ion accumulation, ion homeostasis, membrane injury and sugar contents in salt-sensitive rice (*Oryza sativa* L. *spp. indica*) roots under isoosmotic conditions. *African Journal of Biotechnology*, 10(8), 1340-1346
- Sofa A, Scopa A, Nuzzaci M, Vitti A. 2015. Ascorbate peroxidase and catalase activities and their genetic regulation in plants subjected to drought and salinity stresses. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(6), 13561-13578. <https://doi.org/10.3390/ijms160613561>
- Song X., Li Y. Hou X. 2013. Genome-wide analysis of the AP2/ERF transcription factor superfamily in Chinese cabbage (*Brassica rapa ssp. pekinensis*). *BMC Genomics* 14, 573. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-573>
- Strasser R J, Tsimilli-Michael M., Srivastava A. 2004. Analysis of the Chlorophyll a Fluorescence Transient. In: Papageorgiou G.C., Govindjee (eds) *Chlorophyll a Fluorescence. Advances in Photosynthesis and Respiration*, Volume 19. Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-3218-9_12
- Stout J, Chapple C. 2004. Chapter three The phenylpropanoid pathway in arabidopsis: Lessons learned from mutants in sinapate ester biosynthesis. In *Recent Advances in Phytochemistry* (Vol. 38, pp. 39-67). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0079-9920\(04\)80004-2](https://doi.org/10.1016/S0079-9920(04)80004-2)
- Suzuki H., Reddy M S S, Naoumkina M, Naveed A, May G D, Huhman D V, Sumner L W, Blount J W, Mendes P, Dixon R A. 2005. Methyl jasmonate and yeast elicitor induce differential transcriptional and metabolic re-programming in cell suspension cultures of the model legume *Medicago truncatula*. *Planta* 220, 696–707. DOI:<https://doi.org/10.1007/s00425-004-1387-2>
- Swain T. 1980. The Importance of Flavonoids and Related Compounds in Fern Taxonomy and Ecology: An Overview of the Symposium. *Bulletin of the Torrey Botanical Club*, 107(2), 113-115. <http://www.jstor.org/stable/2484215>

- Szabolcs I. 1990. Impact of Climatic Change on Soil Attributes: Influence on salinization and alkalinization, Chapter 6. *Developments in Soil Science*, Volume 20: 61-69. [https://doi.org/10.1016/S0166-2481\(08\)70482-3](https://doi.org/10.1016/S0166-2481(08)70482-3)
- Šamec D, Bogović M, Vincek D, Martinčić J, Salopek-Sondi B. 2014. Assessing the authenticity of the white cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata* f. *alba*) cv. 'Varaždinski' by molecular and phytochemical markers. *Food research international*, 60, 266-272. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.07.015>
- Šamec D, Urlić B, Salopek-Sondi B. 2018. Kale (*Brassica oleracea* var. *acephala*) as a superfood: Review of the scientific evidence behind the statement. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, Volume 59: 2411-2422
- Tabibul Islam M, Bok-Rye L, Van Hien L, Hyo L, Woo-Jin J, Dong-Won B, Tae-Hwan K. 2019. *p*-Coumaric acid induces jasmonic acid-mediated phenolic accumulation and resistance to black rot disease in *Brassica napus*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, Volume 106: 270-275
- Tollenaere R, Hayward A, Dalton-Morgan J, Campbell E, Lee J R M, Lorenc M T, Manoli S, Stiller J, Raman R, Raman H, Edwards D, Batley J. 2012. Identification and characterization of candidate Rlm4 blackleg resistance genes in *Brassica napus* using next-generation sequencing. *Plant Biotechnology Journal*, Volume 10: 709–715. doi: 10.1111/j.1467-7652.2012.00716.
- Tomás-Barberán F A, Espín J C. 2001. Phenolic compounds and related enzymes as determinants of quality in fruits and vegetables. *J Sci Food Agric* 81:853-876. DOI: 10.1002/jsfa.885
- Traka M, Mithen R F. 2009. Health benefits of dietary plant natural products. In *Plant-derived Natural Products* (pp. 385-403). Springer, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-0-387-85498-4_18
- Triantaphylides C, Krischke M, Hoerberichts F A, Ksas B, Gresser G, Havaux, M, Mueller M J. 2008. Singlet oxygen is the major reactive oxygen species involved in photooxidative damage to plants. *Plant physiology*, 148(2), 960-968. DOI: <https://doi.org/10.1104/pp.108.125690>
- Tsao R, McCallum J. 2009. *Chemistry of Flavonoids*, Chapter 5. <https://doi.org/10.1002/9780813809397.ch5>
- Tuteja N, Sopory S K. 2008. Chemical signaling under abiotic stress environment in plants. *Plant signaling and behavior*, 3(8), 525-536. DOI: 10.4161/psb.3.8.6186
- Uma S, Prasad T G, Kumar M U. 1995. Genetic variability in recovery growth and synthesis of stress proteins in response to polyethylene glycol and salt stress in finger millet. *Annals of Botany*, 76(1), 43-49. <https://doi.org/10.1006/anbo.1995.1076>

- Vallejo F, Tomás-Barberán F A, García-Viguera C. 2002. Potential bioactive compounds in health promotion from broccoli cultivars grown in Spain. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82(11), 1293-1297. <https://doi.org/10.1002/jsfa.1183>
- Velasco P, Francisco M, Moreno D A, Ferreres F, García-Viguera C, Cartea M E. 2011. Phytochemical fingerprinting of vegetable *Brassica oleracea* and *Brassica napus* by simultaneous identification of glucosinolates and phenolics. *Phytochem. Anal.* 22, 144–152
- Verbruggen N, Hermans C. 2008. Proline accumulation in plants: a review. *Amino acids*, 35(4), 753-759. DOI 10.1007/s00726-008-0061-6
- Vincek D, Ernoić M. 2014. Poljoprivredno zemljište varaždinske županije – teret ili resurs? *Radovi Zavoda za znanstveni rad HAZU Varaždin*. UDK 338:631(497.523)
- Volden J, Bengtsson G B, Wicklund T. 2009. Glucosinolates, l-ascorbic acid, total phenols, anthocyanins, antioxidant capacities and colour in cauliflower (*Brassica oleracea* L. ssp. *botrytis*); effects of long-term freezer storage. *Food Chemistry*, Volume 112: 967-976. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.07.018>
- Wanasundara U N, Amarowicz R, Shahidi F. 1995. Partial characterization of natural antioxidants in canola meal. *Food Research International*, Volume 28: 525-530. [https://doi.org/10.1016/0963-9969\(96\)87362-5](https://doi.org/10.1016/0963-9969(96)87362-5)
- Wang, W, Vinocur B, Altman A. 2003. Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta* 218, 1–14. <https://doi.org/10.1007/s00425-003-1105-5>
- Warwick S I. 2011. Brassicaceae in Agriculture. *Genetics and Genomics of the Brassicaceae. Plant Genetics and Genomics: Crops and Models*, vol 9. Springer, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-7118-0_2
- Waśkiewicz A, Muzolf-Panek M, Goliński P. 2013. Phenolic content changes in plants under salt stress. In *Ecophysiology and responses of plants under salt stress* (pp. 283-314). Springer, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4747-4_11
- Yaghubi K, Ghaderi N, Vafaei Y, Javadi T. 2016. Potassium silicate alleviates deleterious effects of salinity on two strawberry cultivars grown under soilless pot culture. *Scientia Horticulturae*, 213, 87-95. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2016.10.012>
- Yang S L, Lan S S, Gong M. 2014. Hydrogen peroxide-induced proline and metabolic pathway of its accumulation in maize seedlings. *Journal of Plant Physiology*, Volume 166: 1694-1699. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2009.04.006>
- Yokota S. 2003. Relationship between salt tolerance and proline accumulation in Australian acacia species. *Journal of Forest Research*, 8(2), 89-93. <https://doi.org/10.1007/s103100300010>

- Yuan G, Wang X, Guo R, Wang Q. 2010. Effect of salt stress on phenolic compounds, glucosinolates, myrosinase and antioxidant activity in radish sprouts. *Food Chemistry*, 121(4), 1014-1019. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.01.040>
- Zagorchev L, Seal C E, Kranner I, Odjakova M. 2013. A central role for thiols in plant tolerance to abiotic stress. *International journal of molecular sciences*, 14(4), 7405-7432. <https://doi.org/10.3390/ijms14047405>
- Zhao Z, Moghadasian M H. 2008. Chemistry, natural sources, dietary intake and pharmacokinetic properties of ferulic acid: A review. *Food Chemistry*, 109(4), 691-702. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.02.039>
- Zhu J. 2001. Plant salt tolerance. *Trends in Plant Science*, Volume 6: 66-71. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(00\)01838-0](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(00)01838-0)
- Zietz M, Weckmüller A, Schmidt S, Rohn S, Schreiner M, Krumbein A, Kroh L W. 2010. Genotypic and Climatic Influence on the Antioxidant Activity of Flavonoids in Kale (*Brassica oleracea* var. *sabellica*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58: 2123-2130. DOI: 10.1021/jf9033909

7. SAŽETAK

Zadnjih nekoliko desetljeća sve su izraženije klimatske promjene koje uzrokuju smanjenje produktivnosti poljoprivrednih usjeva. Abiotski stres (povišeni salinitet, suša, visoke temperature i sl.) javlja se kod biljaka kao posljedica izlaganja tako nepovoljnim okolišnim utjecajima. Povećani salinitet tla je sve veći problem u mnogim područjima širom svijeta. Više od 7% ukupne svjetske površine tla i oko 20% navodnjavanih tala je pod utjecajem visokog saliniteta. Kupusnjače uključuju mnoge ekonomski važne vrste koje se uzgajaju širom svijeta. U suvremenoj poljoprivredi, solni stres pored suše i ekstremnih temperatura predstavlja glavni faktor koji ugrožava proizvodnju poljoprivrednih kultura uključujući i kulture iz porodice Brassicaceae. Navedeni problemi u kombinaciji s povećanjem svjetske populacije razlog su za sve većom potrebom istraživanja u smjeru selekcije poljoprivrednih kultura s povećanom tolerancijom na čimbenike abiotskog stresa. Iz tog razloga, provedena su istraživanja na odabranim kulturama iz porodice kupusnjača: kineskom kupusu (*Brassica rapa* L. ssp. *Pekinensis*), bijelom kupusu (*Brassica oleracea* var. *capitata* cv. 'Varaždinski') te raštici (*Brassica oleracea* var. *acephala*) u uvjetima solnog stresa (50, 100 i 200 mM NaCl). Kao modelni organizam korišten je uročnjak (*Arabidopsis thaliana*). Bijeli kupus (Varaždinski) i raštika su tradicionalne domaće sorte kupusnjača dok je kineski kupus komercijalna vrsta koja ima sekvencioniran genom pa su time olakšana molekularna istraživanja.

Detaljna karakterizacija odgovora tri navedena varijeteta kupusnjača na povećani salinitet provedena je na fiziološkoj, biokemijskoj i molekularnoj razini dok su funkcionalna istraživanja provedena na mutantama uročnjaka s mutacijom u jednom ili više gena fenilpropanoidnog biosintetskog puta. Na temelju rezultata testova inhibicije rasta korijena vidljivo je da je kineski kupus najosjetljivija vrsta, potom slijedi bijeli kupus i u konačnici raštika. Karakterizacija odgovora na povišeni salinitet navedenih vrsta kupusnjača provedena je u dvije razvojne faze: klijancima i odraslim hidroponski uzgojenim biljkama radi evaluacije odgovora različitih vegetativnih stadija. Solni stres prouzročio je akumulaciju ROS čestica čije je prisustvo potaknulo obrambene mehanizme kod biljaka na način da je došlo do promjene u antioksidacijskoj aktivnosti kao i porasta sadržaja Na⁺ iona. Također, kao posljedica osmotske komponente solnog stresa u biljkama je došlo do akumulacije prolina i smanjenja sposobnosti fotosintetskog sustava što je u konačnici i dovelo do inhibicije rasta i smanjenja biomase.

Specijalizirani metaboliti sudjeluju u odgovoru biljaka na stres i prilagodbi na povišeni salinitet. Detaljnom analizom stekli smo uvid njihove uloge u različito tolerantnih kupusnjača. Analiza specijaliziranih metabolita s posebnim naglaskom na fenolne kiseline provedena je UHPLC-MS/MS metodom te je time pružen uvid njihove uloge u odgovoru na solni stres. Ukupno je detektirano deset fenolnih kiselina (PA, pHBA, pCoA, SiA, FA, SA, GaA, CaA, VA i SyA). U odnosu na kontrolne klijanace sva tri varijeteta, najviši sadržaj ukupnih fenolnih kiselina prisutan je u raštici potom slijedi bijeli kupus te u konačnici kineski kupus a najzastupljenija fenolna kiselina u sve tri vrste je SiA. Također, raštika ima najvišu razinu ukupnih hidroksicimetnih kiselina a kineski kupus najmanju te se uslijed solnog stresa taj sadržaj povećava. Solni stres uzrokuje promjene u sadržaju fenolnih kiselina a te promijene koncentracije ovisne su o vrsti kupusnjača te o koncentraciji aplicirane soli.

Prilikom pojedinačne aplikacije SA, SiA i FA (u rasponu konc. 10-100 μM) kod biljaka kineskog kupusa uzgojenih hidroponski uočene su određene pozitivne promijene. Prvenstveno je došlo

do smanjenja sadržaja prolina u odnosu na solne tretmane, povećanja antioksidacijske aktivnosti i pojedinih grupa polifenolnih spojeva kao i povećanja sadržaja fotosintetskih pigmenata i fotosintetske učinkovitosti iz čega bi se moglo zaključiti da su te biljke pod manjim stresom u odnosu na one tretirane samo sa soli. Valja napomenuti da pozitivni učinci variraju te su ovisni o koncentraciji i tipu aplicirane fenolne kiseline.

Na temelju analize razine transkripata gena vidljivo je da solni stres utječe na razinu transkripcije gena i aktivnost enzima fenilpropanoidnog biosintetskog puta. Činjenica je da solni stres uzrokuje povećanje ili smanjenje ekspresije određenih gena kao i aktivaciju ili inhibiciju enzimske aktivnosti koja je prvenstveno ovisna o koncentraciji aplicirane soli. Također, važno je napomenuti da razina ekspresije gena za određeni enzim i njegova enzimatska aktivnost mogu i ne moraju biti usklađeni iz razloga što više gena može sudjelovati u regulaciji ekspresije transkripta.

Funkcionalna istraživanja provedena na mutantama uročnjaka koji imaju mutaciju u jednom ili više gena fenilpropanoidnog puta pokazala su značajno smanjenje rasta glavnog korijena prilikom izlaganja solnom stresu, uključujući i WT Col-0. Razgranatost korijena veća je kod kontrolnih uročnjaka (bez utjecaja solnog stresa). Od svih mutanata jedino u slučaju COMT mutanta solni stres uzrokuje povećani broj lateralnih korijena u odnosu na kontrolu.

8. SUMMARY

In the last few decades, climate change has become more pronounced, causing a decrease in the productivity of agricultural crops. Abiotic stresses (increased salinity, drought, high temperatures, etc.) occur in plants as a result of exposure to such adverse effects. Increased soil salinity is a growing problem in many areas around the world. More than 7% of the world's total soil area and about 20% of irrigated soils are affected by high salinity. Cabbages include economically important species that are grown around the world. In modern agriculture, salt stress, in addition to drought and extreme temperatures, is a major factor threatening the production of agricultural crops, including crops from the Brassicaceae family. These problems in combination with the increase of the world population are the reason for the need for research in terms of selection of agricultural crops with increased tolerance to abiotic stress factors. For this reason, research was conducted on selected crops from the Brassicaceae family: Chinese cabbage (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*), white cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata* cv. 'Varaždinski') and kale (*Brassica oleracea* var. *acephala*) in salt stress conditions (50, 100 and 200 mM NaCl). The *Arabidopsis thaliana* was used as a model organism. White cabbage (Varaždinski) and kale are traditional domestic varieties of cabbage, while chinese cabbage is a commercial species that has a sequenced genome, thus facilitating molecular research.

Detailed characterization of the responses of the three mentioned varieties of cabbage to increased salinity was performed at the physiological, biochemical, and molecular levels while functional studies were performed on *A. thaliana* mutants with a mutation in one or more genes of phenylpropanoid biosynthetic pathway. Based on the results of root growth inhibition tests, Chinese cabbage is the most sensitive species, followed by white cabbage and finally kale. Responses to increased salinity of these cabbage species were conducted in two developmental stages: seedlings and hydroponically grown plants to evaluate the responses of different vegetative stages. Salt stress caused the accumulation of ROS particles whose presence boosted defense mechanisms in plants, where they stimulate changes in antioxidant activity as well as an increase in Na⁺ ion content. Also, as a consequence of the osmotic component of salt stress in plants, the accumulation of proline and a decrease in the ability of the photosynthetic system is visible, which ultimately led to inhibition of growth and reduction of biomass.

Specialized metabolites participate in the response of plants to stressful conditions and adaptation to increased salinity. Through detailed analysis, we gained insight into their role in differently tolerant cabbages. Analysis of specialized metabolites with special emphasis on phenolic acids was performed by UHPLC-MS / MS method and thus provided insight into their role in response to salt stress. A total of ten phenolic acids (PA, pHBA, pCoA, SiA, FA, SA, GaA, CaA, VA and SyA) were detected. Compared to control seedlings of all three varieties, the highest content of total phenolic acids is present in kale followed by white cabbage and finally chinese cabbage and the most common phenolic acid in all three species is SiA. Also, kale has the highest level of total hydroxycinnamic acids and chinese cabbage the lowest, and due to salt stress, this content increases. Salt stress causes changes in the content of phenolic acids and these changes in concentration depending on the type of cabbage and the concentration of applied salt.

During the individual application of SA, SiA and FA (in the range of conc. 10-100 μ M) in Chinese cabbage plants grown hydroponically, certain positive changes were observed. Primarily there was a decrease in the content of proline compared to salt treatments, an increase in antioxidant activity and certain groups of polyphenolic compounds as well as an increase in the content of photosynthetic pigments and photosynthetic efficiency from which could be concluded that these plants are less stressed in comparison to those treated with salt only. It should be noted that the positive effects vary and are dependent on the concentration and type of applied phenolic acid.

Based on the analysis of the level of gene transcripts, it is evident that salt stress is affected to the level of gene transcription and enzyme activity of the phenylpropanoid biosynthetic pathway. The fact is that salt stress causes an increase or decrease in the expression of certain genes as well as the activation or inhibition of enzymatic activity that is primarily dependent on the concentration of the applied salt. Also, it is important to note that the level of gene expression for a particular enzyme and its enzymatic activity may or may not be matched because more genes may be involved in the regulation of transcript expression.

Functional studies performed on *A. thaliana* mutants which have a mutation in one or more genes of the phenylpropanoid pathway showed a significant reduction in major root growth upon exposure to salt stress, including WT Col-0. The branching of the roots is higher in control mutants (without the influence of salt stress). Of all the mutants, only in the case of the COMT mutant, salt stress causes an increased number of lateral roots compared to the control.

9. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 26.04.1987. godine u Rijeci. Po završetku srednjoškolskog obrazovanja u Medicinskoj školi u Rijeci 2007. godine upisala sam Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci, preddiplomski studij Sanitarne inženjerstvo te po završetku preddiplomskog studija upisala sam diplomski studij na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, smjer Molekularna biotehnologija i diplomirala u studenom 2012. godine. Tokom fakultetskog obrazovanja radila sam kao demonstrator na Zavodu za kemiju i biokemiju i Zavodu za fiziku i biofiziku gdje sam pomagala u izvođenju i organizaciji laboratorijskih vježbi studentima mlađih generacija kao i u pripremi referata i seminarskih radova. Na Medicinskom fakultetu Rijeka pri Zavodu za histologiju i embriologiju odradila sam stručno osposobljavanje te potom, kao suradnik na projektu, sudjelovala u istraživanju utjecaja citomegalovirusne (CMV) infekcije žutog tijela (corpora luteum-CL) jajnika na rani gubitak trudnoće. Također, radila sam kao stručni suradnik na Odsjeku za zajedničke analitičke tehnike NZZJZ PGŽ gdje sam provodila analize određivanje ostataka pesticida u hrani, određivanje aditiva (konzervansa, sladila, antioksidansa, bojila u hrani), određivanje poliaromatskih ugljikovodika u hrani i uzorcima okoliša te kloriranih spojeva u vodama. Sve analitičke metode provedene su instrumentalnim tehnikama spektrometrije i kromatografije koje su akreditirane prema zahtjevima norme HRN EN ISO/IEC 17025:2007.

Od studenog 2016. godine radim u statusu znanstvenog novaka/doktoranda na Institutu Ruđer Bošković u Laboratoriju za kemijsku biologiju pri Zavodu za molekularnu biologiju pod mentorstvom dr. sc. Branke Salopek Sondi. Odmah po stupanju u radni odnos upisujem Poslijediplomski interdisciplinarni sveučilišni doktorski studij Molekularne bioznanosti (modul: Biologija biljaka). Doktorski rad započela sam na HRZZ projektu "Fitohormoni u abiotskom stresu kupusnjača: mehanizam tolerancije i primjena (PhytoBraCRo)" (IP-2014-09-4359; 2015.-2019.) voditeljice dr. sc. Branke Salopek Sondi. Također, u sklopu Erasmus+ stipendije za stručnu praksu boravila sam u dva inozemna laboratorija: 2018. god. u Laboratory of Growth Regulators, Palacký University Olomouc & Institute of Experimental Botany AS CR, Češka, pod mentorstvom dr. Jiří Grúz gdje sam provela 3 mjeseca i usvojila UPLC-MS/MS metodu putem koje je provedena identifikacija i kvantifikacija pojedinačnih fenolnih kiselina; 2019-2020. u CEBAS-CSIC centru "El Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura", Murcia, Španjolska, pod mentorstvom prof.dr.sc. Rosa Maria Rivero Vargas gdje sam provela ukupno 7 mjeseci i usvojila različite metode iz područja molekularne biologije kao što su ukupna ekstrakcija RNA, gel elektroforeza, sinteza cDNA te biokemijski pristupi koji obuhvaćaju kvantifikaciju RNA, kvantifikaciju ekspresije gena pomoću qPCR metode, ekstrakciju i kvantifikaciju proteina te mjerenje enzimske aktivnosti.

Sudjelovala sam u popularizaciji znanosti u sklopu Otvorenih dana IRB ODI2017 "Biljne molekule: lijekovi iz prošlosti i čuvari zdravlja budućnosti" te sam članica Hrvatskog društva za biljnu biologiju. Sudjelovala sam na šest znanstvenih skupova te sam objavila znanstveni rad 2019. godine.

Izvorni znanstveni i pregledni radovi u CC časopisima:

Linić I, Šamec D, Grúz J, Vujčić Bok V, Strnad M, Salopek-Sondi B. 2019. Involvement of Phenolic Acids in Short-Term Adaptation to Salinity Stress is Species-Specific among Brassicaceae, Plants, June 2019, doi:10.3390/plants8060155

Sudjelovanja na kongresima:

1. Linić, Ida; Šamec, Dunja; Salopek-Sondi, Branka. Role of specialized metabolites in a short-term saline stress response of *Brassicaceae* seedlings // Book of Abstracts, XII Meeting of Young Chemical Engineers / Vrsaljko, Domagoj ; Dejanović, Igor ; Žižek, Krunoslav (ur.). Zagreb: Croatian Society of Chemical Engineers, 2018. page 169-169 (poster)

2. Linić, Ida; Pavlović, Iva; Šamec, Dunja; Vujčić, Valerija; Radić Brkanac, Sandra; Grúz Jiří; Salopek Sondi, Branka. The influence of increased salinity on the early stress response of Brassica seedlings // Natural resources green technology & sustainable development / GREEN3-Book of Abstracts / Radojčić Redovniković, Ivana i sur. (ur.). Zagreb: Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, 2018. page 167-167 (poster)

3. Linić, Ida; Šamec, Dunja; Vujčić-Bok, Valerija; Radić Brkanac, Sandra; Grúz Jiří; Salopek-Sondi, Branka. Response of the Brassicaceae seedlings on short-term salt stress and role of specialized metabolites // 7th SLOVENIAN SYMPOSIUM ON PLANT BIOLOGY with international participation / Baebler, Špela ; Dermastia, Marina ; Grebenc, Tine ; Tomaž, Špela ; Železnik, Peter (ur.). Ljubljana: Narodni in univerzitetni knjižnici v Ljubljani, 2018. page 50-50 (poster)

4. Vujčić Bok, Valerija; Radić Brkanac, Sandra; Pavlović, Iva; Linić, Ida; Salopek- Sondi, Branka. Biochemical response of *Arabidopsis thaliana* transgenic plants with a disturbed function of enzyme auxin amidohydrolase after salt stress exposure // Book of abstracts of the 13th Croatian biological congress / Kružić, Petar ; Caput Mihalić, Katarina ; Gottstein, Sanja ; Pavoković, Dubravko ; Kučinić, Mladen (ur.). Zagreb: Croatian Biological Society, 2018. page 215-216 (poster, international peerreview, abstract, scientific)

5. Šamec, Dunja; Linić, Ida; Gruz, Jiri; Salopek Sondi, Branka. Role of specialized metabolites in Brassica oleracea var. acephala abiotic stress response // Book of Abstracts- 3rd International Conference on Plant Biology and 22nd SPPS Meeting / Uzelac, Branka (ur.). Beograd, Srbija: Serbian Plant Physiology Society, Institute for Biological Research "Siniša Stanković", University of Belgrade Faculty of Biology, University of Belgrade, 2018. page 62-63 (poster, international peer-review, abstract, scientific)

6. Salopek-Sondi, Branka; Linić, Ida; Pavlović, Iva; Gruz, Jiri; Šamec, Dunja. How does abiotic stress influence a health-promoting phytochemicals in Brassica crops? // 10th CMAPSEEC: Book of Abstracts / Carović-Stanko, Klaudija ; Grdiša, Martina (ur.). Split: Novi Val d.o.o., 2018. page 85-85 (lecture, peer-review, abstract, scientific)

10. PRILOZI

Tablica 1. Sadržaj ukupnih fenola te grupa fenolnih spojeva (fenolnih kiselina, flavonoida, flavanola), te karotenoida i glukozinolata kod klijanaca kineskog kupusa, bijelog kupusa i raštike podvrgnutih solnom stresu u rasponu koncentracija od 0-200 mM NaCl. Rezultati su srednja vrijednost \pm SD (n=5), svijetlo siva boja predstavlja najmanje vrijednosti dok tamno zelena najviše vrijednosti. Provedena je statistička usporedba u svakoj koloni posebno, tj. za svaku grupu specijaliziranih metabolita gdje različita slova predstavljaju statistički značajne razlike u odnosu na svaki pojedini tretman i vrstu ($p < 0,05$).

	NaCl (mM)	Ukupni fenoli	Fenolne kiseline	Flavonoidi	Flavanoli	Glukozinolati	Karotenoidi
		mg GA/g s.m.	mg CAE/g s.m.	mg CE/g s.m.	mg CE/g s.m.	mg sinigrin/g s.m.	mg/g s.m.
Kineski kupus	0	14,55 \pm 1,19 ab	3,25 \pm 0,26 c	3,34 \pm 0,49 ab	0,16 \pm 0,01 d	71,87 \pm 3,30 f	0,12 \pm 0,01 d
	50	13,70 \pm 1,30 ab	3,10 \pm 0,48 c	3,23 \pm 0,37 abc	0,16 \pm 0,03 d	84,36 \pm 2,46 cde	0,14 \pm 0,005 abcd
	100	13,98 \pm 0,66 ab	2,70 \pm 0,53 c	2,58 \pm 0,29 bc	0,16 \pm 0,03 d	88,93 \pm 6,16 bc	0,17 \pm 0,02 abc
	200	13,06 \pm 1,17 b	2,30 \pm 0,26 c	2,41 \pm 0,23 c	0,18 \pm 0,01 d	94,72 \pm 4,38 b	0,13 \pm 0,02 cd
Bijeli kupus	0	14,29 \pm 0,54 ab	2,42 \pm 0,33 c	2,59 \pm 0,44 bc	0,25 \pm 0,02 bc	70,88 \pm 4,43 f	0,16 \pm 0,01 abcd
	50	14,52 \pm 1,01 ab	2,34 \pm 0,26 c	2,54 \pm 0,36 bc	0,24 \pm 0,02 bc	76,94 \pm 5,76 def	0,13 \pm 0,02 cd
	100	14,27 \pm 1,41 ab	2,25 \pm 0,31 c	3,02 \pm 0,50 abc	0,27 \pm 0,009 ab	85,09 \pm 8,91 bcd	0,15 \pm 0,02 abcd
	200	15,42 \pm 0,63 a	2,23 \pm 0,15 c	2,56 \pm 0,47 bc	0,27 \pm 0,003 ab	114,57 \pm 3,55 a	0,14 \pm 0,03 abcd
Raštika	0	13,79 \pm 0,65 ab	7,68 \pm 0,76 b	3,08 \pm 0,58 abc	0,22 \pm 0,004 c	68,32 \pm 1,04 f	0,17 \pm 0,03 abcd
	50	13,52 \pm 0,21 ab	9,31 \pm 1,27 a	3,25 \pm 0,33 abc	0,24 \pm 0,01 bc	71,36 \pm 3,82 f	0,19 \pm 0,03 a
	100	13,81 \pm 0,70 ab	9,78 \pm 1,08 a	3,86 \pm 0,51 a	0,27 \pm 0,005 ab	74,64 \pm 2,84 ef	0,19 \pm 0,003 ab
	200	13,36 \pm 0,87 b	7,53 \pm 0,41 b	3,12 \pm 0,42 abc	0,30 \pm 0,003 a	93,40 \pm 1,99 bc	0,14 \pm 0,01 bcd

Tablica 2. Odnosi Pearsonovih linearnih koeficijenata specijaliziranih metabolita (glukozinolati (GLUK), karotenoidi (KAR) i fenolni spojevi (ukupni fenoli (UK. FEN.), ukupni flavonoidi (FLAV.), ukupne fenolne kiseline (F. KIS.), ukupni flavonoli (UK. FLA.)) kod klijanaca kineskog kupusa (KK), bijelog kupusa (BK) i raštike (R) podvrgnutih solnom stresu u rasponu koncentracija od 0-200 mM NaCl.

Varijable	UK. FEN.	F. KIS.	FLAV.	UK. FLA.	GLUK.	KAR.
UK. FEN.	1	-0,459	-0,219	0,174	0,262	-0,255
F. KIS.	-0,459	1	0,724	0,367	-0,394	0,652
FLAV.	-0,219	0,724	1	0,146	-0,448	0,380
UK. FLA.	0,174	0,367	0,146	1	0,160	0,225
GLUK.	0,262	-0,394	-0,448	0,160	1	-0,314
KAR.	-0,255	0,652	0,380	0,225	-0,314	1

Tablica 3. Prikaz sadržaja slobodnih, konjugiranih i fenolnih kiselina vezanih za stanične stjenke izmjeren metodom UHPLC-MS/MS kod kineskog kupusa bijelog kupusa i raštike. Rezultati su srednja vrijednost \pm SD (n=5). Svijetlo siva boja predstavlja najmanje vrijednosti dok tamno zelena najviše vrijednosti. Provedena je statistička usporedba unutar pojedinog varijeteta za svaku pojedinu mjerenu komponentu gdje različita slova predstavljaju statistički značajne razlike u odnosu na svaki pojedini tretman ($p < 0,05$). Kratice: galna kiselina (GaA), protokatehinska kiselina (PA), 4-hidroksibenzojeva kiselina (*p*HBA), kava kiselina (CaA), vanilinska kiselina (VA), siringinska kiselina (SyA), 4-kumarinska kiselina (*p*CoA), sinapinska kiselina (SiA), ferulinska kiselina (FA) i salicilna kiselina (SA).

		Kineski kupus				Bijeli kupus				Raštika			
		Treatmani											
Komponenta (pmol/mg dw)		0 mM	50 mM	100 mM	200 mM	0 mM	50 mM	100 mM	200 mM	0 mM	50 mM	100 mM	200 mM
protokatehinska kiselina (PA)	S	9,45±	9,97±	10,02±	5,35±	18,33±	11,78±	11,46±	11,70±	2,61±	2,08±	2,47±	2,58±
		3,01a	0,66a	1,16a	1,85b	6,15a	4,96a	4,21a	4,14a	0,48a	0,63a	1,18a	1,60a
	K	69,68±	72,37±	74,61±	63,20±	155,46±	149,93±	148,82±	143,58±	134,31±	129,72±	128,16±	125,49±
		1,49ab	7,17ab	5,77a	5,50b	31,01a	3,26a	34,63a	36,55a	14,26a	11,93a	4,81a	12,57a
	VSZ	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	Uk.	79,13±	82,34±	84,63±	68,55±	173,79±	161,71±	160,28±	155,28±	136,92±	131,81±	130,63±	128,07±
4,17ab		8,03a	7,15a	7,45b	39,78 a	44,67 a	42,55 a	42,82 a	15,84a	13,81a	5,99a	12,73a	
galna kiselina (GA)	S	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
	K	65,49±	65,00±	64,13±	57,62±	124,03±	118,62±	124,81±	126,85±	118,66±	111,73±	107,32±	104,56±
		9,26a	10,34a	11,11a	9,65a	11,81a	9,89a	9,28a	15,24a	6,65a	19,38a	7,30a	13,73a
	VSZ	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
	Uk.	65,49±	65,00±	64,13±	57,62±	124,03±	118,62±	124,81±	126,85±	118,66±	111,73±	107,32±	104,56±
		9,26a	10,34a	11,11a	9,65a	11,81 a	9,89a	9,28a	15,24a	6,65a	19,38a	7,30a	13,73a

p-hidroksibenzojeva kiselina (p-HBA)	S	7,24±	12,22±	6,77±	10,11±	10,91±	8,96±	10,06±	13,08±	6,18±	5,96±	7,92±	8,24±	
		3,31a	3,29a	1,42a	4,35a	2,98a	2,11a	0,95a	5,76a	1,67a	0,34a	3,53a	3,17a	
	K	112,80±	120,58±	109,28±	119,38±	163,99±	170,94±	178,47±	182,81±	140,89±	134,89±	127,84±	139,51±	
		23,13a	6,49a	7,96a	11,29a	11,73a	14,42a	15,51a	16,37a	6,28a	3,32a	5,79a	11,58a	
	VSZ	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
	Uk.	120,03±	132,80±	116,05±	129,50±	174,89±	179,90±	188,54±	195,89±	147,07±	140,85±	135,76±	147,75±	
		29,46a	9,19a	9,52a	15,73a	16,07a	16,64a	17,71a	17,97a	8,58a	3,92a	9,82a	12,42a	
	vanilinska kiselina (VA)	S	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
K		291,96±	263,46±	248,10±	305,44±	142,38±	126,06±	135,85±	149,09±	153,14±	155,80±	141,84±	146,49±	
		37,30a	25,38a	33,25a	69,14a	26,87a	20,67a	13,34a	24,58a	14,22a	15,55a	5,46a	15,73a	
VSZ		ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
Uk.		291,96±	263,46±	248,10±	305,44±	142,38±	126,06±	135,85±	149,09±	153,14±	155,80±	141,84±	146,49±	
		37,30a	25,38a	33,25a	69,14a	26,87a	20,67a	13,34a	24,58a	14,22a	15,55a	5,46a	15,73a	
kava kiselina (CaA)		S	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
		K	34,19±	26,98±	25,76±	21,62±	51,30±	47,37±	47,55±	47,34±	149,61±	141,03±	124,15±	114,07±
	5,23a		1,93b	3,29b	1,79b	2,35a	7,79a	3,39a	3,84a	9,53a	10,98ab	10,93bc	14,78c	
	VSZ	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
	Uk.	34,19±	26,98±	25,76±	21,62±	51,30±	47,37±	47,55±	47,34±	149,61±	141,03±	124,15±	114,07±	
		5,23a	1,93b	3,29b	1,79b	2,35a	7,79a	3,39a	3,84a	9,53a	10,98ab	10,93bc	14,78c	

siringinska kiselina (SyA)	S	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	K	72,60±	68,48±	69,23±	72,08±	98,61±	98,98±	97,46±	97,63±	51,13±	51,13±	51,18±	53,28±
		10,41a	5,34a	8,66a	13,58a	11,01a	20,96a	13,57a	14,20a	4,86a	4,41a	3,73a	6,51a
	VSZ	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Uk.	72,60±	68,48±	69,23±	72,08±	98,61±	98,98±	97,46±	97,63±	51,13±	51,13±	51,18±	53,28±	
	10,41a	5,34a	8,66a	13,58a	11,01a	20,96a	13,57a	14,20a	4,86a	4,41a	3,73a	6,51a	
p- kumarinska kiselina (pCoA)	S	4,90±	6,20±	2,46±	3,12±	8,59±	5,43±	6,09±	5,30±	5,68±	3,11±	2,94±	3,23±
		2,92ab	1,19a	0,70b	0,95ab	3,24a	1,37a	1,63a	2,27a	2,41a	0,82a	1,48a	2,15a
	K	116,74±	86,67±	86,17±	73,20±	147,45±	161,25±	163,84±	173,81±	177,90±	119,80±	110,65±	81,52±
		30,51a	15,09ab	20,10ab	10,40b	32,86a	17,85a	22,88a	38,67a	20,78a	19,58b	12,85bc	8,01c
	VSZ	6,20±	4,85±	3,23±	3,47±	22,14±	23,03±	23,33±	26,46±	6,64±	4,82±	5,14±	6,10±
		3,11a	1,70a	0,64a	0,74a	8,95a	7,08a	6,42a	11,17a	2,35a	0,89a	1,39a	1,38a
	Uk.	127,84±	97,72±	91,86±	79,79±	178,18±	189,70±	193,26±	205,57±	189,08±	127,73±	118,15±	90,85±
		34,47a	15,96ab	23,06ab	11,04b	47,41a	22,79a	28,73a	45,73a	23,25a	23,28b	14,22bc	8,97c
Sinapinska kiselina (SiA)	S	180,29±	302,02±	153,78±	261,04±	162,06±	102,26±	147,12±	111,45±	115,01±	81,62±	178,18±	335,75±
		42,77ab	100,08a	36,94b	101,60ab	59,92a	36,36a	44,28a	28,05a	93,67a	14,93a	236,05a	221,43a
	K	4348,04±	4468,30±	4655,07±	4524,51±	5008,74±	5504,28±	5562,21±	5578,33±	6475,78±	6511,83±	6289,38±	6492,59±
		334,00a	112,11a	674,13a	522,53a	613,86a	1058,00a	1278,82a	1004,63a	575,80a	485,33a	260,04a	681,11a
	VSZ	306,55±	295,63±	257,14±	263,01±	636,51±	678,64±	666,02±	613,25±	483,09±	449,33±	427,39±	402,40±

		78,89a	107,36a	54,39a	84,34a	90,56a	119,39a	119,67a	128,86a	72,58a	77,03a	57,79a	91,84a
	Uk.	4834,88±	5065,95±	5065,99±	5048,56±	5807,30±	6285,18±	6375,35±	6303,03±	7073,88±	7042,78±	6894,94±	7230,73±
		290,75a	163,74a	728,55a	468,03a	677,05a	1136,82a	1373,16a	1123,34a	669,84a	588,29a	117,30a	620,73a
ferulinska kiselina (FA)	S	20,15±	18,12±	15,99±	18,33±	7,12±	4,54±	5,82±	4,47±	1,46±	1,32±	1,47±	6,41±
		5,92a	1,96a	4,05a	3,53a	4,00a	1,41a	1,32a	2,32a	1,07b	0,71b	0,75b	3,38a
	K	204,62±	211,87±	205,38±	187,82±	365,77±	368,83±	368,94±	378,25±	253,05±	237,43±	240,84±	261,17±
		10,90a	5,40a	29,09a	18,77a	58,68a	77,60a	63,52a	84,14a	22,47a	20,28a	15,96a	11,06a
	VSZ	28,25±	29,48±	23,96±	24,19±	99,14±	79,05±	77,82±	89,62±	30,04±	26,04±	31,34±	34,94±
		4,52a	8,75a	3,36a	3,25a	34,37a	27,59a	25,64a	27,38a	8,20a	3,46a	5,69a	8,60a
	Uk.	253,02±	259,47±	245,33±	230,34±	469,18±	451,51±	451,42±	471,44±	284,55±	264,80±	273,66±	302,53±
		14,59a	9,93	35,83a	21,64a	95,30a	108,24a	93,64a	118,46a	31,80a	24,00a	22,65a	17,81a
salicilna kiselina (SA)	S	80,23±	70,81±	62,43±	25,97±	47,00±	40,48±	36,59±	32,22±	27,08±	25,83±	20,02±	15,73±
		21,57a	21,17a	13,86a	2,08b	11,33 a	4,90a	10,05a	9,40a	3,36a	6,41ab	0,73bc	2,01c
	K	95,39±	77,29±	71,87±	36,48±	82,89±	79,94±	65,14±	58,75±	54,71±	50,22±	49,57±	43,47±
		25,08a	2,68a	9,72a	3,47b	14,84a	16,82a	8,00a	11,27a	3,44a	6,18a	6,17a	7,21a
	VSZ	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	Uk.	175,62±	148,10±	134,30±	62,45±	120,49±	120,42±	101,73±	90,97±	81,78±	76,05±	69,58±	59,21±
46,53a		42,60a	20,91a	4,49b	24,20a	24,12a	18,12a	22,07a	4,17a	10,45a	6,77ab	8,69b	

Tablica 4. Odnosi Pearsonovih linearnih koeficijenata ukupnih fenolnih kiselina izmjerenih metodom UHPLC-MS/MS kod klijanaca kineskog kupusa (KK), bijelog kupusa (BK) i raštike (R) podvrgnutih solnom stresu u rasponu koncentracija od 0-200 mM NaCl. Od ukupnih fenolnih kiselina detektirane su galna kiselina (GaA), protokatehinska kiselina (PA), 4-hidroksibenzojeva kiselina (4HBA), kava kiselina (CaA), vanilinska kiselina (VA), siringinska kiselina (SyA), 4-kumarinska kiselina (*p*CoA), sinapinska kiselina (SiA), ferulinska kiselina (FA) i salicilna kiselina (SA).

Varijable	PA	4 HBA	<i>p</i> CoA	SiA	FA	SA	GA	CaA	VA	SyA
PA	1	0,864	0,814	0,656	0,853	-0,262	0,973	0,341	-0,937	0,450
4 HBA	0,864	1	0,839	0,392	0,957	-0,177	0,825	-0,034	-0,716	0,725
<i>p</i> CoA	0,814	0,839	1	0,348	0,826	0,052	0,808	0,099	-0,653	0,605
SiA	0,656	0,392	0,348	1	0,231	-0,703	0,776	0,872	-0,847	-0,317
FA	0,853	0,957	0,826	0,231	1	0,028	0,759	-0,180	-0,660	0,836
SA	-0,262	-0,177	0,052	-0,703	0,028	1	-0,382	-0,601	0,428	0,359
GA	0,973	0,825	0,808	0,776	0,759	-0,382	1	0,498	-0,955	0,299
CaA	0,341	-0,034	0,099	0,872	-0,180	-0,601	0,498	1	-0,569	-0,670
VA	-0,937	-0,716	-0,653	-0,847	-0,660	0,428	-0,955	-0,569	1	-0,164
SyA	0,450	0,725	0,605	-0,317	0,836	0,359	0,299	-0,670	-0,164	1

Tablica 5. Odnosi Pearsonovih linearnih koeficijenata specijaliziranih metabolita (glukozinolati (GLUK), karotenoidi (KAR) i fenolni spojevi (ukupni fenoli (UK. FEN.), ukupni flavonoidi (FLAV.), ukupne fenolne kiseline (F. KIS.), ukupni flavonoli (UK. FLA.)) u **a**) listu i **b**) korijenu biljaka kineskog kupusa (KK), bijelog kupusa (BK) i raštike (R) podvrgnutih solnom stresu u rasponu koncentracija od 0-200 mM NaCl.

a

Varijable	UK. FEN.	F. KIS.	FLAV.	UK. FLA.	GLUK.	KAR.
UK. FEN.	1	0,398	0,311	0,164	0,074	0,447
F. KIS.	0,398	1	0,200	-0,239	-0,578	-0,144
FLAV.	0,311	0,200	1	0,347	-0,303	-0,408
UK. FLA.	0,164	-0,239	0,347	1	-0,173	0,267
GLUK.	0,074	-0,578	-0,303	-0,173	1	0,396
KAR.	0,447	-0,144	-0,408	0,267	0,396	1

b

Varijable	UK. FEN.	F. KIS.	FLAV.	UK. FLA.	GLUK.
UK. FEN.	1	-0,326	0,392	0,625	-0,386
F. KIS.	-0,326	1	-0,207	-0,597	0,469
FLAV.	0,392	-0,207	1	0,667	-0,204
UK. FLA.	0,625	-0,597	0,667	1	-0,444
GLUK.	-0,386	0,469	-0,204	-0,444	1

Tablica 6. Odnosi Pearsonovih linearnih koeficijenata slobodnih fenolnih kiselina izmjerenih metodom UHPLC-MS/MS u **a)** listu i **b)** korijenu biljaka kineskog kupusa (KK), bijelog kupusa (BK) i raštike (R) podvrgnutih solnom stresu u rasponu koncentracija od 0-200 mM NaCl. Od slobodnih fenolnih kiselina detektirane su protokatehinska kiselina (PA), klorogenska kiselina (ChA), 4-kumarinska kiselina (*p*CoA), sinapsinska kiselina (SiA), ferulinska kiselina (FA) i salicilna kiselina (SA).

a

Varijable	PA	ChA	<i>p</i> CoA	SiA	FA	SA
PA	1	0,215	-0,590	-0,597	-0,602	-0,042
ChA	0,215	1	-0,311	-0,291	-0,281	0,044
<i>p</i> CoA	-0,590	-0,311	1	0,984	0,975	-0,308
SiA	-0,597	-0,291	0,984	1	0,999	-0,333
FA	-0,602	-0,281	0,975	0,999	1	-0,332
SA	-0,042	0,044	-0,308	-0,333	-0,332	1

b

Variables	PA	ChA	<i>p</i> CoA	SiA	FA	SA
PA	1	0,217	-0,320	-0,365	-0,390	-0,375
ChA	0,217	1	0,372	-0,118	0,266	0,105
<i>p</i> CoA	-0,320	0,372	1	0,087	0,637	0,746
SiA	-0,365	-0,118	0,087	1	0,250	0,501
FA	-0,390	0,266	0,637	0,250	1	0,415
SA	-0,375	0,105	0,746	0,501	0,415	1