

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Sveučilište u Dubrovniku

Institut Ruđer Bošković

Poslijediplomski interdisciplinarni sveučilišni studij

Molekularne bioznanosti

Iva Pavlović

**ULOGA AUKSINA I HORMONA STRESA U ODGOVORU
KUPUSNJAČA (Brassicaceae) NA POVIŠENI SALINITET**

Doktorska disertacija

Osijek, 2017.

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Sveučilište u Dubrovniku

Institut Ruđer Bošković

Poslijediplomski interdisciplinarni sveučilišni studij

Molekularne bioznanosti

Iva Pavlović

**ULOGA AUKSINA I HORMONA STRESA U ODGOVORU
KUPUSNJAČA (Brassicaceae) NA POVIŠENI SALINITET**

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

Osijek, 2017.

Doktorska disertacija izrađena je u Laboratoriju za kemijsku biologiju Zavoda za molekularnu biologiju Instituta Ruđer Bošković pod vodstvom dr.sc. Branke Salopek Sondi. Laboratorijska istraživanja financirana su projektom MZOŠ "Molekularna regulacija biljnog razvitka" i HRZZ projektom "Fitohormoni u abiotskom stresu kupusnjača: mehanizmi tolerancije i primjena" voditeljice dr.sc. Branke Salopek Sondi.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

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

Doktorska disertacija

Znanstveno područje: Prirodne znanosti

Znanstveno polje: Biologija

ULOGA AUKSINA I HORMONA STRESA U ODGOVORU KUPUSNJAČA (Brassicaceae) NA POVIŠENI SALINITET

Iva Pavlović

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

Mentorica: dr.sc. Branka Salopek Sonđi, znanstveni savjetnik

Kratki sažetak doktorske disertacije:

Odgovor kineskog kupusa na kratkotrajni solni stres (24 h) istražen je na fiziološkoj, biokemijskoj, molekularnoj i hormonskoj razini. Uslijed solnog stresa inhibiran je rast korijena klijanaca, reducirana fotosintetska učinkovitost, povećana razina biokemijskih parametara stresa (GSH, fenolnih kiselina, prolina, Na⁺, ROS i peroksidacija lipida). Detektirane su značajne promjene u profilu hormona stresa: porast apscizinske kiseline i smanjenje jasmonata u listovima i korijenu, te sporadične promjene salicilne kiseline ovisno o biljnom tkivu. Uočene su značajne promjene u auksinskom metabolizmu, na razini IAA biosinteze, oksidacije i konjugacije. Povećane razine transkripata gena za auksin-amidohidrolaze IAR3 i ILR1 ukazuju na ulogu reverzibilne konjugacije u homeostazi auksina u stresu. Komparativne hormonske analize kineskog, bijelog kupusa i raštike pokazale su korelaciju između profila fitohormona i tolerancije vrste na solni stres; promjene u razinama hormona bile su izraženije kod osjetljivije vrste, kineskog kupusa, dok su tolerantnije vrste (bijeli kupus i raštika) pokazale određenu stabilnost u profilu hormona.

Broj stranica: 125

Broj slika: 41

Broj tablica: 15

Broj literaturnih navoda: 155

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: Brassicaceae, solni stres, hormoni stresa, auksini, tolerancija

Datum obrane: 09. 06. 2017.

Stručno povjerenstvo za obranu:

- 1. Izv. prof. dr. sc. Sandra Radić Brkanac**, izvanredna profesorica Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, predsjednik povjerenstva
- 2. Prof. dr. sc. Ivana Radojčić Redovniković**, redovita profesorica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, član
- 3. Prof. dr. sc. Vera Cesar**, redovita profesorica Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku Odjela za biologiju, član
- 4. Izv. prof. dr. sc. Mirta Tkalec**, izvanredna profesorica Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, zamjena člana

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

PhD thesis

Scientific Area: Natural Science

Scientific Field: Biology

PLANT STRESS RESPONSE OF Brassicaceae UPON INCREASED SALINITY: THE ROLE OF AUXIN AND STRESS HORMONES

Iva Pavlović

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

Supervisor: Branka Salopek Sondi, PhD, Senior Scientist

Short abstract:

The short term salt stress response (24 h) of Chinese cabbage was investigated at the physiological, biochemical, hormonal and molecular levels. The root growth inhibition, photosynthesis reduction, elevated levels of biochemical stress parameters (GSH, phenolic acids, prolin, Na⁺, ROS and lipid peroxidation) were measured upon salt stress. Significant changes in the profile of stress hormones were identified: an increase of ABA and decrease of jasmonates in the leaves and roots, as well as sporadic changes of SA dependent on plant tissue. Furthermore, significant perturbations in auxin metabolome was induced by salt stress, at the level of IAA biosynthesis as well as oxidation and conjugation. An increase in the transcript level of auxin amidohydrolases IAR3 and ILR1 was detected upon salt treatments, implicating the role of reversible conjugation in auxin homeostasis. Comparative hormonal analysis in Chinese cabbage, white cabbage and kale showed correlations between phytohormone profiles and salt stress tolerance; more tolerant varieties (white cabbage and kale) showed more stability in hormonal profiles in comparison to sensitive species (Chinese cabbage).

Number of pages: 125

Number of figures: 41

Number of tables: 15

Number of references: 155

Original in: Croatian

Key words: Brassicaceae, salt stress, stress hormones, auxins, tolerance

Date of the thesis defense: 09. 06. 2017.

Reviewers:

- 1. Sandra Radić Brkanac**, PhD, Associate Professor, Faculty of Science, University of Zagreb, commission president
- 2. Ivana Radojčić Redovniković**, PhD, Full Professor, Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, member
- 3. Vera Cesar**, PhD, Full Professor, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek Department of Biology, member
- 4. Mirta Tkalec**, PhD, Associate Professor, Faculty of Science, University of 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

Hvala mojoj mentorici dr. sc. Branki Salopek Sondi na ukazanom povjerenju i vodstvu tijekom izrade ovog rada. Hvala na svim savjetima te riječima ohrabrenja i podrške u trenucima kada je bilo teško.

Hvala članovima ispitnog povjerenstva izv. prof. dr. sc. Sandri Radić Brkanac, prof. dr.sc. Veri Cesar i prof. dr. sc. Ivani Radojčić Redovniković na čitanju disertacije, komentarima i sugestijama.

Hvala prof. dr. sc. Jutti Ludwig – Müller koja me uvela u područje analitike biljnih hormona.

Hvala dr. sc. Ondřeju Nováku i prof. dr. sc. Miroslavu Strnadu u čijem Laboratoriju sam napravila hormonske analize. Bila mi je izuzetna časti i zadovoljstvo učiti i raditi u njihovom okruženju. Hvala ujedno i kolegama iz Laboratorija koji su me prihvatili kao svog člana i učinili vrijeme provedeno daleko od kuće znatno lakšim.

Hvala izv. prof. dr. sc. Sandri Radić Brkanac i dr. sc. Valeriji Vujčić na pomoći oko biokemijskih analiza. Hvala prof. dr. sc. Hrvoju Lepedušu i dr. sc. Selmi Mlinarić na mjerenjima fotosinteze. Hvala kolegi Niki Bačiću na analizama kationa. Hvala kolegici dr. sc. Snježani Mihaljević na svim savjetima tijekom izrade ovog rada, ponajprije u području molekularne biologije.

Hvala Ani i Dunji na savjetima i podršci te svim zajednički trenucima koji su mi uljepšali vrijeme provedeno u Laboratoriju. Hvala i svim bivšim i sadašnjim članovima Laboratorija koji su doprinijeli stvaranju pozitivnog radnog ozračja.

Hvala mojim roditeljima, sestri, svekru i sverkvi, prijateljima te svim meni dragim ljudima koji su mi cijelo vrijeme ulijevali nadu u uspjeh.

Velika hvala mom suprugu Petru na iskrenoj ljubavi, razumijevanju i potpori. Njegove riječima i djela vedrila su sive dane i bili moja najveća snaga i pokretač. Bez njega ne bih uspjela.

Iva

POPIS KRATICA

AA	engl. <i>ascorbic acid</i> – askorbinska kiselina
ABA	engl. <i>abscisic acid</i> – abscizinska kiselina
ABTS	2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina)
ANT	engl. <i>anthranilate</i> – antranilat
ANOVA	engl. <i>analysis of variance</i> – analiza varijance
APX	engl. <i>ascorbate peroxidase</i> – askorbat-peroksidaza
BSA	engl. <i>bovine serum albumine</i> – albumin goveđeg seruma
CAT	engl. <i>catalase</i> – katalaza
DHAR	engl. <i>dehydroascorbate reductase</i> – dehidroaskorbat reduktaza
DNA	engl. <i>deoxyribonucleic acid</i> – deoksiribonukleinska kiselina
DNPH	dinitrofenil-hidrazin
EDTA	etilendiamintetraoctena kiselina
F_v/F_m	maksimalni prinos fluorescencije
GR	engl. <i>glutathione reductase</i> – glutation reduktaza
GSH	reducirani glutation
GSSG	oksidirani glutation
GPOX	engl. <i>guaiacol peroxidase</i> – gvajakol peroksidaza
IAA	engl. <i>indole-3-acetic acid</i> – indol-3-octena kiselina
IAA-Asp	engl. <i>indole-3-acetic acid-aspartate</i> – indol-3-acetil-L-aspartat
IAA-Glc	engl. <i>indole-3-acetyl-1-O-β-d-glucose</i> – indol-3-acetil-1-glukozil ester
IAA-Glu	engl. <i>indole-3-acetic acid-glutamate</i> – indol-3-acetil-L-glutamat
IAM	engl. <i>indole-3-acetamide</i> – indol-3-acetamid
IAN	engl. <i>indole-3-acetonitrile</i> – indol-3-acetonitril
IAOx	engl. <i>indole-3-acetaldoxime</i> – indol-3-aldoksim
ICP-MS	engl. high resolution inductively coupled plasma mass spectrometry
IPyA	engl. <i>indole-3-pyruvic acid</i> – indol-3-piruvatna kiselina
IS	interni standard
JA	engl. <i>jasmonic acid</i> – jasmonska kiselina
Ja-Ile	engl. <i>jasmonoyl-iso-leucine</i> – jasmonoil-izoleucin
MDA	malondialdehid
MDHAR	engl. <i>monodehydroascorbate reductase</i> – monodehidroaskorbat reduktaza
MS medij	Murashige i Skoog medij
NADPH	nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
OJIP	porast fluorescencije od O do P faze
oxIAA	engl. <i>2-oxoindole-3-acetic acid</i> – 2-oksoindol-3-octena kiselina
oxIAA-Glc	engl. <i>2-oxoindole-3-acetyl-1-O-β-d-glucose</i> – 2-oksoindol-3-acetil-1-glukozil ester
PI_{ABS}	indeks fotosintetske učinkovitosti
PHAs	engl. <i>phenolic acids</i> – fenolne kiseline

PSII	fotosustav II
qPCR	kvantitativna lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu
RNA	engl. <i>ribonucleic acid</i> – ribonukleinska kiselina
ROS	engl. <i>reactive oxygen species</i> – reaktivne kisikove čestice
SA	engl. <i>salicylic acid</i> – salicilna kiselina
s.m.	suha masa
SO	superoksidini radikal
SOD	engl. <i>superoxide dismutase</i> – superoksid dismutaza
SOS	eng. <i>Salt Overly Sensitive</i>
svj.m.	svježa masa
TBA	engl. <i>thiobarbituric acid</i> – tiobarbituratna kiselina
TRA	engl. tryptamine – triptamin
TRP, Trp	triptofan
TG	tetragvajakol
UPLC- MS/MS	eng. <i>Ultra Performance Liquid Chromatography – Tandem Electrospray Mass Spectrometry</i>
UHPLC-MS/MS	eng. <i>Ultra High Performance Liquid Chromatography – Tandem Electrospray Mass Spectrometry</i>
wt	divlji tip

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. PORODICA KUPUSNJAČA (Brassicaceae)	2
1.1.1. Modelni organizam biljne biologije – vrsta <i>Arabidopsis thaliana</i>	2
1.1.2. Vrste roda <i>Brassica</i>	3
1.2. POVIŠENI SALINITET TLA KAO ČIMBENIK ABIOTSKOG STRESA.....	6
1.3. MEHANIZMI ODGOVORA BILJAKA NA POVIŠENI SALINITET.....	7
1.3.1. Ionska i osmotska homeostaza	7
1.3.2. Oksidativni stres i antioksidacijski odgovor biljaka	9
1.3.3. Fotosinteza uslijed solnog stresa i biljni rast.....	12
1.3.4. Fitohormoni	13
1.4. AUKSINI	14
1.4.1. Biosinteza	14
1.4.2. Konjugacija i degradacija	15
1.5. HORMONI STRESA	18
1.5.1. Abscizinska kiselina.....	18
1.5.2. Jasmonska kiselina.....	18
1.5.3. Salicilna kiselina	19
1.6. CILJ I SVRHA ISTRAŽIVANJA.....	21
2. MATERIJALI I METODE	22
2.1. BILJNI MATERIJAL.....	22
2.1.1. Uzgoj klijanaca kupusnjača i solni tretmani	22
2.1.2. Uzgoj kupusnjača u hidroponskom sustavu i solni tretmani.....	23
2.1.3. Uzgoj uročnjaka (<i>Arabidopsis thaliana</i>) i solni tretmani	24
2.2. METODE MJERENJA FIZIOLOŠKIH POKAZATELJA ODGOVORA NA POVIŠENI SALINITET	25
2.2.1. ICP-MS analiza kationa	25
2.2.2. Određivanje fotosintetske učinkovitosti	25
2.2.3. Određivanje sadržaja prolina	25
2.3. METODE MJERENJA OKSIDATIVNOG STRESA I KOMPONENATA ANTIOKSIDACIJSKOG ODGOVORA.....	26
2.3.1. Određivanje reaktivnih kisikovih čestica i glutationa <i>in situ</i>	26
2.3.2. Ekstrakcija topljivih proteina i aktivnost antioksidacijskih enzima	27
2.3.3. Određivanje sadržaja glutationa	29
2.3.4. Određivanje sadržaja askorbinske kiseline	29
2.3.5. UPLC-MS/MS analiza fenolnih kiselina.....	30
2.3.6. Određivanje sadržaja malondialdehida.....	33
2.3.7. Određivanje sadržaja karbonila.....	34
2.4. ANALIZE FITOHORMONA	34

2.4.1. UHPLC-MS/MS analiza hormona stresa	34
2.4.2. UHPLC-MS/MS analiza auksinskog metaboloma	38
2.5. ANALIZE EKSPRESIJE GENA ZA AUKSIN-AMIDOHIDROLAZE	42
2.5.1. Izolacija ukupne RNA i cDNA sinteza	42
2.5.2. Izrada početnica za praćenje ekspresije gena	43
2.5.3. Kvantitativna lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu	43
2.5.3.1. Mjerenje efikasnosti reakcije qRT-PCR	43
2.5.3.2. Mjerenje ekspresije gena <i>Bra1AR3</i> , <i>Bra1LL2</i> i <i>Bra1LR1</i>	44
2.6. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA	45
3. REZULTATI	46
3.1. ODGOVOR KLIJANACA KINESKOG KUPUSA <i>B.rapa</i> NA POVIŠENI SALINITET.....	46
3.1.1. Fiziološki i biokemijski odgovor	46
3.1.1.1. Promjene u biomasi klijanaca, rastu korijena i fotosintetskoj učinkovitosti fotosustava II kotiledona	46
3.1.1.2. Sadržaj iona natrija i kalija i prolina	48
3.1.1.3. Određivanje reaktivnih kisikovih čestica i glutationa <i>in situ</i>	48
3.1.1.4. Antioksidacijski odgovor: aktivnost antioksidacijskih enzima	51
3.1.1.5. Antioksidacijski odgovor: sadržaj askorbinske kiseline i glutationa	52
3.1.1.6. Antioksidacijski odgovor: profil i sadržaj fenolnih kiselina	52
3.1.1.7. Pokazatelji oksidativnih oštećenja	55
3.1.2. Hormonski odgovor	55
3.1.2.1. Analiza hormona stresa	55
3.1.2.2. Analize auksina: indol-3-octene kiseline i indolskih spojeva uključenih u proces homeostaze auksina	57
3.2. ODGOVOR BILJAKA KINESKOG KUPUSA (<i>B.rapa</i>) NA POVIŠENI SALINITET	59
3.2.1. Fiziološki i biokemijski odgovor	59
3.2.1.1. Fotosintetska učinkovitost fotosustava II	59
3.2.1.2. Sadržaj natrijevih i kalijevih iona i osmolita prolina	60
3.2.1.3. Antioksidacijski odgovor: aktivnost antioksidacijskih enzima	62
3.2.1.4. Antioksidacijski odgovor: sadržaj askorbinske kiseline i glutationa	63
3.2.1.5. Antioksidacijski odgovor: profil i sadržaj fenolnih kiselina	64
3.2.1.6. Pokazatelji oksidativnih oštećenja: sadržaj malondialdehida i karbonila ..	69
3.2.2. Hormonski odgovor: hormoni stresa i auksini	69
3.2.3. Molekularni odgovor: ekspresija gena za auksin-amidohidrolaze.....	70
3.3. KOMPARACIJA ODGOVORA KUPUSNJAČA: KINESKOG KUPUSA (<i>B. rapa</i>), BIJELOG KUPUSA (<i>B. oleracea</i> var. <i>capitata</i>) I RAŠTIKE (<i>B. oleracea</i> var. <i>acephala</i>) NA POVIŠENI SALINITET	71
3.3.1. Inhibicija rasta korijena klijanaca	71
3.3.2. Analize hormona stresa	72
3.3.3. Analize indolskih spojeva uključenih u biosintezu i metabolizam auksina	78

3.4. FUNKCIONALNA ISTRAŽIVANJA NA UROČNJAKU (<i>Arabidopsis thaliana</i>) USLIJED POVIŠENOG SALINITETA	84
3.4.1. Inhibicija rasta korijena	84
3.4.2. Analize hormona stresa	86
3.4.3. Analize indolskih spojeva uključenih u biosintezu i metabolizam auksina	87
4. RASPRAVA	89
4.1. TEST INHIBICIJE RASTA KORIJENA KLIJANACA KAO POKAZATELJ TOLERANCIJE KUPUSNJAČA NA SALINITET	89
4.2. FIZIOLOŠKI I BIOKEMIJSKI POKAZATELJI SOLNOG STRESA KOD KINESKOG KUPUSA....	90
4.3. ULOGA HORMONA U ODGOVORU KUPUSNJAČA NA POVIŠENI SALINITET	95
4.3.1. Uloga apscizinske, salicilne i jasmonske kiseline u moduliranju odgovora.....	95
4.3.2. Auksinski metabolom uslijed solnog stresa	98
4.4. ULOGA AUKSIN-AMIDOHIDROLAZA U SOLNOM STRESU	100
5. ZAKLJUČCI.....	103
6. LITERATURA.....	104
7. SAŽETAK	113
8. SUMMARY	115
9. PRILOZI	117
10. ŽIVOTOPIS	123

1. UVOD

Biljne vrste iz porodice kupusnjača (Brassicaceae) predstavljaju važne povrtne kulture čija je proizvodnja široko rasprostranjena u cijelom svijetu. Prema podacima organizacije FAO proizvodnja kupusnjača u ukupnoj svjetskoj proizvodnji povrća iznosi 8.2%, a obuhvaća vrste poput kineskog kupusa, bijelog kupusa, kelja, brokule i sl. U Hrvatskoj proizvodnja kupusnjača čini 15% ukupne proizvodnje povrća (FAO 2014). Prinosi povrtnih kultura ovise o okolišnim čimbenicima.

U posljednjih nekoliko desetljeća okolišne promjene poput ekstremnih temperatura, suše ili povišenog saliniteta tla imaju za posljedicu značajno smanjenje prinosa poljoprivrednih usjeva čak do 50% (Qin i sur. 2011). Kako bi opstale u takvim uvjetima, biljke su razvile složene mehanizme prepoznavanja signala iz okoliša i odgovarajuće prilagodbe. Najčešće, usporavaju rast i metabolizam ne bi li povećale mogućnost preživljenja te aktiviraju obrambene mehanizme koji imaju za funkciju eliminaciju posljedica prisutnosti stresora. Mehanizmi odgovora biljaka na nepovoljne okolišne uvjete obuhvaćaju prilagodbu fotosinteze, aktivaciju sustava uključenih u obranu od oksidativnog stresa poput antioksidacijskih enzima, prolina, glutaciona, askorbinske kiseline i akumulaciju fitokemikalija s antioksidacijskom aktivnošću iz skupine polifenola (Fahad i sur. 2015). Također, veoma važnu ulogu u regulaciji rasta i razvoja te prilagodbi na stresne uvjete imaju i fitohormoni. Kompleksne mreže međusobnih interakcija hormona stresa salicilne (SA), apscizinske (ABA) i jasmonske kiseline (JA) te hormona rasta auksina moduliraju fiziološke procese u biljci i čine liniju obrane (Kohli i sur. 2013).

Auksini, među njima najznačajnija indol-3-octena kiselina (IAA), su jedni od najvažnijih biljnih hormona koji kontroliraju većinu fizioloških procesa te omogućavaju normalan rast i razvitak biljnog organizma. Posljednjih godina istraživanja upućuju na činjenicu da auksini, osim u regulaciji biljnog rasta, sudjeluju u adaptivnom odgovoru na stres stupajući u interakcije s hormonima stresa poput salicilne, apscizinske i jasmonske kiseline. Kompleksna mreža njihovih međusobnih interakcija još uvijek predstavlja nepoznanicu (Kohli i sur. 2013). Također, pretpostavlja se da auksini zajedno sa reaktivnim kisikovim česticama (ROS), glutationom i askorbatom doprinose regulaciji redoks signalnih procesa koji omogućavaju razvoj u skladu s okolišnim uvjetima (Tognetti i sur. 2012, Zheng i sur. 2015). Razumijevanje ovih mehanizama predstavlja važno oruđe u borbi protiv nepovoljnih klimatskih utjecaja i traganju za tolerantnijim biljnim vrstama.

1.1. PORODICA KUPUSNJAČA (Brassicaceae)

Porodica kupusnjača (Brassicaceae) također zvane i krstašice (Cruciferae) obuhvaća brojne vrste komercijalnog značaja čija primjena je prisutna stoljećima u stočnoj ishrani i ljudskoj prehrani u obliku svježeg, konzerviranog i procesiranog povrća, a pojedine vrste služe za proizvodnju biljnih ulja. Porodica kupusnjača je monofilogenska skupina koja broji 338 poznatih rodova te oko 3709 biljnih vrsta rasprostranjenih po cijelom svijetu osim Antartike (Al-Shehbaz i sur. 2006). Pretpostavljena starost porodice iznosi oko 37 milijuna godina, a potječe s iransko-turanskog prostora od kuda je rasprostranjena po lokalitetima diljem svijeta. Biološka varijabilnost kupusnjača je bogata što čini njihovu sistematiku i taksonomiju kompleksnom, kontroverznom i upitnom (Franzke i sur. 2011). Područja s visokom stopom biološke raznolikosti obuhvaćaju europski mediteranski pojas, središnju i zapadnu Aziju te zapadnu i sjevernu Ameriku (Al-Shehbaz 2011). U razrješavanju kompleksnih taksonomskih odnosa između vrsta unutar porodice kupusnjača od velike pomoći može biti i nedavno razvijena baza podataka BrassiBase (<http://brassibase.cos.uni-heidelberg.de>) (Kiefer i sur. 2014) koja se kontinuirano ažurira, a sadržava podatke o taksonomiji, sistematici, filogenetici i citogenetici vrsta iz porodice kupusnjača. Jedan od najznačajnijih predstavnika porodice kupusnjača je modelni organizam biljne biologije uročnjak (*Arabidopsis thaliana*) dok vrste roda *Brassica* imaju važan komercijalni značaj.

1.1.1. Modelni organizam biljne biologije – vrsta *Arabidopsis thaliana*

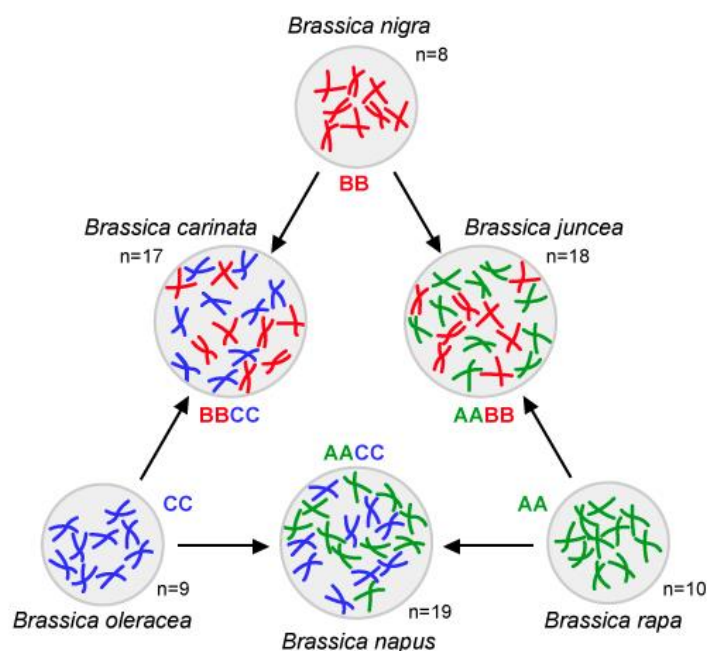
Uročnjak (*Arabidopsis thaliana*) najistraživaniji je organizam biljne biologije iz porodice kupusnjača. Osamdesetih godina prošlog stoljeća javila se potreba znanstvene zajednice za jedinstvenim modelom koji bi integrirao klasične discipline biljne biologije s tehnikama molekularne biologije i genetike. Razvojem tehnika transformacije kao izbor nametnula se biljka iz skupine korova, uročnjak (*Arabidopsis thaliana*) radi malog genoma pogodnog za molekularne analize. Genom Arabidopsisa organiziran je u 5 kromosoma, veličine je oko 120 Mb i posjeduje oko 20000 gena. Projekt sekvenciranja genoma započeo je 1996. g. i uspješno je okončan 2000. g., te je *Arabidopsis* i danas standardna referenca biljne biologije (Koornneef i Meinke 2010).

Arabidopsis je odobran kao modelni organizam i radi niza pogodnih eksperimentalnih karakteristika kao što su kratko generacijsko vrijeme, samooplodnost, proizvodnja velikog broja sjemenki te veličina biljke radi koje zahtjevi uzgoja nisu veliki. Uročnjak je niska samooplodna biljka visine 15 do 20 cm u punoj zrelosti koja je sposobna proizvesti stotinjak mahuna koje sadržavaju preko 5000 sjemenki. Cvjetovi uročnjaka dugački su oko 2 mm, sjemenke 0,5 mm, a rozeta odrasle biljke 2-10 cm u promjeru ovisno o uvjetima rasta. Korijen biljke jednostavne je strukture pogodan za proučavanje u kulturi i ne zahtijeva simbiotske odnose s bakterijama koje fiksiraju dušik. Uzgoj Arabidopsisa moguć je u zemlji te u Perijevim zdjelicama u laboratorijskim uvjetima.

Zrele sjemenke *Arabidopsis* pogodan su materijal za kemijsku mutagenezu. Također, *Arabidopsis* je pogodan model za tehnike insercijske mutageneze transformacijom pomoću agrobakterije *Agrobacterium tumefaciens*. Insercijska mutageneza postala je rutinska laboratorijska tehnika koja omogućava transformacije biljaka i generiranje tisuće transgenih linija kroz T-DNA insercije u genomu. U eksperimentima mutageneze najčešće korišteni ekotipovi *Arabidopsis* su Columbia (Col), Landsberg erecta (Ler) i Wassilewskija (Ws-1) pogodni za transformacije radi svojstva ranog cvjetanja. Do danas je poznato preko tisuću mutanti *Arabidopsis* koje su disfunkcionalne u svakom pogledu biljnog rasta i razvoja, a veliki broj njih dostupan je pohranjen u znanstvenim centrima sjemena (Meinke 1998).

1.1.2. Vrste roda *Brassica*

Jedan od najvažniji rodova porodice kupusnjača je rod *Brassica* koji sadržava poljoprivredno važne kultivare poput repice, gorušice, kupusa i brokule koji imaju dugu tradiciju kultivacije u ljudskoj povijesti. Tome svjedoče i zapisi na sanskrtu koji navode uporabu kupusnjača roda *Brassica* čak 3000 g. pr. Kr, a neki podatci upućuju da su predci kultivara *Brassica* rasli uzduž europskog obalnog pojasa čak prije 8000 godina (Al-Shehbaz 2011). Podrijetlo šest najvažnijih *Brassica* vrsta (*B. oleracea*, *B. rapa*, *B. napus*, *B. nigra*, *B. carinata* i *B. juncea*) moguće je objasniti teorijom U trokuta (U 1935) prikazanom na Slici 1. Genomi navedenih vrsta mogu se podijeliti na tri glavna genoma (A, B i C) koji su organizirani kao diploidi (AA, BB i CC) i alotetraploidi (AABB, AACC i BBCC). Genomi A i C su slični što je potvrđeno sekvenciranjem (Liu i sur. 2014) dok se genom B značajno razlikuje. Diploidni genomi tri vrste: genom A (*B. rapa*, AA, $2n = 20$), genom B (*B. nigra*, BB, $2n = 16$) i genom C (*B. oleracea*, CC, $2n = 18$) postoje zasebno, no budući da su usko povezani podrijetlom moguće je njihovo međusobno križanje. Prirodnom hibridizacijom između diploidnih vrsta razvile su se digenomske alotetraploidne vrste: *B. napus* (AACC, $2n = 38$), *B. carinata* (BBCC, $2n = 34$) i *B. juncea* (AABB, $2n = 36$).



Slika 1. Odnosi među vrstama roda *Brassica* prema teoriji U trokuta (1935) (preuzeto <https://masters.agron.iastate.edu/classes/527/lesson09/detail/brassica.html>).

Vrsta *Brassica oleracea* jedna je od važnijih vrsta kupusnjača koja uključuje velik broj povrtnih kultivara poput kelja, brokule, prokulice, cvjetače, različitih tipova glavatog kupusa te kupusa koji ne formiraju glave poput raštike. Kultivare *B. oleracea* na temelju njihove morfologije i razvojnih oblika moguće je podijeliti na sedam glavnih skupina: *Brassica oleracea* grupa Capitata (varijeteti glavatog kupusa), *Brassica oleracea* grupa Acephala (lisnati ili stočni kelj, raštika), *Brassica oleracea* grupa Alboglabra (kineska brokula), *Brassica oleracea* grupa Botrytis (cvjetača, zelena cvjetača), *Brassica oleracea* grupa Italica (brokula), *Brassica oleracea* grupa Gemmifera (kelj pupčar) i *Brassica oleracea* grupa Gongylodes (korabica) (Rakow 2004).

Tradicionalno prisutna biljna vrsta u Hrvatskoj je raštika (*Brassica oleracea* var. *acephala*) koja pripada Acephala grupi. Raštika nije komercijalna vrsta već se uzgaja u domaćinstvima i reproducira sjemenom vlastitog uzgoja što je razlog velike biološke varijabilnosti. Bogata je slobodnim šećerima, organskim kiselinama, lipidima i mineralima. Uzgoj raštike karakterističan je za otoke i šire obalno područje istočne strane Jadranskog mora te Bosnu i Hercegovinu i Crnu Goru. Raštike s ovih područja bile su uključene u projekt prikupljanja, morfološke karakterizacije i regeneracije lokalnih ekopopulacija raštike u svrhu očuvanja i zaštite starih sorti povrća (Matotan 2007, Batelja i sur. 2009). Pripadnici Acephala grupe morfološki su najbliži divljim predcima vrste koji nisu posjedovali svojstvo formiranja listova u glavu. Neki od postojećih dokaza upućuju na podrijetlo divljih predaka s prostora istočnog Mediterana i obale Baltičkog mora od kojih su se razvili današnji moderni varijeteti glavatog kupusa (Balkaya i sur. 2005). S obzirom na lokalitete rasta, divlji predci Acephala grupe posjeduju toleranciju na visoke temperature, sušu i salinitet, a neki od njih i danas rastu na jadranskoj obali kao stenoendemi poput *Brassica botterii* Vis., *B. cazzae* Ginzb. et

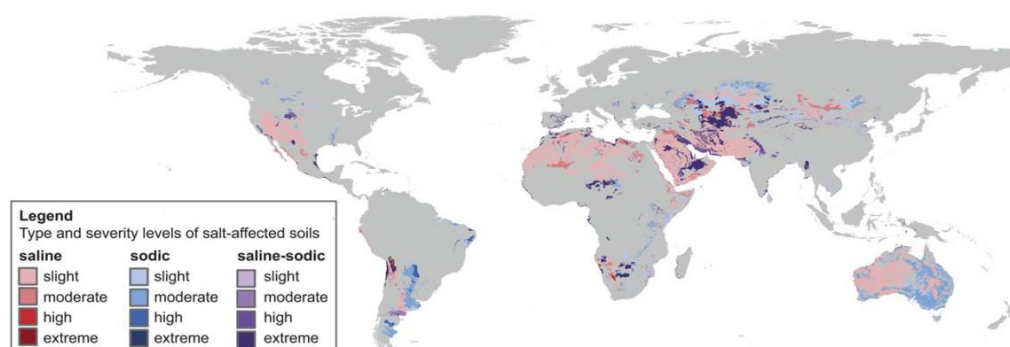
Teyber i *B. mollis* Vis. (Jasprica 2015). Upravo su varijeteti raštike najbližiji izvornoj vrsti divljeg kupusa i najstariji uzgojni oblik kupusa koje su zadržale svojstva tolerancije na suhu klimu, a dobro podnose i hladnoću. Varijeteti glavatog kelja i kupusa nastali su naknadno uslijed promjena poput skraćivanja članka stabljike i internodija te savijanja listova oko kratke stabljike (Vincek i sur. 2012).

Bijeli tj. glavati kupus (*Brassica oleracea* var. *capitata*) najzastupljeniji je kultivar kupusnjača u poljoprivednoj proizvodnji Republike Hrvatske te se godišnje proizvede oko 35000 tona tog povrća. Glavna proizvodna područja su Varaždina, Podravina, područje Ogulina, Sinsko polje, Ravni Kotari, područje Neretve odnosno Zagrebačka, Zadarska i Splitsko-dalmatinska županija (Vincek i sur. 2012). Bijeli kupus je povrće koje obiluje nutrijentima i fitokemikalijama koje promoviraju ljudsko zdravlje među kojima je moguće izdvojiti glukozinolate kao skupinu specijaliziranih metabolita karakterističnih za porodicu Brassicaceae, zatim polifenole, karotenoide i vitamine. Zastupljen je u kulinarstvu širom svijeta kao svježije povrće, a tradicija kiseljenja pruža bogat izvor vitamina C u zimskim mjesecima (Šamec i sur. 2017).

Osim povrća vrste *B. oleracea* često konzumirane kupusnjače su varijeteti vrste *Brassica rapa*. Vrsta *Brassica rapa* obuhvaća repe, uljane i krmne repice, kineski kupus i Pak-Choi kupus. Pretpostavlja se da *B. rapa* L. (sinonim s *B. campestris* L.) potječe s visoravni Sredozemnog mora odakle se proširila na sjever Skandinavije te zemlje zapadne i istočne Europe, a u Kinu je stigla preko zapadne Azije ili Mongolije kao poljoprivredna vrsta (Rakow 2004). Danas, lisnati kultivari vrste *B. rapa* poput kineskog kupusa (*B. rapa* subsp. *pekinensis*) i Bok-Choy ili Pak-Choi kupusa (*B. rapa* subsp. *chinensis*) se uzgajaju kao povrće prvenstveno u Kini. Također, bitno je spomenuti da je kineski kupus (*B. rapa* subsp. *pekinensis*) prva komercijalno važna kupusnjača čiji je genom sekvenciran i njegova veličine iznosi oko 516 Mbp (Wang i sur. 2011).

1.2. POVIŠENI SALINITET TLA KAO ČIMBENIK ABIOTSKOG STRESA

Povišeni salinitet tla jedan je od glavnih izvora abiotskog stresa koji reducira prinose kultura u poljoprivrednoj proizvodnji. Iznimno je izražen u područjima s malom količinom padalina, a uslijed prisutnih klimatskih promjena predstavlja sve veći problem i izazov. Salinizacija tla posljedica je prirodnog procesa (tzv. primarna salinizacija) ili rezultat ljudske aktivnosti (tzv. sekundarna salinizacija). Primarna salinizacija nastaje procesom otapanja minerala iz stijena, sedimenata i tla u vodi. Čest izvor salinizacije je i taloženje soli iz mora i oceana uslijed isparavanja u obalnim područjima kao i miješanje morske vode s podzemnim vodama uslijed prevelike eksploatacije voda što remeti vodni režim. Sekundarna salinizacija nastaje kao posljedica novodnjavanja obradivih površina zasoljenom vodom i/ili učestalom primjenom gnojiva (Diacono i Montemurro 2015). Slana tla definiraju se kao tla s povećanom koncentracijom topljivih soli (prvenstveno NaCl), a alkalna tla nastaju uslijed povećane prisutnosti Na^+ iz alkalnih soli (FAO 2017). Procijenjuje se da je trenutno oko 6% ukupne svjetske površine te oko 20% poljoprivrednih navodnjavanih površina pogođeno problemom povišenog saliniteta (Munns i Gilliam 2015).



Slika 2. Područja pogođena salinitetom (Wicke i sur. 2011).

Ekonomski gubitak koji se javlja za uzgajivače i poljoprivrednike kao posljedica poljoprivredne aktivnosti na zasoljenim tlima i time smanjenih prinosa je značajan i zabrinjavajući. Ekonomski gubitci razlikuju se između zemalja te uvelike ovise o troškovima poljoprivredne proizvodnje naspram dobiti koju proizvođač može ostvariti u godini s prosječnom količinom padlina. Primjerice redukcijom prinosa biomase za 1/3 u odnosu na prinos na nezasoljenom tlu iste površine, poljoprivrednik ostvaruje konačnu dobit u visini 1/3 uloženi troškova dok je dobit kod nereduciranog prinosa jednaka iznosu uloženi sredstava. Kao jedno od potencijalnih rješenja u minimiziranju utjecaja saliniteta na globalnu stopu produkcije hrane je istraživanje ili evaluiranje postojećih varijeteta (kultivara) te oplemenjivanje i uzgoj novih tolerantnijih varijeteta/vrsta (Munns i Gilliam 2015).

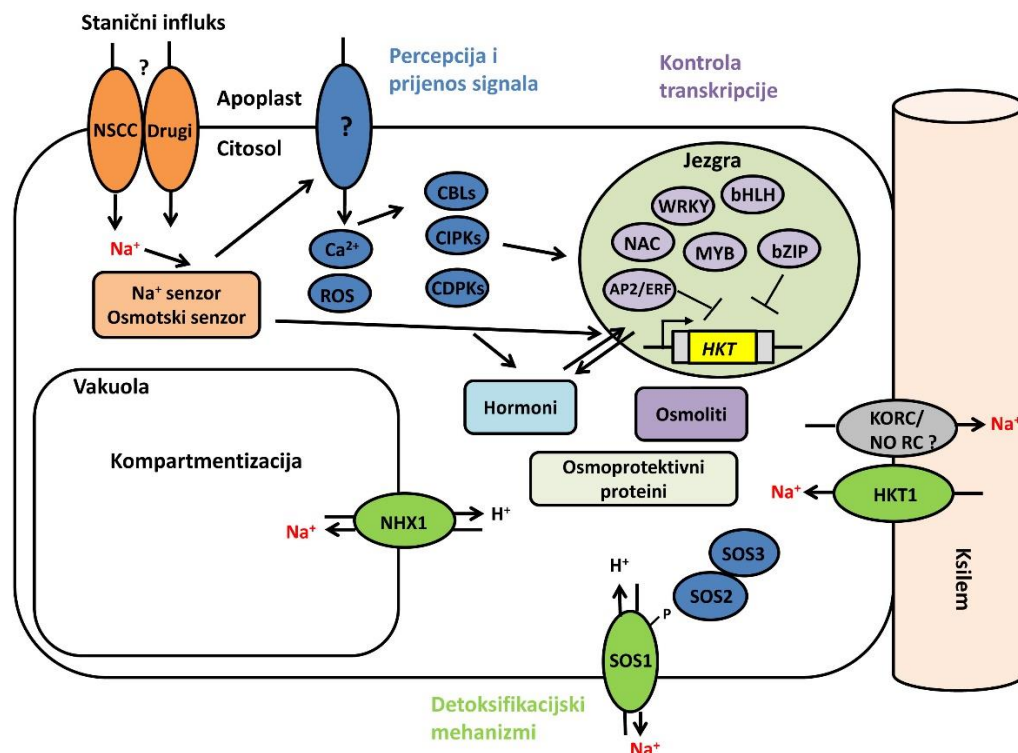
1.3. MEHANIZMI ODGOVORA BILJAKA NA POVIŠENI SALINITET

Rast biljaka na zasoljenim tlima ovisi o nizu adaptivnih mehanizama koji im omogućavaju preživljavanje u takvom okolišu. Ovisno o sposobnosti rasta u uvjetima povišenog saliniteta, biljke je moguće klasificirati u dvije skupine: glikofite koji ne toleriraju salinitet i halofite koji su sposobni rasti u prisutnosti soli. Mehanizmi odgovora na solni stres su različiti između ove dvije skupine s naglaskom na sposobnosti eliminacije toksičnog učinka soli kroz kontrolu unosa, transporta, kompartmentizacije i/ili izlučivanja. Nadalje, uslijed solnog stresa aktivira se sinteza osmoprotektanata, generiraju se ROS, aktiviraju se antioksidacijski enzimi i biosintetiziraju antioksidansi, dolazi do promjena u asimilaciji CO₂, fotosintetskom transportu elektrona, sadržaju klorofila i fluorescenciji te se odgovor biljaka modulira djelovanjem hormona (Gupta i Huang 2014, Acosta-Motos i sur. 2017).

1.3.1. Ionska i osmotska homeostaza

Glavna dva izazova s kojima se biljke uslijed saliniteta moraju suočiti su prevladavanje osmotskog šoka i eliminacija toksičnog učinka iona soli, prvenstveno Na⁺. U zasoljenim tlima zbog prisustva iona soli osmotski potencijal tla je visok što onemogućava biljkama unos vode kroz korijen. Kako bi izjednačile osmotski potencijal stanice s vanjskim uvjetima, biljke kao odgovor na osmotski stres sintetiziraju osmolite poput glicin betaina, prolina ili manitola. Osmoliti štite stanicu od osmotskog šoka održavajući turgor stanice i pružaju zaštitu staničnim strukturama (Deinlein i sur. 2014; Munns i Gilliam 2015). Sinteza osmolita *de novo* karakterističan je mehanizam odgovora glikofita koji zahtijeva veliki utrošak energije. Suprotno tome, halofiti u većini slučajeva upotrebljavaju ione soli (poput Na⁺, Cl⁻ i K⁺) kako bi održali osmotski potencijal i turgor stanice uz uvjet brzog uklanjanja viška metabolički toksičnog Na⁺ (Shabala 2013). Novija istraživanja upućuju da osim uloge osmoprotektanta prolin potencijalno služi i kao antioksidans, balansira redoks sustav stanice ili djeluje kao stabilizator proteina i membranskih struktura uslijed stresa (Deinlein i sur. 2014).

Druga komponenta odgovora biljaka na povišeni salinitet je eliminacija iona Na⁺ uz održavanje optimalne koncentracije esencijalnih iona Ca²⁺, Mg⁺ i K⁺. Visoke koncentracije Na⁺ u citoplazmi stanice mogu inaktivirati enzime i metaboličke procese, a akumulacija u listovima reducira rast biljke radi inhibicije fotosinteze ukoliko Na⁺ nije kompartmentiziran na staničnoj ili interstaničnoj razini (Julkowska i Testerink 2015). Tri mehanizma eliminacije Na⁺ obuhvaćaju: (1) smanjenje unosa Na⁺ u stanicu, (2) maksimalno skladištenje Na⁺ u vakuole (kompartmentizacija) i (3) pojačan izlazak Na⁺ iz stanice. Od navedenih mehanizama, izlučivanje Na⁺ pokazalo se kao glavni homeostatski proces za održavanje niske koncentracije citostolnog Na⁺ i održavanje dinamičke ravnoteže esencijalnih iona K⁺ i Ca²⁺, a koji se odvija preko SOS (eng. *Salt Overly Sensitive*) signalnog puta. Kako je korijen prvi u doticaju sa soli, izlučivanje Na⁺ iz stanica korijena je primarni odgovor zaštite, a zatim slijedi uklanjanje viška Na⁺ iz listova (Ji i sur. 2013).

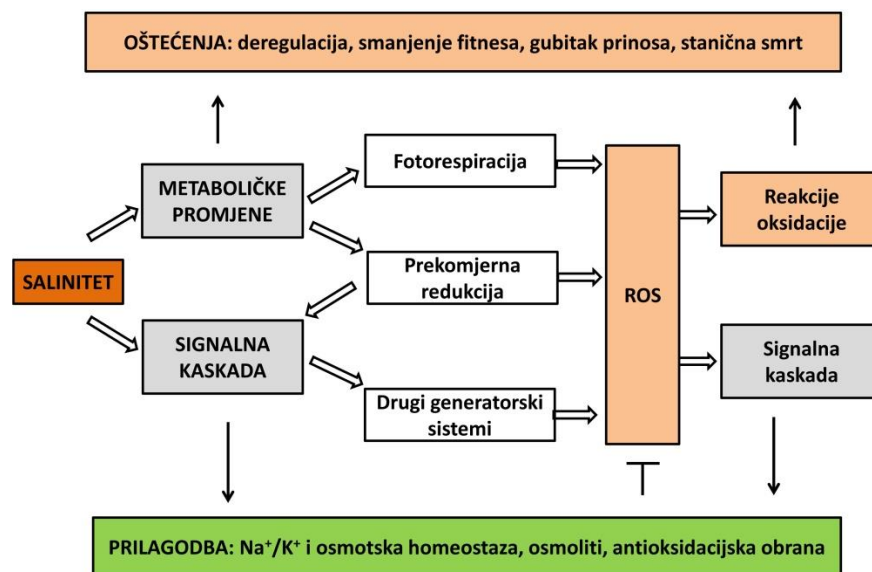


Slika 3. Pregled mehanizama transporta staničnog Na⁺ i važnih komponenti mreže odgovora na solni stres u stanici korijena. Kratice: NSCCs, neselektivni kationski kanali; ROS, reaktivne kisikove čestice; CDPKs, kalcij-ovisna protein kinaza; CBLs, senzor kalcija; CIPKs, CBL-interreagirajuća protein kinaza; Transkripcijski faktori: AP2/ERF, bZIP, NAC, WRKY, bHLB, MYB; NHX, Na⁺/H⁺ transporter; SOS, SALT OVERLY SENSITIVE, HKT1, transporter Na⁺ iz ksilema (preuzeto i modificirano iz Deinlein i sur. 2014).

Za razliku od poznavanja procesa uklanjanja toksičnog Na⁺, mehanizmi tolerancije na Cl⁻ koji je dominantni anion zasoljenih tala slabo su istraženi. Kloridini ioni važni su mikronutrijenti koji reguliraju enzimske aktivnosti u citoplazmi, sudjeluju kao ko-faktori u fotosintezi, stabiliziraju membranski potencijal te su uključeni u regulaciju pH stanice i turgora. Nepoznavanje transportnih mehanizama Cl⁻ otežava objašnjenje tolerancije i detoksifikacije Cl⁻ čija visoka koncentracija u listovima uzrokuje simptome kloroze radi degradacije klorofila. Pretpostavlja se da je upravo kontrola transporta Cl⁻ iz stanica korijena u ksilem preko anionskih kanala koji su regulirani fitohormonom apscizinskom kiselinom jedno od bitnih mjesta tolerancije (Munns i Tester 2008, Teakle i Tyerman 2010). Uspješno održavanje ionske homeostaze kao i promjene u arhitekturi korijena koje nastaju kao odgovor na stres predstavljaju osnovu tolerancije na salinitet (Ji i sur. 2013).

1.3.2. Oksidativni stres i antioksidacijski odgovor biljaka

Aerobni organizmi, uključujući biljke, koriste kisik za stanične procese te kao nezaobilazne nusprodukte reakcija generiraju reaktivne kisikove čestice (ROS). To su reaktivni kemijski oblici koji potiču lančane reakcije oksidacije, a nastaju u staničnim organelima u kojima se odvijaju reakcije prijenosa elektrona kao što su mitohondriji, peroksisomi i kloroplasti biljaka. ROS mogu biti u obliku slobodnih radikala poput superoksidnog radikala ($O_2^{\bullet-}$), hidroksilnog radikala (OH^{\bullet}), peroksilnog radikala (ROO^{\bullet}) ili molekularnih formi kao što su vodikov peroksid (H_2O_2) ili singlet oksid (1O_2) (Gill i Tuteja 2010, Choudhury i sur. 2016).

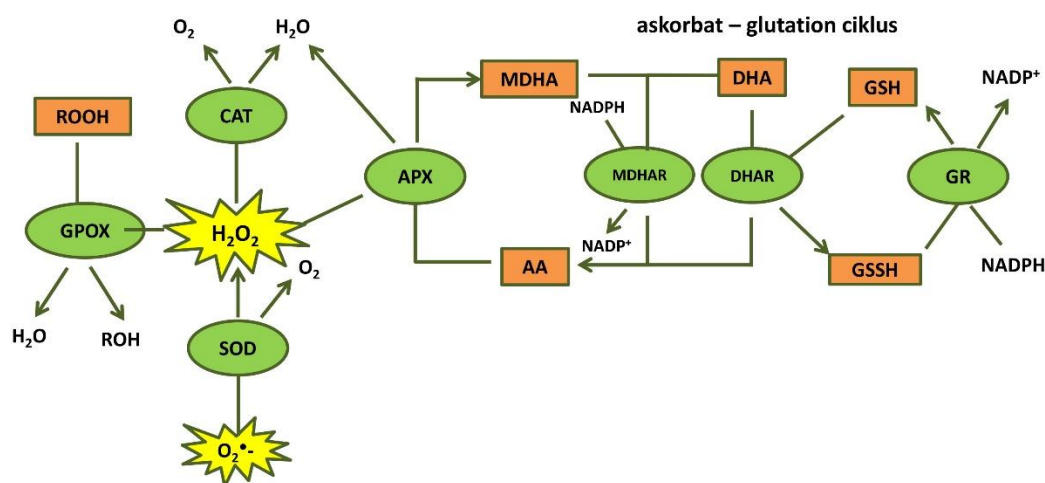


Slika 4. Uloga ROS pri povišenom salinitetu (preuzeto i modificirano iz Hossain i Dietz 2016).

U optimalnim fiziološkim uvjetima razina produkcije ROS je niska, no promjenom uvjeta okoline te posebice u stresnim stanjima dolazi do povećane produkcije ROS. Kako bi održale koncentraciju ROS optimalnom, biljke su razvile brojne sustave antioksidacijskog odgovora. Ukoliko antioksidacijski odgovor zakaže i nije u stanju održati ravnotežu javlja se oksidativni stres. Oksidativni stres se očituje u oksidativnom oštećenju staničnih membrana (lipidna peroksidacija), proteina i nukleinskih kiselina (DNA i RNA) te u konačnici vodi do stanične smrti (Choudhury i sur. 2016). No uloga ROS nije jednoznačna. ROS su nezaobilazni prijenosnici signala u rastu i razvitku biljaka te odgovoru na abiotički stres. Generirani ROS u stresu su rezultat promjena u metabolizmu stanica no također mogu biti i signalne prirode. Održavanje ravnoteže ROS i redoks sustava stanice na optimalnoj razini regulira ulogu ROS i eliminira njihov negativni učinak, a potiče funkciju prijenosnika signala koji sudjeluju u modulaciji adaptivnog odgovora na stres (Choudhury i sur. 2016, Hossain i Dietz 2016).

Održavanje ravnoteže ROS u stanici odvija se mehanizmima antioksidacijskog odgovora koji podrazumijevaju enzimatski i ne-enzimatski odgovor. Enzimatski odgovor podrazumijeva aktivnost antioksidacijskih enzima poput superoksid dismutaze, katalaze, askorbat

peroksidaze, gvajakol peroksidaze i sl. Prva linija obrane u uklanjanju ROS je enzim superoksid dismutaza (SOD). SOD pripada grupi metaloenzima te katalizira reakciju prevođenja superoksidnog radikala u H_2O_2 i O_2 . Daljnje uklanjanje H_2O_2 moguće je pomoću katalaze (CAT) u reakciji u kojoj se dvije molekule H_2O_2 prevode u vodu i O_2 . Peroksidaze također vrše uklanjanje H_2O_2 . Peroksidaze su hem- ili tiol- enzimi koji reduciraju H_2O_2 no pri tome zahtijevaju prisutnost alternativnog donora elektrona. Kao alternativni donor elektrona gvajakol peroksidaza (GPOX) koristi aromatski gvajakol dok askorbat peroksidaza (APX) za aktivnost zahtijeva askorbat. Askorbat je mala organska u vodi topljiva kiselina prisutna u visokoj koncentraciji te je jedan od glavnih antioksidansa stanice. Zajedno sa tripeptidom glutationom, također važnim staničnim antioksidansom, sudjeluje u askorbat-glutation ciklusu koji je bitna komponenta antioksidacijskog odgovora. Askorbat-glutation ciklus odvija se u citosolu, mitohondrijima, plastidima i peroksisomima stanice. Askorbat-glutation ciklus započinje redukcijom H_2O_2 do vode pomoću APX pri čemu nastaje monodehidroaskorbat (MDHA). Nestabilni MDHA se pomoću monodehidroaskorbat reduktaze (MDHAR) prevodi natrag u askorbat ili spontanom reakcijom razlaže na askorbat i dehidroaskorbat (DHA). DHA se reducira u askorbat pomoću dehidroaskorbat reduktaze (DHAR) uz utrošak dvije molekule reduciranog glutationa (GSH) pri čemu nastaje oksidirani glutation (GSSG), a potom se GSSG djelovanjem glutation reduktaze (GR) uz utrošak dvije molekule NADPH prevodi natrag u GSH. Odnos između konverzije reduciranog GSH i njegove oksidirane forme GSSG predstavlja indikator redoks ravnoteže tijekom detoksifikacije H_2O_2 (Gill i Tuteja 2010, Choudhury i sur. 2013).



Slika 5. Askorbat-glutation ciklus i enzimske komponente antioksidacijskog odgovora
Kratice: antioksidacijski enzimi GPOX, SOD, CAT, APX, MDHAR, DHAR, GR; ROOH, fenolni spojevi; AA, askorbinska kiselina; MDHA, monodehidroaskorbat; DHA, dehidroaskorbat; GSH, glutation; GSSG, oksidirani glutation (preuzeto i modificirano iz Hossain i sur. 2011).

Ne-enzimatski odgovor uključuje male molekule tj. antioksidanse poput askorbata i glutationa, fenolne kiseline, flavonoide i druge polifenole, vitamine poput α -tokolferola, pigmente poput karotenoida te biljne fenolne spojeve. Askorbat se smatra jednim od najjačih antioksidansa budući da može donirati elektrone velikom broju enzimatski i ne-enzimatskih reakcija. Način njegove regeneracije opisan je u sklopu askorbat-glutation ciklusa u dijelu enzimatskog antioksidacijskog odgovora. Također, glutation kao antioksidans potencijalno uklanja $^1\text{O}_2$, H_2O_2 i najreaktivniji hidroksilni radikal (Gill i Tuteja 2010). Biljni fenolni spojevi predstavljaju skupinu vrlo različitih biljnih metabolita za koje je karakteristično posjedovanje jednog ili više fenolnih prstenova te također prisutnost jedne ili više hidroksilnih grupa na fenolnom prstenu. Identificirano je oko 10000 prirodnih spojeva čiji broj se s vremenom povećava. Obuhvaćaju spojeve poput fenolnih kiselina, flavonoida, proantocijanidina, hidrolizirajućih tanina i mnogih drugih. Zahvaljujući kemijskoj strukturi imaju sposobnost prekidanja lančanih reakcija koje izazivaju slobodni radikali doniranjem elektrona ili atoma vodika radikalima pri čemu prelaze u stabilne, nereaktivne konformacije. Naziv polifenolni spojevi podrazumijeva fenolne kiseline, kumarine, flavonoide, stilbene, tanine, lignane i lignine (Quideau i sur. 2011, Cheynier i sur. 2013).

Fenolne kiseline su spojevi koji sadržavaju fenolni prsten i bar jednu karboksilnu grupu. Temeljem broja ugljika u kiselinskom lancu dijele se u nekoliko skupina (C6-C1), (C6-C2) i (C6-C3) pri čemu većina fenolnih kiselina dolazi u obliku hidroksicimetnih kiselina (C6-C3) i hidroksibenzojevih kiselina (C6-C1) (Goleniowski i sur. 2013). Antioksidacijsko djelovanje fenolnih kiselina ovisi o njihovoj strukturi odnosno broju i poziciji hidroksilnih grupa u odnosu na karboksilne skupine pri čemu antioksidacijska aktivnost fenolnih kiselina općenito raste s povećanjem hidroksilnih grupa na prstenu. Također, fenolne kiseline iz skupine hidroksicimetnih kiselina su jači antioksidansi u odnosu hidroksibenzojeve kiseline jer njihova $\text{CH}=\text{CH}-\text{COOH}$ grupa lakše donira H atome nego $-\text{COOH}$ grupa hidroksibenzojevih kiselina (Rice-Evans i sur. 1996).

Biosinteza velikog broja fenolnih kiselina odvija se preko fenil propanoidnog biosintetskog puta gdje reakcijama oksidacije i metilacije nastaju fenolne kiseline. Fenil propanoid biosintetski put jedan je od biosintetskih puteva polifenola, a kreće iz *trans*-cimetne kiseline. *Trans*-cimetna kiselina nastaje reakcijom deaminacije aminokiseline L-fenilalanina u reakciji koju katalizira enzim fenilalanin-amonij-lijaza (PAL). Supstrat za reakciju deaminacije, L-fenilalanin, PAL dobiva iz puta šikiminske kiseline (biosintetski put folata i aromatskih aminokiselina). Jedan od intermedijera fenil propanoidnog biosintetskog puta (*p*-kumarinska kiselina) prevođenjem u *p*-kumaroil-CoA ulazi u put flavonoida (Cheynier i sur. 2013, Goleniowski i sur. 2013).

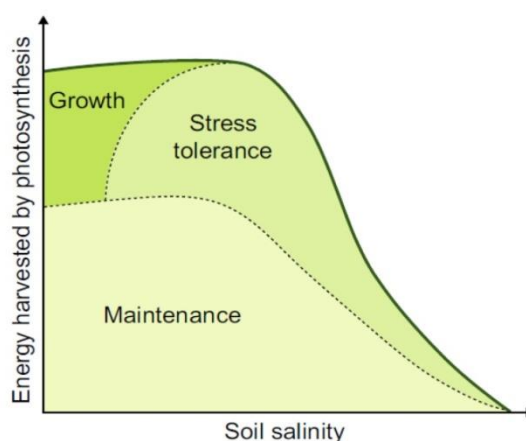
Fenolne kiseline u stanici su prisutne u manjoj mjeri u slobodnom obliku. Većinom su prisutne kao topljivi konjugati sa šećerima ili malim organskim kiselinama koji se mogu brzo hidrolizirati. Također, fenolne kiseline ulaze u sastav zaštitnih i potpornih struktura vezane na stanične stijenke. U staničnim stijenkama formiraju esterske, eterske i C-C veze s

ligninima, celulozom, hemicelulozom, arabinoksilanima, strukturnim proteinima i pektinima. Prisutnost biotskih i abiotskih stresora potiče njihovu akumulaciju čime dopinose antioksidacijskom odgovoru stanice, a salicilna kiselina koja je ujedno i hormon stresa regulira odgovor biljke na okolišne uvjete (Goleniowski i sur. 2013, Shahidi i Yeo 2016).

1.3.3. Fotosinteza uslijed solnog stresa i biljni rast

Fotosinteza je osnovni proces biljnog organizma putem kojeg se svjetlosna energija prevodi u energiju pohranjenju u obliku malih molekula (ATP i NADPH) koje se koriste za asimilaciju CO₂ i proizvodnju šećera. Funkcionalan fotosintetski aparat osnova je života fotosintetskih organizama. Prisutnosti abiotskog stresora (salinitet, suša, teški metali, prekomjerna količina svjetlosti i sl.) i povećana proizvodnja ROS mogu dovesti do ozbiljnih oštećenja fotosintetskog aparata pri čemu je njegova najosjetljivija komponenta fotosustav II (PSII). Nemogućnost održavanja ravnoteže između fotosintetskog redoks signalnog puta i popravka PSII rezultira inhibicijom fotosinteze čime biljke raspoložu s manje potrebne energije. Praćenje fotosintetske učinkovitosti može poslužiti kao pokazatelj stresa (Gururani i sur. 2015).

Gubitke uslijed solnog stresa moguće je promatrati iz dvije perspektive: ekonomskih gubitaka značajnih za poljoprivrednike koji se očituju u smanjenju prinosa poljoprivrednih kultura te energetske gubitaka biljnog organizma koji su uzrok smanjenih prinosa, a predstavljaju trošak energije koju biljke moraju usmjeriti u preživljavanje u nepovoljnim uvjetima umjesto u produkciju biomase (Munns i Gilliam 2015). Energija koju biljke dobivaju procesom fotosinteze većinom se koristi za održavanje metabolizma dok je samo mala količina (10-40%) integrirana u akumulaciju biomase čak i pod optimalnim uvjetima rasta (Slika 6).



Slika 6. Shematski prikaz dobotka i utroška energije uslijed solnog stresa (preuzeto iz Munns i Gilliam 2015).

Energija potrebna za održavanje metabolizma kao i energija potrebna za rast biljaka i akumulaciju biomase te obranu od stresa uvelike ovisi o razvojnem stadiju biljke pri čemu starije biljke zahtijevaju više energije za održavanje. Ukoliko se stres promatra s aspekta energetskeg utroška, ukupna dobivena energija porastom saliniteta opada uslijed reducirane stope fotosinteze, zatvaranja puči te oštećenja staničnog i fotosintetskog aparata, a aktivacija mehanizama adaptacije i tolerancije dodatno potiču energetske trošak. Pri visokom salinitetu količina dostupne energije za rast je minimalna tako da je stopa rasta maksimalno reducirana. Ukoliko trošak energije potrebne za održavanje preraste dobivenu energiju dolazi do senescencije (ubrzanog starenja) biljaka i odumiranja (Munns i Gilliam 2015).

Utjecaj solnog stresa na redukciju rasta biljke prvenstveno se očituje u inhibiciji rasta izdanka. Inhibiciju rasta izdanka moguće je promatrati kroz dvije faze: (1) faza brzog odgovora i redukcije rasta koja nastaje kao posljedica naglog porasta koncentracije soli u zoni korijena i rezultat je osmotskog šoka te (2) faza sporog odgovora uslijed visoke stope akumulacije Na^+ u listovima koje biljka nije sposobna ukloniti, a dovodi do redukcije rasta listova, usporavanja stvaranja novih te usporavanja nastanka bočnih pupova ili čak mirovanja što rezultira smanjenom biomasom (Munns i Tester 2008). Također, rast primarnog korijena u stresu je inhibiran. Moguće je formiranje bočnih ogranaka korijena kojima biljka izbjegava sol koja je najčešće uskladištena u dubljim slojevima i heterogeno raspoređena u tlu kao i pojava negativnog halotropizma odnosno usmjeravanja rasta korijena dalje od soli. Rast lateralnog korijena prisutan je samo do određenog intenziteta saliniteta. Proces rasta moduliran je fitohormonima (Galvan-Ampudia i Testerink 2011, Munns i Gilliam 2015, Julkowska i Testerink 2015).

1.3.4. Fitohormoni

Fitohormoni su male biološki aktivne molekule prisutne u vrlo niskim koncentracijama. Oni djeluju kao kemijski prijenosnici signala koji potiču i kontroliraju fiziološke procese tijekom rasta i razvoja te uslijed prisutnosti stresora. Uključeni su brojni putevi prijenosa signala, a njihova međusobna koordinacija omogućava biljci odgovor u skladu sa signalima iz okoliša. Na temelju njihove fiziološke funkcije i strukture, fitohormoni se mogu podijeliti u nekoliko kategorija: auksini, citokinini, giberelini, jasmonati, salicilna kiselina, abscizinska kiselina, etilen, brasinosteroidi i strigolaktoni (Kohli i sur. 2013). Detaljan pregled pojedinih fitohormona kao i njihova uloga u odgovoru biljaka na povišeni salinitet slijedi u idućim poglavljima.

1.4. AUKSINI

Auksini su skupina biljnih hormona koji reguliraju procese diobe, elongacije i diferencijacije stanica, rasta korijena i izdanka, cvjetanje i razvoj plodova, a odgovorni su i za tropizme. Mnogostruka funkcija ovih malih kemijskih glasnika govori o važnosti auksina i svrstava ih u glavne regulatore rasta. Najzastupljeniji endogeni auksin je IAA. U svojoj slobodnoj formi IAA doprinosi samo 25% ukupne količine IAA, dok je većina pohranjena u obliku konjugata sa šećerima, aminokiselinama ili peptidima koji se po potrebi hidroliziraju uz oslobađanje IAA. Iako je IAA neophodna za životni ciklus biljaka, endogena razina u stanicama mora biti strogo kontrolirana budući da u visokoj koncentraciji djeluje toksično i inhibitorno. Održavanje homeostaze IAA obuhvaća procese kao što su biosinteza, degradacija, transport i reverzibilna konjugacija (Ludwig-Müller 2011, Ljung 2013).

1.4.1. Biosinteza

Biosinteza IAA odvija se na dva načina: preko triptofan-ovisnog biosintetskog puta i triptofan-neovisnog biosintetskog puta. O genima i enzimima Trp-neovisnog biosintetskog puta još uvijek se ne zna mnogo iako rezultati eksperimenata s mutantama Trp-ovisnog puta i stabilnim izotopno obilježenim IAA prekursorima s početka 90-tih godina prošlog stoljeća ukazuju na njegovo postojanje. Također, jedan od predloženih mehanizama sinteze je i β -oksidacija dugolančanog auksina IBA u IAA u peroksisomima stanice. IBA je pronađena sporadično u nekim kultivarima kukuruza i Arabidopsisu, no njeno postojanje kao endogenog auksina i potencijalnog prekursora IAA je upitno (Normanly 2010, Novák i sur. 2012, Ljung 2013).

Glavni put sinteze IAA je Trp-ovisna biosinteza i kreće iz aminokiseline Trp. Aminokiselina Trp u sintezu IAA ulazi iz puta šikiminske kiseline u kojem se korizmat preko antranilata i drugih intermedijera biosinteze prevodi u Trp. Reakcija konverzije korizmata u antranilata koju katalizira enzim antranilat sintaza je limitirajući korak sinteze Trp. Trp se dalje prevodi do IAA na četiri moguća načina preko indol-3-acetamida (IAM); indol-3-acetaldoksima (IAOx); indol-3-piruvatne kiseline (IPyA) i triptamina (TRA). Postoje još uvijek neke nepoznanice o genima i enzimima koji sudjeluju u ova četiri biosintetska puta, no opća slika biosinteze auksina je poznata. Pregled biosintetskih puteva IAA dan je prema Ljung (2013) i Tivendale (2014).

Sinteza IAA u IAM biosintetskom putu odvija se konverzijom Trp u IAM u reakciji koju katalizira još uvijek nepoznati enzim (neotkrivena triptofan-2-monooksigenaza). Konverzija IAM u IAA je drugi korak biosintetskog puta kataliziran acil-amidohidrolazama (AMI1).

U IAOx biosintetskom putu Trp se prevodi u IAOx pomoću citokrom P450 monooksigenaza CYP79B2 i CYP79B3 koje su pronađene jedino u porodici Brassicaceae. Nastali IAOx se dalje konvertira u indol-3-acetonitril (IAN) u reakciji koju kataliziraju još uvijek neidentificirani enzimi te dalje prevodi aktivnošću nitrilaza (NIT) u IAA. Oba biosintetska prekursora IAOx i

IAN mogu prijeći i u prekursor IAM iako enzimi koji kataliziraju ove reakcije nisu poznati. Osim u biosintetskom putu IAA, IAN sudjeluje u biosintetskom putu kamaleksina i drugih indolnih derivata, a nastaje i razgradnjom indolnih glukozinolata djelovanjem enzima mirozinaza.

Najviše nepoznanica o biosintezi IAA vezano je za biosintetski put TRA. TRA nastaje iz Trp u reakciji koju kataliziraju pretpostavljene triptofan dekarboksilaze (TDCs). Potom se TRA konvertira u indol-3-acetaldehida (IAAld) koji se zatim prevodi do IAA. Enzimi koji potencijalno kataliziraju reakcije su flavin monooksigenaze (YUCCA) i aldehyd oksidaze (AO). Osim uloge kao mogućeg IAA prekursora, TRA također ima potencijalnu funkciju kao prekursor biosinteze indolnih alkaloida i serotonina u različitim biljnim vrstama.

Četvrti biosintetski put IAA preko IPyA je u potpunosti okarakteriziran. Trp se pomoću aminotransferaza (TAA1, TAR1, TAR2) prevodi u IPyA koju zatim enzimi flavin monooksigenaze (YUCCA) direktno konvertiraju u IAA. Genetički i biokemijski dokazi upućuju na to da je upravo IPyA put glavni biosintetski put IAA u različitim biljkama. Također, biosinteza IAA iz IPyA preko intermedijera u reakciju koju kataliziraju indol-3-piruvat dekarboksilaze i aldehyd oksidaze pronađena je u mikrobima koji sintetiziraju auksine.

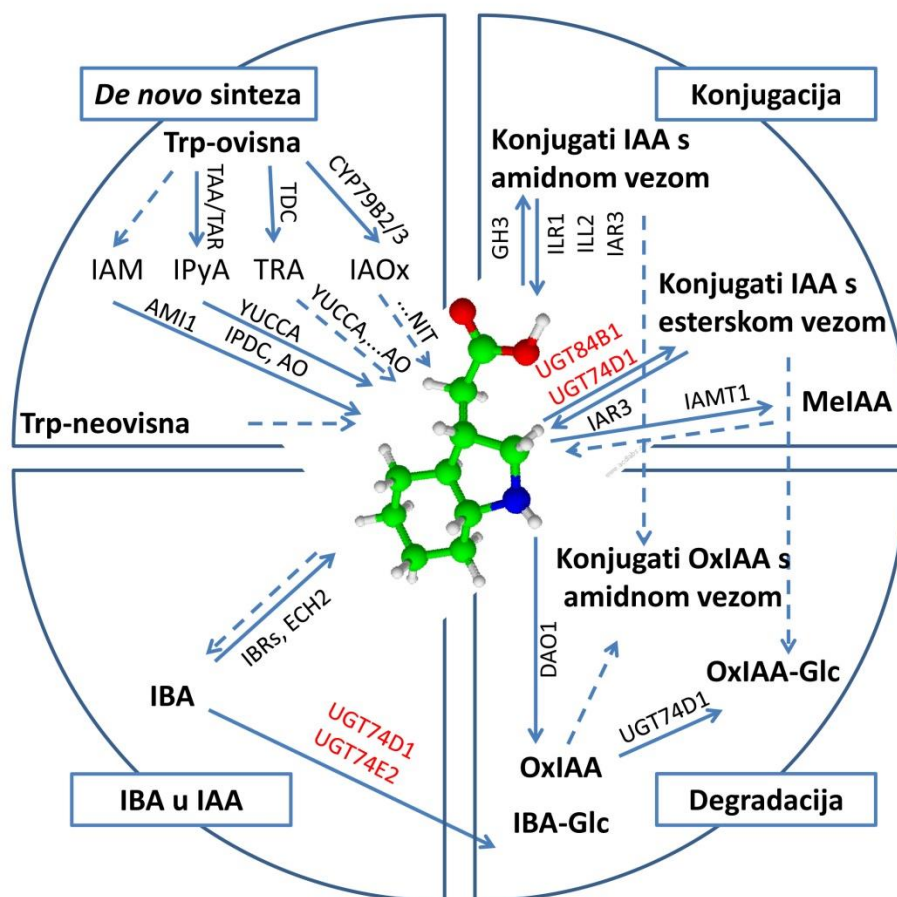
1.4.2. Konjugacija i degradacija

Regulacija razine auksina u stanici *de novo* sintezom jedan je od važnijih homeostatskih mehanizama, no koncentracija IAA može biti regulirana nepovratnom i povratnom inaktivacijom IAA. Nepovratna inaktivacija postiže se procesom: a) oksidacije pri čemu se IAA oksidira u katabolički produkt oxIAA koji se može dodatno esterificirati s glukozom ili b) procesom ireverzibilne konjugacije IAA sa aminokiselinama Asp i Glu. Povratna inaktivacija uključuje reverzibilnu konjugaciju auksina i obuhvaća dva antagonistička procesa: a) privremenu inaktivaciju IAA koja se postiže sintezom tzv. reverzibilnih konjugata s aminokiselinama, peptidima i šećerima što smanjuje razinu slobodnih formi auksina i b) povećanje slobodnih formi auksina hidrolizom tih konjugata kad se u biljci za to pojavi potreba. Procese reverzibilne konjugacije auksina s aminokiselinama kontroliraju geni i enzimi iz skupine auksin-konjugat sintetaza (GH3) i auksin-amidohidrolaza (ILR, IAR, ILL) (Ludwig-Müller 2011).

Auksin-amidohidrolaze su enzimi koji pripadaju skupini metalopeptidaza M20 i podskupini M20D. Metalopeptidaze kataliziraju širok spektar supstrata koji sadrže amide ili estere kao funkcionalne skupine. Auksin-amidohidrolaze kataliziraju reakcije hidrolize konjugata auksina s aminokiselinama. Sposobne su hidrolizirati niz različitih supstrata, a njihova supstratna specifičnost ovisi o biljnoj vrsti iz koje dolaze. Hidrolaze iz *A. thaliana* preferiraju konjugate kratkolančanih auksina (IAA) s aminokiselinama kao supstrate, dok auksin-amidohidrolaze drugih vrsta pokazuju supstratnu specifičnost prema dugolančanim auksinima (IBA ili IPA) poput IAR3 iz pšenice (Campanella i sur. 2004), djeteline (Campanella i sur. 2008) te IAR3 i

ILL2 iz kineskog kupusa (Savić i sur. 2009). Osim auskinskih konjugata, IAR3 i ILL6 iz *Arabidopsis* sposobna je hidrolizirati konjugat jasmonske kiseline s izoleucinom (JA-Ile) (Widemann i sur. 2013). Enzimi koji kataliziraju oprečne reakcije pripadaju skupini GH3 sintetaza. GH3 sintetaze su velika obitelj enzima, a kataliziraju reakcije adenilacije. Ekspresija pojedinih gena obitelji GH3 inducirana je auksinima. Neki od GH3 enzima kataliziraju reakcije konjugacije IAA s aminokiselinama no mogu konjugirati i druge hormone stresa. Tako primjerice GH3-5 (WES1) osim IAA konjugata sintetizira i aminokiselinske konjugate sa salicilnom kiselinom (Staswick i sur. 2005), a enzim GH3-11 (JAR1) identificiran je kao enzim odgovoran za sintezu jasmonoil-izoleucina (JA-Ile), aktivnog oblika jasmonske kiseline (Staswick i sur. 2002). Funkcija GH3 sintetaza i auksin-amidohidrolaza vidljiva je i u uvjetima stresa kada dolazi do promjena u ekspresiji njihovih gena i posljedično promjena u profilu konjugiranih i slobodnih formi IAA u svrhu osiguravanja brzog adaptivnog odgovora (Ludwig-Müller 2011).

Mehanizmi uklanjanja viška IAA uključuju formiranje ireverzibilnih konjugata (IAA-Asp i IAA-Glu) i oksidaciju IAA u katabolički spoj oxIAA. U fiziološkom stanju većina katabolizma IAA odvija se oksidacijom IAA, no oba katabolička procesa usko su povezana što je i dokazano nedavnim istraživanjima (Porco i sur. 2016). Inaktivacijom kataboličkog puta oksidacije koji je kataliziran enzimom IAA-deoksigenazom (DAO1) dolazi do porasta razine kataboličkih konjugata za dva reda veličine što svjedoči o važnosti kataboličkih procesa i inaktivaciji viška IAA. Što se događa u uvjetima stresa u kataboličkom metabolizmu IAA još uvijek ostaje za istražiti.



Slika 7. Pregled auskanske homeostaze. Auksinski metabolizam: *de novo* sinteza, konverzija IBA u IAA, konjugacija i degradacija. Crvena slova označavaju reakcije katalizirane enzimima okarakteriziranim *in vitro*. Poznati putevi prikazani su punim strelicama, putevi koji još nisu poznati prikazani su isprekidanim strelicama te sadržavaju jedan ili više koraka. Kratice: aldehyd oksidaza (AO), amidaza 1 (AMI1), citokrom P450 monooksigenaze (CYP7952/3), dioksigenaza za oksidaciju auksina 1 (DAO1), enoil-CoA hidrataza 2 (ECH2), flavin monooksigenaze (YUCCA), IAA-karboksimetiltransferaza 1 (IATM1), indol-3-acetamid (IAM), indol-3-acetaldoksim (IAOx), indol-3-piruvat dekarboksilaza (IPDC), indol-3-piruvatna kiselina (IPyA), nitrilaze (NITs), oksindol-3-octena kiselina (oxIAA), peroksisomski enzimi uključeni u odgovor indol-3-maslačne kiseline 1/3/10 (IBR), triptamin (TRA), triptofan aminotransferaza 1 (TAA1), triptofan povezane aminotransferaze 1–4 (TAR), triptofan dekarboksilaze (TDC) i UDP-glikoziltransferaze (UGT) (preuzeto i modificirano iz Salopek-Sondi i sur. 2017).

1.5. HORMONI STRESA

Adaptivni odgovor biljaka na stresne uvjete moduliran je aktivnošću hormona, prvenstveno hormona stresa. Hormoni stresa usmjeravaju fiziološke procese u biljci u svrhu prevladavanja negativnog učinka stresora i preživljavanja u nepovoljnim okolišnim uvjetima. Glavni hormoni stresa su apscizinska kiselina, salicilna kiselina i jasmonska kiselina.

1.5.1. Apscizinska kiselina

Uloga apscizinske kiseline (ABA) u regulaciji i razvoju biljnog organizma dugi niz godina je predmet znanstvenih istraživanja. Ime ABA dolazi od pojma apscizija što znači otpadanje listova, cvjetova i plodova. No bez obzira na njeno ime ABA ne kontrolira apsciziju direktno već promovira starenje i doprinosi odgovoru biljke na stres. ABA također regulira dormanciju i klijanje sjemena. Dugi niz godina ABA je bila svrstavana u kategoriju negativnih regulatora rasta, no prisutnost ABA nužna je za fiziološke procese u biljci. Jedna od najvažnijih funkcija ABA je kontrola zatvaranja puči čime se osigurava pravilna transpiracija i održavanje turgora. Upravo ta funkcija čini ABA glavnim hormonom stresa koji reagira uslijed nedostatka vode ili povišenog saliniteta. Unutar stanice ABA inducira akumulaciju osmolita te aktivira detoksifikacijske mehanizme za regulaciju redoks ravnoteže i regulira transport iona za uspostavu homeostaze. ABA je po kemijskoj strukturi seskviterpenoid i sintetizira se iz katorenoida zeaksantina. Kao i većina biljnih hormona, lokalna koncentracija ABA kontrolirana je procesom biosinteze te inaktivacijom (procesima degradacije ili konjugacije) i daljnom kompartmentizacijom i transportom. Katabolizam je glavni regulatorni mehanizam homeostaze ABA pri čemu u reakciji koju katalizira monooksigenaza P-450 nastaje nestabilni intermedijer (8'-OH-ABA) koji procesom izomerizacije prelazi u fazeičnu kiselinu. Također, ABA može biti esterificirana i prisutna u obliku ABA-glukozil estera. Inicijalno, ABA-glukozil ester je smatran nepovratnom kataboličkom formom ABA, no novija istraživanja upućuju da služi kao transportni ili skladišni oblik u vakuolama i apoplastu. Uslijed dehidracije biljke, ABA-glukozil ester se relokalizira u endoplazmatski retikulum gdje se djelovanjem β -glukozidaze oslobodja ABA koja inducira odgovor na stres (Finkelstein 2013).

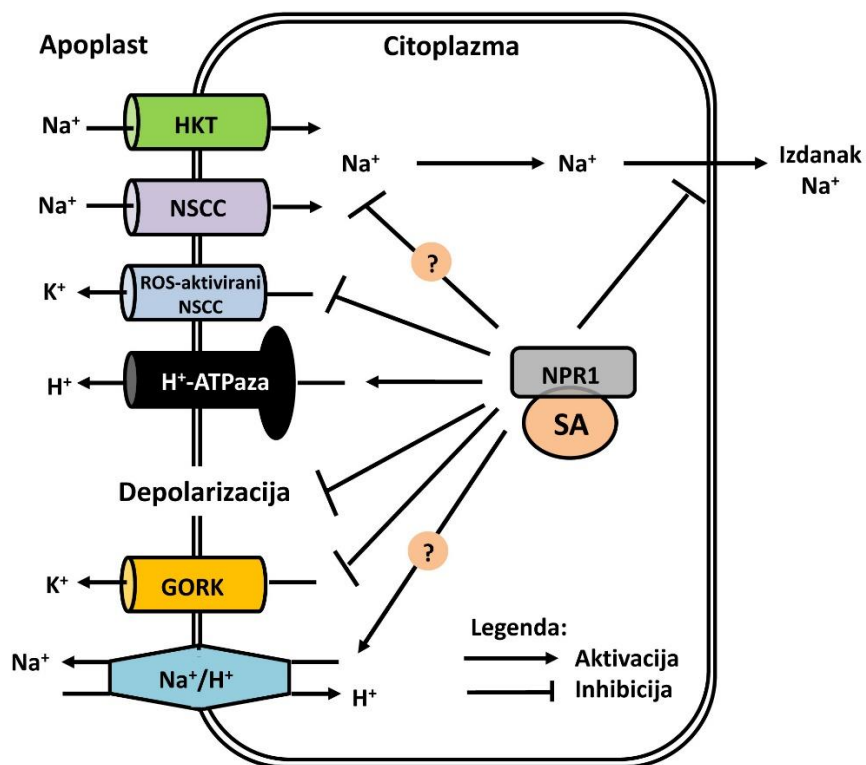
1.5.2. Jasmonska kiselina

Jasmonska kiselina (JA) i njeni derivati su grupa biološki aktivnih spojeva zajedničkog imena jasmonati. Jasmonati kontroliraju brojne razvojne procese kao što su inhibicija rasta, formiranje bočnog i adventivnog korijenja, klijanje sjemena, senescenciju listova, formiranje dlačica i uključena je u kontrolu plodnosti biljaka. Jasmonati su po kemijskoj strukturi pripadnici oksilipina. Dugi niz godina smatralo se da su JA i metil-jasmonat (MeJA) jedine bioaktivne forme na osnovu njihovog fiziološkog učinka te prirodne zastupljenosti u biljkama. Otkriće enzima JAR1 iz porodice GH3 sintetaza koji katalizira reakciju konjugacije JA s

aminokiselinama, prvenstveno izoleucinom, te potvrda funkcije enzima u *jar1* mutantama ukazalo je kako su JA i MeJA samo prekursori bioaktivne forme jasmonoil-izoleucina (Ja-Ile). Inaktivacija Ja-Ile odvija se mehanizmima karboksilacije i hidroksilacije te hidrolizom u reakciji koju katalizira jasmonoil-L-izoleucin hidrolaza 1 (JH1). Jasmonati su izuzetno bitni u biotskom stresu gdje aktiviraju obrambeni odgovor na prisutnost patogena, insekata ili nematoda, no također u koordinaciji s drugim hormonima reguliraju odgovor biljaka i na abiotički stres (Santino i sur. 2013).

1.5.3. Salicilna kiselina

Salicilna kiselina (SA) je signalna molekula koja regulira odgovor biljke na biotski i abiotički stres. Regulira klijanje sjemena i rast biljaka, a ima ulogu i u procesima fotosinteze te antioksidacijskom odgovoru stanice. Pripada u skupinu fenolnih kiselina i njezina biosinteza moguća je preko dva puta: fenil propanoidnog u citoplazmi stanice i puta izokorizmata koji se odvija u plastidima. Većina sintetizirane SA u biljkama je konjugirana s glukozom i/ili metilirana. Dominantni konjugat salicilne kiseline je SA O- β -glukozid (SAG) koji se formira konjugacijom glukoze na hidroksilnu skupinu SA. Također, SA može biti konjugirana s glukozom preko karboksilne skupine pri čemu nastaje saliciloil-glukozni ester (SGE). Prisutna u metiliranoj formi u obliku metil-salicilata (MeSA) se lagano transportira u sve dijelove biljke uslijed napada lokalnog patogena u sklopu SAR odgovora (eng. *Systemic Acquired Resistance*). Važna uloga SA u odgovoru na povišeni salinitet uočena je u brojnim eksperimentima gdje su egzogenom primjenom SA toksični simptomi saliniteta bili reducirani. Pretpostavljeni mehanizam eliminacije toksičnog učinka soli odvija se preko NPR1-posredovanog SA signalnog puta koji uključuje (1) kontrolu ulaska Na^+ u stanice korijena i kontrolu transporta u listove, zatim (2) pojačavanje H^+ -ATPazne aktivnosti u korijenu i (3) prevenciju curenja K^+ iz korijena te u konačnici (4) porast koncentracije K^+ u izdanku tijekom solnog stresa. Pojedine komponente mehanizma djelovanja SA u solnom stresu još uvijek nisu poznate (Jayakannan i sur. 2015). Mehanizam je prikazan na Slici 8.



Slika 8. Generalni mehanizam tolerancije na povišeni salinitet posredovan SA preko NPR1 ovisnog puta. Kratice: HKT, visoko afinitetni K⁺ transporter; NSCC, neselektivni kationski kanali; ROS, reaktivne kisikove čestice; GORK, K⁺ kanali stanica pratilica; NPR1 regulatorni protein. Upitnik predstavlja mehanizme za koje još nije potvrđena uloga (preuzeto i modificirano iz Jayakannan i sur. 2015).

1.6. CILJ I SVRHA ISTRAŽIVANJA

Solni stres utječe na rast i razvoj biljaka pri čemu prisutnost iona soli uzrokuje oksidativne promjene i potiče mehanizme obrane. Adaptivni odgovor biljaka na stres reguliran je prvenstveno aktivnošću malih signalnih molekula – fitohormona. Fitohormoni poput abscizinske, salicilne i jasmonske kiseline koji se svrstavaju u kategoriju hormona stresa te biljni hormoni rasta auksini međusobnim interakcijama utječu na odvijanje fizioloških procesa u biljci i osnova su tolerancije biljnih vrsta. Tijekom stresnih stanja, osim promjena u hormonima stresa, moguće su i promjene u razini auksina pri čemu je održavanje fiziološke koncentracije auksina (homeostaza auksina) od primarne važnosti. Promjene u homeostazi auksina jedan su od potencijalnih mehanizama prilagodbe na novonastale uvjete. Ciljevi ovog istraživanja bili su:

1) Detaljno okarakterizirati odgovor kineskog kupusa (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*) na povišeni salinitet uzrokovan prisutnošću natrijeva klorida (NaCl), na fiziološkoj, biokemijskoj, hormonskoj i molekularnoj razini, u klijancima i biljkama starosti 3 tjedna. U tu svrhu bilo je potrebno:

- odrediti i izmjeriti parametre fotosinteze i markere stresa (aktivnost antioksidacijskih enzima, razinu askorbinske kiseline i glutaciona, akumulaciju prolina te pokazatelje oksidativnih oštećenja proteina i lipida),

- odrediti profil fenolnih kiselina koje sudjeluju u odgovoru na stres,

- odrediti profil hormona stresa (abscizinska, salicilna i jasmonska kiselina) i regulatora rasta auksina (indol-3-acetna kiselina) te

- pratiti ekspresiju gena za auksin-amidohidrolaze koje su uključene u homeostazu auksina.

2) Usporediti hormonalni odgovor u komercijalno važnim kupusnjačama različito tolerantnim na povišeni salinitet (kineski kupus, bijeli kupus i raštika) uslijed prisutnosti stresora (NaCl).

3) Odrediti potencijalnu ulogu auksin-amidohidrolaza koristeći mutante uročnjaka (*Arabidopsis thaliana*) u uvjetima solnog stresa prateći status fitohormona.

2. MATERIJALI I METODE

2.1. BILJNI MATERIJAL

Sjeme kineskog kupusa *Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis* (Lour.) Hanelt cv. Cantonner Witkrop kupljeno je od proizvođača sjemena (ISP International Seed Processing GmbH, Quedlinburg, Njemačka). Sjeme bijelog kupusa *Brassica oleracea* var. *capitata* dobiveno je od Savjetodavne službe Varaždinske županije, a sjeme raštike *Brassica oleracea* var. *acephala* dobiveno je s Instituta za jadranske kulture i melioraciju krša, Split. Sjeme divljeg tipa uočnjaka (*Arabidopsis thaliana*) ekotipa Wassilewskija (Ws) i mutanti s disfunkcionalnim genima za auksin-amidohiolaze (Rampey i sur. 2004) dobiveno je od prof. Bonnie Bartel, Rice University, Houston, Texas, SAD.

2.1.1. Uzgoj klijanaca kupusnjača i solni tretmani

Sjeme kineskog kupusa, bijelog kupusa i raštike sterilizirano je u 3% izosanu G (15 min), isprano nekoliko puta u sterilnoj vodi i položeno na 1% agarske ploče te inkubirano u hladnjaku (48 sati, + 4 °C). Nakon vernalizacije, sjeme je prebačeno u vertikalnoj poziciji u komoru za uzgoj na kontinuirano svjetlo pri temperaturi od 22 °C i nakon što je proklijalo klijanci duljine korijena oko 1 cm prebačeni su na 1% agarske ploče koje su sadržavale 0, 50, 100 i 200 mM NaCl. Klijanci su bili izloženi solnim tretmanima u trajanju od 24 sata. Izmjerena je masa klijanaca i duljina korijena po završetku tretmana. Klijanci kineskog kupusa sakupljeni su i dio je pohranjen na -80 °C za analize biokemijskih pokazatelja utjecaja solnog stresa te je dio materijala liofiliziran za analize hormona i fenolnih kiselina.

Prirast i inhibicija rasta korijena te prinos biomase klijanaca izračunati su prema formulama:

$$\text{Prirast korijena (\%)} = \frac{\Delta d_{\text{NaCl}}}{\Delta d_{\text{kontrola}}} \times 100; \quad \text{Inhibicija rasta korijena (\%)} = 100 - \text{prirast}$$

pri čemu je:

Δd_{NaCl} = prirast korijena klijanca tretiranim NaCl u trajanju 24h

$\Delta d_{\text{kontrola}}$ = prirast korijena kontrolnih klijanca u trajanju 24h

$$\text{Prirast biomase (\%)} = \frac{m_{\text{NaCl}}}{m_{\text{kontrola}}} \times 100 \quad \text{pri čemu je:}$$




m_{NaCl} = masa klijanca nakon solnog tretmana

m_{kontrola} = masa kontrolnih klijanca

2.1.2. Uzgoj kupusnjača u hidroponskom sustavu i solni tretmani

Klijanci kupusnjača stari jedan dan postavljeni su u hidroponski sustav konstruiran na Institutu Ruđer Bošković u komori za uzgoj biljaka pri temperaturi od 22 °C, uvjetima dugog dana (16 h dan/8 h noć). Sustav se sastajao od posuda volumena 5,5 L opremljenih s pumpama za zrak radi osiguravanja odgovarajuće aeracije tijekom pokusa. U pokusu je korišteno 8 posuda u kojima je bio moguć uzgoj 7 biljaka po posudi. Tijekom pokusa biljke u vodi prihranjivane su komercijalno dostupnim hranjivima Flora (GHE Hydroponics) prema uputama proizvođača i to kako slijedi: 1,8 mL pojedinog hranjiva na dan postavljanja uzgoja; 1,8 mL pojedinog hranjiva na 7. dan uzgoja i 3,4 mL pojedinog hranjiva na 14. dan uzgoja. Sastav hranjiva prikazan je u Tablici 1.

Tablica 1. Sastav hranjiva Flora Series: Flora Gro, Flora Bloom i Flora Micro

Flora Gro	NPK-3-1-6	%
	Ukupni dušik (N)	3%
	Amonijski dušik	1%
	Nitratni dušik	2%
	Oslobodeni fosfor pentoksid (P ₂ O ₂)	1%
	Topljivi kalijev oksid (K ₂ O)	6%
	Topljivi magnezij (MgO)	0,8%
Flora Bloom	NPK 0-5-4	%
	Oslobodeni fosfor pentoksid (P ₂ O ₂)	5%
	Topljivi kalijev oksid (K ₂ O)	4%
	Topljivi magnezij (MgO)	3%
	Topljivi sumporov trioksid (SO ₃)	5%
Flora Micro	NPK 5-0-1	%
	Ukupni dušik (N)	5%
	Amonijski dušik	1,5%
	Nitratni dušik	3,5%
	Topljivi kalijev oksid (K ₂ O)	1,3%
	Bor (B)	0,01%
	Kalcij (CaO)	1,4%
	Bakar (Cu) kelat EDTA	0,01%
	Željezni (Fe) kelat EDDHA – 11% DPTA	0,12%
	Mangan (Mn) kelat EDTA	0,05%
	Molbiden (Mo)	0,004%
Cink (Zn) kelat EDTA	0,015%	

Biljke kineskog kupusa uzgajane su tri tjedna, a biljke bijelog kupusa i raštike četiri tjedna prije primjene solnih tretmana kako bi sve kupusnjače dosegle isti razvojni stadij (potpuno razvijena prva četiri lista). Solni tretmani (50, 100 i 200 mM NaCl) provedeni su dodatkom odgovarajućeg volumena 3 M NaCl u hidroponski sustav i to tako da je koncentracija soli u otopini postepeno podizana za 25 ili 50 mM NaCl do konačnih koncentracija od interesa: 50 mM = 25 mM (2 h prilagodbe) + 25 mM (22 h trajanje tretmana); 100 mM = 50 mM + 25 mM (2 h prilagodbe) + 25 mM (22 h trajanje tretmana); 200 mM = 100 mM + 50 mM (2 h prilagodbe) + 50 mM (22 h trajanje tretmana). Biljke (14 biljaka po tretmanu) uzorkovane su nakon 24 sata (2 sata prilagodbe i 22 sata tretmana). Biljke koje nisu tretirane s NaCl služile su kao kontrole. Korijen i listovi triju kupusnjača pohranjeni su na -80 °C i liofilizirani su za određivanje hormona stresa i fenolnih kiselina, dok je smrznuto tkivo kineskog kupusa korišteno za određivanje biokemijskih pokazatelja stresa. Tkivo kineskog kupusa za određivanje ekspresije gena uzorkovano je uz odgovarajuće kontrole 6 sati nakon postizanja željene koncentracije saliniteta i pohranjeno na -80 °C do analiza.

2.1.3. Uzgoj uročnjaka (*Arabidopsis thaliana*) i solni tretmani

Sjeme divljeg tipa uročnjaka i mutanti u genima za auksin-amidohidrolaze potopljeno je u 2 mL sterilne vode i ostavljeno 5 dana na vernalizaciji (+ 4 °C). Nakon vernalizacije sjemenke su sterilizirane sa 70% EtOH (1 min), isprane sa sterilnom vodom (+ 0,05% Tween 20), te sterilizirane s 1% izosanom G (10 min) i isprane par puta sa sterilnom vodom (+ 0,05% Tween 20). Sterilizirano sjeme upotrebljeno je za evaluaciju rasta korijena divljeg tipa i mutanti na krutoj MS podlozi (Murashige i Skoog 1962) uz dodatak NaCl te uzgoj u tekućoj hranjivoj MS podlozi radi analize hormonskog odgovora uročnjaka na povišeni saliniteta.

Sterilizirane sjemenke uročnjaka raspoređene su na pločice s MS krutom hranjivom podlogom (1× MS sol, 1% saharoza, 1,4% agar) i u vertikalnoj poziciji postavljene u komoru za uzgoj u uvjetima dugog dana (16 h dan/8 h noć) i pri temperaturi od 22 °C. Klijanci stari 5 dana prebačeni su na svježije pločice s MS hranjivom podlogom (1×MS, 1% saharoza, 1,4% agar) bez soli (kontrole) ili uz dodatak NaCl (50 i 100 mM) te su zabilježene duljine korijena. Nakon tri dana tretmana izmjerena je duljina korijena klijanaca uročnjaka te prirast i inhibicija rasta korijena izračunati su koristeći formule navedene pod poglavljem 2.2.1. Klijanci su ostavljeni na solnim tretmanima slijedećih 10-ak dana radi daljnjeg praćenja fenotipa uslijed produženog izlaganja solnom stresu.

Uzgoj klijanaca uročnjaka radi analize hormonskog odgovora uslijed povišenog saliniteta proveden je u tekućoj MS podlozi (1×MS sol, 1% saharoza). U sterilne Erlenmeyerove tikvice od 100 mL dodano je 25 mL sterilnog tekućeg medija te oko 5 mg steriliziranog sjemena uročnjaka koje je prošlo postupak vernalizacije. Tikvice su postavljene na tresilicu u komori za uzgoj (16 h dan/8 h noć, 22 °C) pri 120 rpm i klijanci divljeg tipa i mutanti uročnjaka uzgajani su uz trešnju 6-7 dana. Klijanci su zatim tretirani s 100 mM NaCl. U kontrole je

umjesto otopine NaCl dodan isti volumen sterilne vode. Nakon 3 dana tretmana klijanci su skupljeni, oprani od ostataka medija u destiliranoj vodi i liofilizirani za analize hormona.

2.2. METODE MJERENJA FIZIOLOŠKIH POKAZATELJA ODGOVORA NA POVIŠENI SALINITET

2.2.1. ICP-MS analiza kationa

Analiza kationa (Na^+ i K^+) izvršena je metodom masene spektrometrije s induktivno spregnutom plazmom (ICP-MS) u kojoj se induktivno spregnuta plazma koristi kao ionizacijski izvor, a detekcija se vrši masenim spektrometrom.

Liofilizirani biljni materijal usitnjen je pomoću tekućeg dušika u tarioniku do finog praha. Uzorci (100 mg) su razoreni u 6,1 mL kiselog medija ($\text{HNO}_3:\text{HF}$, 6:0,1) u mikrovalnoj pećnici (Anton Paar Multiwave 3000, Graz, Austrija) u trajanju od 40 min. Program razaranja sastojao se od 20 min postupnog rasta snage zračenja do 1400 W te 20 min razaranja pri postignutoj snazi. Potom, uzorci su ohlađeni i analizirani na HR-ICP-MS uređaju Element 2 (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Njemačka) uz dodatak indija kao internog standarda (1 $\mu\text{g/L}$).

2.2.2. Određivanje fotosintetske učinkovitosti

Fotosintetska učinkovitost kotiledona klijanaca te listova kineskog kupusa uslijed stresa izmjerena je OJIP testom tj. metodom polifaznog rasta fluorescencije klorofila α . Fluorescencija klorofila α izmjerena je *in vivo* pomoću uređaja Plant Efficiency Analyser (PEA Hansatech, Engleska). Kotiledoni klijanaca i listovi biljaka kineskog kupusa prilagođeni su na uvjete tame pola sata prije mjerenja fluorescencije pomoću specifičnih kopči. 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. Mjerenjem i obradom podataka dobiveni su parametri OJIP testa od kojih su za naša istraživanja korišteni indeks fotosintetske učinkovitosti (PI_{ABS}) i maksimalni kvantni prinos fotosustava II (F_v/F_m) kao osnovni parametri koji mogu dati informaciju o promjenama u funkcioniranju fotosintetskog aparata uslijed stresa (Strasser i sur. 2004).

2.2.3. Određivanje sadržaja prolina

Sadržaj prolina određen je u suhom tkivu klijanaca (30 mg) i svježem tkivu korijena i listova kineskog kupusa (100 mg) homogenizacijom s 1,5 mL 3% sulfosalicilne kiseline u hladnom tarioniku (Bates i sur. 1973). Nakon centrifugiranja (3 min, 700 g, +4 °C), supernatanti su prebačeni u staklene epruvete te im je dodano 0,75 mL ledene octene kiseline i 0,75 mL prethodno pripremljenog kiselog ninhidrina (1,25 g ninhidrina zagrijano je u 30 mL ledene

octene kiseline s dodatkom 20 mL 6 M fosfatne kiseline). Reakcijske smjese inkubirane su 60 min pri temperaturi od 95 °C te po završetku reakcije ohlađene u ledenoj kupelji. Nastali crvenkasti kromofor ekstrahiran je dodatkom 1,5 mL toluena te je nakon razdvajanja faza gornja faza toluena korištena za mjerenje apsorbancija pri $\lambda = 520$ nm koja odgovara sadržaju prolina u uzorcima.

Koncentracija prolina određena je iz prethodno kreirane baždarne krivulje dobivene s poznatim koncentracijama prolina ($0,231 - 3,23 \times 10^{-6}$ M) i izračunata prema sljedećem izrazu koristeći Lambert-Beerov zakon ($A = \epsilon \times c \times l$):

$$[\text{PROLIN}] = \frac{A_{520} \times 1000}{m \times \epsilon_{520} \times l} \quad [\text{nmol/g svj.m.}] \text{ ili } [\text{nmol/g s.m.}]$$

A_{520} = apsorbancija pri valnoj duljini

ϵ_{520} = ekstincijski koeficijent = $30,038 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

m = masa tkiva u gramima

l = duljina optičkog puta = 1 cm

1000 = faktor kojim se množi A_{520} kako bi sadržaj bio izražen u nmol

2.3. METODE MJERENJA OKSIDATIVNOG STRESA I KOMPONENATA ANTIOKSIDACIJSKOG ODGOVORA

2.3.1. Određivanje reaktivnih kisikovih čestica i glutationa *in situ*

Reaktivne kisikove čestice i glutation određene su *in situ* inkubacijom klijanaca kineskog kupusa s karakterističnim bojama. Ishodišne otopine boja priređene su otapanjem u metanolu, a radne otopine razrijeđene u vodi.

Određivanje vodikovog peroksida (H_2O_2) izvršeno je inkubacijom (30 min, 24 °C, mrak) korijena i kotiledona kineskog kupusa s $50 \mu\text{M}$ 2,7-diklorofluorescin diacetatom (DCFH-DA). DCFH-DA ulazi u tkivo pri čemu se prevodi do 2,7-diklorofluorescina (DCFH) i potom oksidira u fluorescentni 2,7-diklorofluorescin (DCF). DCF nastaje kao produkt reakcije primarno s H_2O_2 , no fluorescencija može biti rezultat reakcije i sa superoksidnim i hidroksilnim radikalom (Rodríguez i sur. 2002). Po završetku inkubacije preparati su pokriveni pokrovnicom, te zelena fluorescencija (ekscitacija pri $\lambda = 450-490$ nm, emisija pri $\lambda = 520$ nm) promatrana je pomoću fluorescencijskog mikroskopa (Olympus BX51, Olympus Optical Co. (Europa) GmbH) na povećanju 20× i 40× povezanog na kameru (Olympus DP70, Tokyo, Japan) i spojenog na računalo.

Određivanje superoksidnog radikala ($O_2^{\cdot-}$) izvršeno je inkubacijom (30 min, 24 °C, mrak) korijena i kotiledona kineskog kupusa s 10 μ M dihidroetidijem (DHE). Uslijed inkubacije DHE ulazi u stanicu gdje se prevodi u prisustvu reaktivnih kisikovih čestica u fluorescentni etidij, primarno sa superoksidnim radikalom, no moguća je reakcija i sa drugim ROS (Radić Brkanac i sur. 2015). Po završetku inkubacije preparati su pokriveni pokrovnicom, te crvena fluorescencija (ekscitacija pri $\lambda = 565$ nm, emisija pri $\lambda = 580$ nm) promatrana je pomoću fluorescencijskog mikroskopa (Olympus BX51, Olympus Optical Co. (Europa) GmbH) na povećanju 20 \times i 40 \times povezanog na kameru (Olympus DP70, Tokyo, Japan) i spojenog na računalo.

Određivanje glutationa (GSH) izvršeno je inkubacijom (40 min, 24 °C, mrak) korijena i kotiledona kineskog kupusa s 50 μ M monoklorbiamina (MCB) (Radić Brkanac i sur. 2015). Ulaskom u stanicu MCB formira fluorescentni adukt s GSH u reakciji koju katalizira glutation-S-transferaza. Po završetku inkubacije preparati su pokriveni pokrovnicom, te plava fluorescencija (ekscitacija pri $\lambda = 400$ nm, emisija pri $\lambda = 420$ nm) promatrana je pomoću fluorescencijskog mikroskopa (Olympus BX51, Olympus Optical Co. (Europa) GmbH) na povećanju 20 \times i 40 \times povezanog na kameru (Olympus DP70, Tokyo, Japan) i spojenog na računalo.

Sveukupno je snimljeno deset klijanaca te pet reprezentativnih slika je obrađeno koristeći program Lucida 6.0 (Kinetic Imaging Ltd., Wirral, UK) pri čemu je analizirano oko 25 stanica po slici.

2.3.2. Ekstrakcija topljivih proteina i aktivnost antioksidacijskih enzima

Uzorci svježeg tkiva klijanaca kineskog kupusa te lista i korijena kupusnjača (po 250 mg) homogenizirani su u 2 mL 50 mM kalij-fosfatnog pufera (pH 7,0) uz dodatak 0,1 mM EDTA i netopljivog polivinilpolipirrolidona. Homogenati su centrifugirani dva puta (1. put: 30000 g, 30 min, +4 °C; 2. put: 25,000 g, 20 min, +4 °C). Dio dobivenog supernatanta iskorišten je za određivanje koncentracije proteina metodom po Bradfordu (1976), a drugi dio za određivanje aktivnosti enzima. Metoda po Bradfordu temelji se na mjerenju apsorbancije obojenja smjese proteinskog ekstrakta s Coomassie Brilliant Blue G-250 reagensom u kiselom mediju pri valnoj duljini 595 nm. Koncentracija proteina u pojedinim uzorcima određena je očitavanjem baždarne krivulje dobivene mjerenjem apsorbancije poznatih koncentracija albumina goveđeg seruma (od 0,1 mg/mL do 0,8 mg/mL).

Aktivnost katalaze (CAT) određena je spektrofotometrijski prema metodi Aebi (1984). Reakcijska otopina sadržavala je 50 mM kalij fosfatni pufer (pH 7,0), 10 mM H_2O_2 i supernatant (30-50 μ l) te je mjereno pad apsorbancije (zbog razgradnje vodikovog peroksida) svakih 10 sekundi tijekom 2 minute pri valnoj duljini od 240 nm u reakcijskom volumenu od 1 mL. Aktivnost CAT izražena je kao jedinica aktivnosti (U) po miligramu proteina pri čemu je 1 U enzimske aktivnosti definirana kao količina potrošenog H_2O_2 u jedinici vremena (1 U =

$\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{min}$), a izračunata je uz korištenje odgovarajućeg ekstinkcijskog koeficijenta ($\epsilon_{240} = 40 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

Aktivnost askorbat peroksidaze (APX) određena je spektrofotometrijski prema metodi Nakano i Asada (1981). Reakcijska otopina sadržavala je 50 mM kalij fosfatni pufer (pH 7,0), 0,2 mM askorbinske kiseline (AA), 0,1 mM EDTA, 12 mM H_2O_2 i i supernatant (180 μL) u reakcijskom volumenu od 1 mL. Vodikov peroksid (10 μL) dodan je u reakcijsku smjesu neposredno prije mjerenja te je praćen pad apsorbancije uslijed oksidacije AA svaku sekundu tijekom 15 sekundi. Aktivnost APX je izražena je kao kao jedinica aktivnosti (U) po miligramu proteina pri čemu je 1 U enzimatske aktivnosti definirana kao količina oksidirane AA u jedinici vremena (1 U = $\mu\text{mol AA}/\text{min}$) uz korištenje odgovarajućeg ekstinkcijskog koeficijenta ($\epsilon_{290} = 2,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

Aktivnost gvajakol peroksidaze (GPOX) određena je spektrofotometrijski prema metodi Chance i Maehly (1955). Reakcijska otopina sadržavala je 50 mM kalij fosfatni pufer (pH 7,0), 18 mM gvajakol i 5 mM H_2O_2 u reakcijskom volumenu od 1 mL. Vodikov peroksid je dodan u reakcijsku smjesu neposredno prije mjerenja, a nakon dodavanja supernatanta (20 μL) mjereno je povećanje apsorbancije uslijed stvaranja tetragvajakola (TG) svakih 15 sekundi tijekom 2,5 minute pri valnoj duljini od 470 nm. Aktivnost GPOX izražena je kao kao jedinica aktivnosti (U) po miligramu proteina pri čemu je 1 U enzimatske aktivnosti definirana kao količina nastalog tetragvajakola (1 U = $\mu\text{mol TG}/\text{min}$) u jedinici vremena proteina koristeći ekstinkcijski koeficijent ($\epsilon_{470} = 26,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) za gvajakol.

Aktivnost superoksid dismutaze (SOD) određena je spektrofotometrijski prema metodi Giannopolitisa i Riesa (1977). Reakcijska otopina je sadržavala 50 mM kalij fosfatni pufer (pH 7,8), 13 mM metionin, 75 μM kloridnu sol nitrotetrazolijevog plavila (NBT), 0,1 mM EDTA, 2 μM riboflavin te ekstrakcijski pufer ili enzimsku otopinu. Na 890 μL reakcijske otopine dodano je 100 μL ekstrakcijskog pufera (kontrola), dok su uzorci priređeni miješanjem ekstrakcijskog pufera i određenih volumena originalnih enzimskih ekstrakata (25, 50 i 75 μL supernatanta) u volumenu od 100 μL . Neposredno prije mjerenja u reakcijsku smjesu je dodan riboflavin (10 μL). Uzorci su promiješani i ostavljeni ispod izvora svjetlosti (15 W) u zamračenom prostoru. Reakcija se pokreće uključivanjem svjetlosti te se nakon 10 min mjerenja izvor svjetlost ugasi. Pri tome NBT se reducira u prisutnosti superoksidnih radikala u netopljivi plavo obojeni formazan koji pokazuje apsorpcijski maksimum pri valnoj duljini od 560 nm. Postotak inhibicije mjeri se prema sljedećoj formuli:

$$\% \text{ inhibicije} = (\text{kontrola } A_{560} - \text{uzorak } A_{560}) / \text{kontrola } A_{560}$$

Jedna jedinica aktivnosti SOD izražava se kao ona količina enzima koja uzrokuje 50% inhibicije redukcije NBT pri $\lambda = 560 \text{ nm}$ u prisutnosti riboflavina na svjetlosti. Aktivnost SOD izražena je kao jedinica aktivnosti (U) po miligramu proteina.

2.3.3. Određivanje sadržaja glutaciona

Uzorci svježeg tkiva klijanaca kineskog kupusa te lista i korijena kupusnjača (100 mg) homogenizirani su u 1 mL hladne sulfosalicilne kiseline (5%, m/v) uz dodatak 1 mM EDTA i netopljivog polivinilpolipirolidona. Nakon centrifugiranja (10 000 g, 20 min, +4 °C) supernatanti su podijeljeni na dva volumena. U prvom volumenu određen je ukupni glutation nakon neutralizacije alikvota (400 µL) s 0,5 M kalij fosfatnim puferom pH 7,5 (600 µL). U drugom volumenu određen je oksidirani glutation (GSSG) nakon neutralizacije alikvota (400 µL) s 0,5 M kalij fosfatnim puferom pH 7,5 (600 µL) i reakcije derivatizacije s 2-vinilpiridinom (8 µL) na sobnoj temperaturi u trajanju od sat vremena uz povremeno miješanje (Smith 1985). Slijepe probe sadržavale su neutraliziranu sulfosalicilnu kiselinu uz dodatak 2-vinilpiridina u slučaju GSSG. Koncentracija glutaciona određena je spektrofotometrijski (Griffith 1980) pri čemu glutation reagira s Ellmanovim reagensom (DTNB, 5,5-ditio-bis-(2-nitrobenzojeva kiselina)) te nastaje žuto obojena 5,5'-tiobis-2-nitrobenzojeva kiselina (TNB) koja apsorbira na valnoj duljini od 401-415 nm i miješani disulfidi kojeg reducira glutation reduktaza do TNB uz oslobađanje GSH. Brzina proizvodnje TNB proporcionalna je koncentraciji glutaciona u uzorku.

Reakcijska smjesa ukupnog volumena 1 mL sadržavala je 100 mM natrij fosfatni pufer (pH 7,6), 1,2 mM DTNB, 1 U/mL glutation reduktaze, 0,2 mM NADPH i 100 µL uzorka za određivanje ukupnog glutaciona ili oksidiranog glutaciona. Uzorci i slijepe probe inkubirani su u reakcijskoj smjesi 5 min, reakcija je potaknuta dodatkom NADPH i zabilježena je promjena u apsorbanciji pri $\lambda = 412$ nm u početnom vremenu mjerenja (0 min) te završnom vremenu mjerenja (6 min). Uzorci za određivanje ukupnog glutaciona razrijeđeni su 5 puta prije mjerenja kako bi bili u mjernom području baždarne krivulje. Koncentracija ukupnog glutaciona u uzorku izračunata je pomoću baždarne krivulje dobivene s poznatim koncentracijama reduciranog glutaciona (GSH) (100 µL otopine 1,6-13 µM). Koncentracija oksidiranog glutaciona (GSSG) određena je iz baždarne krivulje s poznatim koncentracijama GSSG (100 µL otopine 0,8-6,5 µM) uz dodatak 2-vinilpiridina u količini jednakoj onoj u uzorku radi korekcije inhibitornog učinka derivatizacijskog reagensa na kinetiku reakcije. Koncentracija reduciranog glutaciona (GSH) izračunata je iz razlike ukupnog i oksidiranog glutaciona (GSSG) i rezultati su prikazani kao nmol/g svj.m.

2.3.4. Određivanje sadržaja askorbinske kiseline

Sadržaj askorbinske kiseline (AA) određen je u suhom tkivu klijanaca (15 mg) i svježem tkivu korijena i listova kineskog kupusa (30 mg) ekstrakcijom u 1 mL trikloroetane kiseline (6%, m/v). Ekstraktima je dodano 500 µL 2% otopine dinitrofenilhidrazina (DNPH) u kiselom mediju (50% H₂SO₄) te po kap 10% otopine tiouree u 70% etanolu. Tako dobivene smjese u staklenim epruvetama su zagrijavane 15 min na 95 °C te po završetku reakcije ohlađene u ledenoj kupelji i centrifugirane (10 min, 700 g, +4 °C). Talog zaostao nakon centrifugiranja

resuspendiran je dodatkom 1,5 mL 80% H₂SO₄ u ledenoj kupelji te spojen sa supernatantom (Mukherjee i Choudhuri 1983). Apsorbancija tako dobivenih smjesa izmjerena je pri $\lambda = 530$ nm. Koncentracija AA u tkivu određena je iz baždarnе krivulje dobivene s poznatim koncentracijama AA ($0,82-7,14 \times 10^{-3}$ M) i izražena u nmol/g svj.m. ili nmol/g s.m. uz ekstinkcijski koeficijent $\epsilon_{530} = 226,2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

2.3.5. UPLC-MS/MS analiza fenolnih kiselina

Analiza fenolnih kiselina (PHAs) izvršena je pomoću vezanog sustava tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (eng. *Ultra Performance Liquid Chromatography*) koja koristi ultra visoke tlakove (oko 15 000 psi) i spektrometra masa s trostrukim kvadripolom. Analiza je izvršena prema metodi Gruz i sur. (2008) uz manje modifikacije.

Liofilizirani biljni materijal usitnjen je pomoću tekućeg dušika u tarioniku do finog praha. Uzorci (30 mg tkiva) su homogenizirani u kugličnom mlinu (3 min, 27 Hz, Retsch GmbH, Haan, Germany) uz dodatak tri keramičke kuglice (cirkonij oksid, 2 mm) u 1 mL 80% MeOH koji je sadržavao stabilne deuterirane ²H- obilježene interne standarde (IS) fenolnih kiselina: [²H₄]-salicilna kiselina i [²H₄]-4-hidroksibenzojeva kiselina (2 nmol po uzorku). Po završetku, homogenati su inkubirani u ultrazvučnoj kupelji (5 min) i ekstrahirani na rotatoru (10 min, 15 rpm, +4 °C, Stuart, Staffordshire, UK) nakon čega su centrifugirani (10 min, 17 000 rpm, +4 °C). Supernatanti su iskorišteni za određivanje slobodnih fenolnih kiselina, a pelet tkiva je iskorišten za određivanje fenolnih kiselina vezanih na stanične stijenke. Radi utvrđivanja slobodnih fenolnih kiselina supernatanti su prebačeni u čiste tubice, inkubirani 30 min na -80 °C radi taloženja proteina, ponovno centrifugirani (10 min, 17 000 rpm, +4 °C), prebačeni u čiste tubice i upareni do suha u vakuum uparivaču. Dobiveni talozi su otopljeni u 500 μ L 0,1 M HCOOH (pH 2,0) te ekstrahirani dva puta sa 750 μ L dietil-etera. Eterske frakcije (1,5 mL) su uparene pod strujom dušika do suha te uzorci su pohranjeni na -20 °C prije analiza. Fenolne kiseline vezane na stanične stijenke utvrđene su nakon alkalne hidrolize peleta sa 400 μ L 1 M NaOH (3 h, 25 °C, u mraku). Po završetku hidrolize, homogenati pelet-NaOH su centrifugirani (10 min, 17 000 rpm, +4 °C) te supernatanti su prebačeni u nove tubice. Supernatantima su dodani IS: [²H₄]-salicilna kiselina i [²H₄]-4-hidroksibenzojeva kiselina (2 nmol po uzorku) te podešen pH (2,0) pomoću 98% HCOOH prije dvostruke ekstrakcije sa 750 μ L dietil-etera. Eterske frakcije (1,5 mL) su uparene pod strujom dušika do suha te su uzorci pohranjeni na -20 °C prije analiza.

Analiza je izvršena na uređaju ACQUITY Ultra Performance LC™ system (Waters, Milford, MA, SAD) povezanom na PDA 2996 detektor (Waters, Milford, MA, SAD) i Micromass Quattro *micro*™ API stolni trostruko kvadripolni spektrometar masa (Waters MS Technologies, Manchester, UK) u negativnom ESI modu. Uređaj je prikazan na Slici 9. Prije analize, talozi su otopljeni u 200 μ L 30% MeOH, profiltrirani kroz Micro-spin® filtere (0,2 μ m, Grace; 3 min pri 8000 rpm) i injektirani u RP kolonu (BEH C8; 2,1 \times 150 mm, 1,7 μ m; Waters,

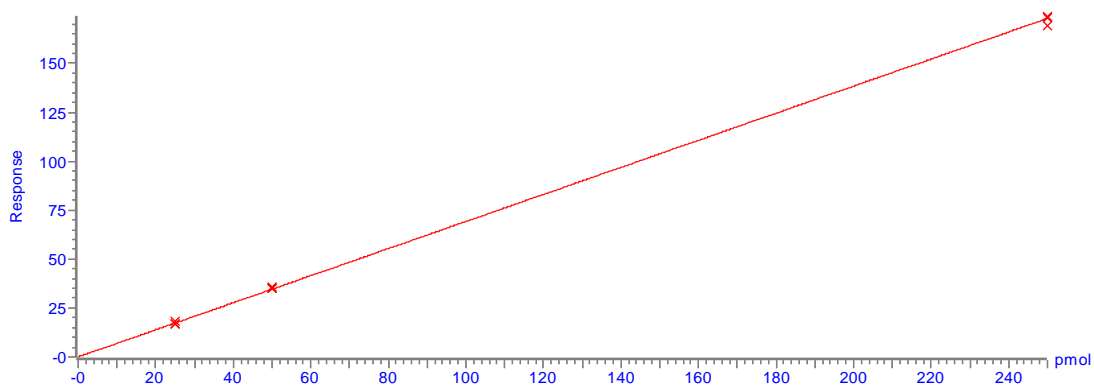
Milford, MA, SAD) zagrijanu na 30 °C pri protoku od 0,25 mL/min. Mobilna faza sastojala se od acetonitrila (otopina B) i 7,5 mM HCOOH u H₂O (otopina A). Razdvajanje je izvršeno uz gradijent kako slijedi: 5% B 0,8 min, 5-10% B 0,4 min, izokratno 10% B 0,7 min, 10-15% B 0,5 min, izokratno 15% B 1,3 min, 15-21% B 0,3 min, izokratno 21% B 1,2 min, 21-27% 0,5 min, 27-50% B 2,3 min, 50-100% B 1 min te konačno 100-5% B 0,5 min. Po završetku kolona je ekvilibrirana 2,5 min na početne uvjete. Uzorci su nakon kolone odvedeni do izvora elektrona i ionizirani. Fenolne kiseline i interni standardi detektirani su u MRM modu (eng. *Multiple Reaction Monitoring*) pomoću MRM tranzicija prekursora (m/z) i produkta (m/z) određenih spekrometrom masa te retencijskog vremena analita. Optimizirani UPLC-MS/MS parametri prikazani su u Tablici 2. MassLynx™ program (verzija 4,0, Waters, Milford, MA, SAD) korišten je za kontrolu uređaja i obradu podataka.



Slika 9. Waters ACQUITY Ultra Performance LC™/Micromass Quattro *micro*™ API uređaj (osebna fotografija).

Metodom razrijeđenja stabilnog izotopa određena je koncentracija PHA u uzorku (Rittenberg i Foster 1940). Napravljena je baždarna krivulja serijom decimalnih razrijeđenja analita (1×10^{-4} – 1×10^{-10} M) uz dodatak IS u svako razrijeđenje u konačnoj koncentraciji od 1×10^{-6} M. Vrijednost na osi y predstavlja odziv (konc. IS \times površina ispod pika analita/površina ispod pika IS), a vrijednost na osi x koncentraciju analita. Primjer baždarne krivulje prikazan je na Slici 10.

Compound name: pHBA (137>93)
 Coefficient of Determination: $R^2 = 0.999351$
 Calibration curve: $0.6916 * x$
 Response type: Internal Std (Ref 2), Area * (IS Conc. / IS Area)
 Curve type: Linear, Origin: Force, Weighting: 1/x, Axis trans: None



Slika 10. Baždarna krivulja za određivanje 4-hidroksibenzojeve kiseline u uzorku.

Koncentracija PHA 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.

Tablica 2. Optimizirani UHPLC-MS/MS parametri za kvantifikaciju fenolnih kiselina: retencijsko vrijeme (RT), MRM prijelazi, fragmentacija, limit detekcije (LOD), i linearnosti mjerenja.

Fenolne kiseline	RT (min)	MRM (<i>m/z</i>)		LOD	R ²
		Prekursor > Produkt	Fragmenti		
galna	2,59 ± 0,01	169 > 125		3	0,9990
3,5-dihidroksibenzojeva	3,59 ± 0,01	153 > 109		1	1,0000
protokatehinska	3,86 ± 0,01	153 > 109		1	0,9994
klorogenska	4,49 ± 0,01	353 > 191	217	1,5	0,9983
gentisinska	4,79 ± 0,01	153 > 109		10	0,9969
4-hidroksibenzojeva	4,99 ± 0,01	137 > 93		1	0,9999
kava	5,31 ± 0,01	179 > 135	161	3	0,9990
vanilinska	5,44 ± 0,01	167 > 108	152, 123	15	0,9994
siringinska	5,55 ± 0,01	197 > 123	182, 167	15	0,9997
3-hidroksibenzojeva	5,96 ± 0,00	137 > 93		1	1,0000
4-kumarinska	6,62 ± 0,01	163 > 119		1	0,9979
sinapinska	6,92 ± 0,01	223 > 164	208, 149	10	0,9995
ferulinska	7,04 ± 0,02	193 > 134	178, 149	5	0,9996
3-kumarinska	7,57 ± 0,01	163 > 119		0,15	0,9998
2-kumarinska	8,13 ± 0,00	163 > 119		0,75	0,9995
salicilna	8,25 ± 0,02	137 > 93		1,5	0,9987
trans-cimetna	9,19 ± 0,01	147 > 103		10	0,9975
4-hidroksibenzojeva (IS)	4,95 ± 0,01	147 > 97			
salicilna (IS)	8,21 ± 0,01	141 > 97			

2.3.6. Određivanje sadržaja malondialdehida

Određivanje sadržaja malonaldehida (MDA) temelji se na reakciji raspadanja produkata lipidne peroksidacije u kiselom mediju uslijed zagrijavanja na visokim temperaturama. Pri tome nastaje MDA koji reagira s dvije molekule tiobarbituratne kiseline i stvara se crvenkasti kromogen kojemu se mjeri apsorbancija (Verma i Dubey 2003). Uzorci liofiliziranog tkiva klijanaca (30 mg) ekstrahirani su u 1,5 mL 0,25% tiobarbituratne kiseline u 10% trikloroetanoj kiselini (TCA). Smjesa je zagrijavana 30 min na 95 °C, a po završetku inkubacije ohlađena u ledenoj kupelji i centrifugirana (10 min, 10 000 g). Apsorbancija supernatanta očitana je pri $\lambda = 532$ nm te pri 600 nm zbog korekcije na nespecifično zamućenje:

$$\Delta A = A_{532} - A_{600}$$

Kao slijepa proba korištena je otopina 0,25% tiobarbituratne kiseline u 10% TCA. Sadržaj MDA u uzorcima korijena i listova kineskog kupusa određen je iz ekstrakata antioksidacijskih

enzima pri čemu je u 0,8 mL 0,25% tiobarbituratne kiseline u 10% TCA dodano 0,2 mL ekstrakta ili 0,2 mL kalij fosfatnog pufera (slijepa proba). Određivanje je nastavljeno kako je prethodno napisano. Koncentracija lipidnih peroksida izražena je kao MDA u jedinicama nmol/g svj.m. ili nmol/g s.m. uz ekstinkcijski koeficijent $\epsilon_{532} = 155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

2.3.7. Određivanje sadržaja karbonila

Sadržaj karbonila u uzorcima klijanaca, korijena i listova kineskog kupusa određen je spektrofotometrijski pri čemu su korišteni ekstrakti topljivih proteina. Alikvoti uzoraka (200 μL) koji sadrže najmanje 0,5 mg/mL proteina inkubirani su s 300 μL dinitrofenilhidrazina (DNPH) reagensa (10 mM u 2 M HCl) na sobnoj temperaturi 1 sat uz miješanje svakih 15 minuta. Alikvoti uzoraka (200 μL) inkubirani uz dodatak 300 μL 2 M HCl korišteni su kao slijepa probe. Nakon inkubacije, proteini u uzorcima su precipitirani uz dodatak 500 μL TCA (10%) na $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ nakon čega su centrifugirani (10 min, 12 000 g, $+4 \text{ }^\circ\text{C}$). Dobiveni talozi isprani su u etanol:etilacetatu u omjeru 1:1, 3 \times 500 μL , kako bi se uklonio nevezani reagens. Talozi su otopljeni u 1 mL pufera (6 M urea u 20 mM kalij-fosfatnom puferu pH 2,4) u ultrazvučnoj kupelji (30 min). Određivanje sadržaja karbonila temelji se na reakciji karbonilnih skupina s DNPH reagensom, a produkt reakcije mjeri se spektrofotometrijski pri $\lambda = 370 \text{ nm}$ (Levine i sur. 1994). Pri valnoj duljini 370 nm očitana je apsorbancija uzoraka tretiranih s DNPH te je preračunata količina karbonila u uzorcima pomoću ekstinkcijskog koeficijenta ($\epsilon_{370} = 22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Koncentracija proteina u uzorcima izmjerena je u slijepim probama pri $\lambda = 280 \text{ nm}$ te izračunata iz baždarne krivulje dobivene s poznatim koncentracijama albumina goveđeg seruma u 1 mL 6 M uree u 20 mM kalij fosfatnom puferu (pH 2,4) pri $\lambda = 280 \text{ nm}$. Rezultati su izraženi kao nmol/mg proteina.

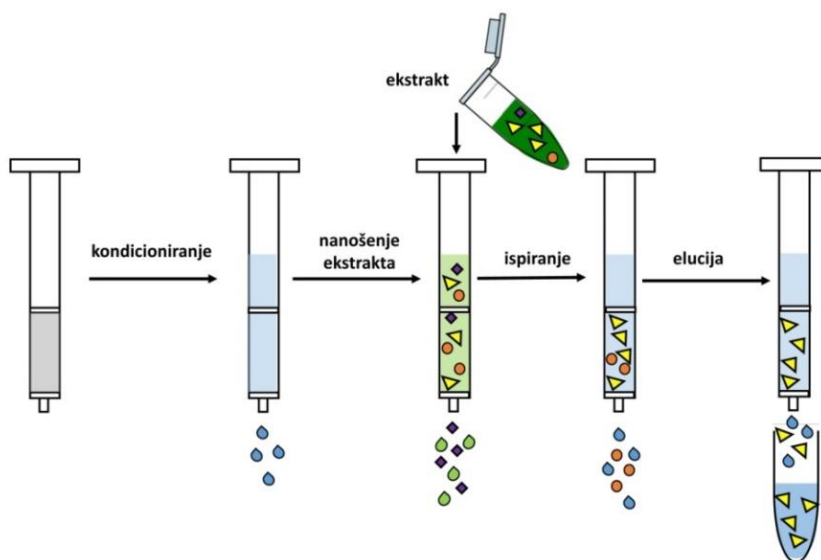
2.4. ANALIZE FITOHORMONA

2.4.1. UHPLC-MS/MS analiza hormona stresa

Analiza hormona stresa izvršena je pomoću vezanog sustava tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (eng. *Ultra High Performance Liquid Chromatography*) koja koristi ultra visoke tlakove (oko 20 000 psi) i spektrometra masa s trostrukim kvadripolom prema metodi Floková i sur. (2014) uz manje modifikacije.

Liofilizirani biljni materijal usitnjen je pomoću tekućeg dušika u tarioniku do finog praha. Uzorci (2 mg tkiva) su homogenizirani u kugličnom mlinu (5 min, 27 Hz, Retsch GmbH, Haan, Njemačka) uz dodatak tri keramičke kuglice (cirkonij oksid, 2 mm) u 1 mL hladnog ekstrakcijskog pufera (50 mM natrij fosfatni pufer, 0,1% DEDTCA, pH 7,0) koji je sadržavao stabilne deuterirane ^2H - ili ^{13}C - obilježene interne standarde (IS) hormona: [$^2\text{H}_6$]-ABA, [$^2\text{H}_6$]-JA (5 pmol po uzorku); [$^2\text{H}_4$]-SA (20 pmol po uzorku) i [$^2\text{H}_2$]-JA-Ile (0,1 pmol po uzorku). Po

završetku, homogenati su ekstrahirani na rotatoru (15 min, 15 rpm, +4 °C, Stuart, Staffordshire, UK) nakon čega su centrifugirani (15 min, 20 000 rpm, +4 °C). Supernatanti su odvojeni u čiste staklene epruvete i alkalizirani s jednakim volumenom 5% NH₄OH neposredno prije pročišćavanja na SPE (eng. *Solid Phase Extraction*) MAX kolonama za anionsku izmjenu (1 cc/30 mg Oasis[®], Waters, Milford, MA, SAD). Shematski prikaz SPE pročišćavanja prikazan je na Slici 11.



Slika 11. Pročišćavanje ekstrakta na SPE kolonama.

SPE pročišćavanje uzoraka obuhvaćalo je iduće korake:

- 1) kondicioniranje kolone s 1 mL 100% MeOH, 1 mL H₂O i 1 mL 5% NH₄OH
- 2) nanošenje uzorka na kolonu
- 3) ispiranje epruvete u kojoj se nalazio uzorak s 1 mL H₂O i nanošenje na kolonu
- 4) ispiranje kolone s 2 mL 5% NH₄OH
- 5) ispiranje kolone s 2 mL 100% MeOH
- 6) elucija s 2 mL 2% HCOOH u 80% MeOH

Uzorci su upareni do suha pod strujom dušika u uparivaču na 30 °C i pohranjeni na -20 °C do analiza. Analiza je izvršena na uređaju Acquity UPLC[®] System (Waters, Milford, MA, SAD) povezanom na Xevo[™] TQ MS trostruko kvadrupolni spektrometar masa (Waters MS Technologies, Manchester, UK) i opremljenom s elektronskim ionizatorom (ESI). Uređaj je prikazan na Slici 12. Prije analize, talozi su otopljeni u 40 µL mobilne faze (acetonitril:10 mM

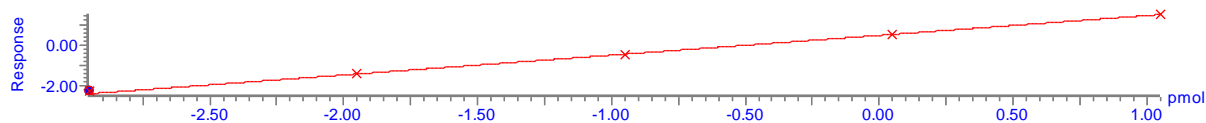
HCOOH, 15:85), proflitirani kroz Micro-spin® filtre (0,2 µm, Grace; 3 min pri 8000 rpm) i 10 µL svakog uzorka je injektirano u RP kolonu (Acquity UPLC® CSH™ C18; 2,1 × 100 mm, 1,7 µm; Waters, Irska) zagrijanu na 36 °C pri protoku od 0,4 mL/min. Mobilna faza se sastojala od acetonitrila (otopina A) i 10 mM HCOOH u H₂O (otopina B) i razdvajanje analita je izvršeno uz gradijent kako slijedi: 0–5 min 15% A, 5–15 min 45% A, 15–22,5 min 47,1% A. Nakon toga, kolona je isprana pomoću 100% A 0,5 min i ekvilibrirana 4 min na početne uvjete (15% A). Uzorci su nakon kolone odvedeni do izvora elektrona i ionizirani. Endogeni hormoni stresa i odgovarajući interni standardi detektirani su u MRM modu (eng. *Multiple Reaction Monitoring*) pomoću MRM tranzicija prekursora (m/z) i produkta (m/z) određenih spektrometrom masa te retencijskog vremena analita. Optimizirani UHPLC-MS/MS parametri prikazani su u Tablici X. MassLynx™ program (verzija 4,1, Waters, Milford, MA, SAD) korišten je za kontrolu uređaja i obradu podataka.



Slika 12. Waters Acquity UPLC®/ Xevo™ TQ MS uređaj (osobna fotografija).

Metodom razrijeđenja stabilnog izotopa određena je koncentracija hormona stresa u uzorku (Rittenberg i Foster 1940). Napravljena je baždarna krivulja serijom decimalnih razrijeđenja analita (1×10^{-4} – 1×10^{-10} M) uz dodatak IS u svako razrijeđenje u konačnoj koncentraciji od 1×10^{-6} M. Vrijednost na osi y predstavlja odziv (konc. IS × površina ispod pika analita/površina ispod pika IS), a vrijednost na osi x koncentraciju analita. Primjer baždarne krivulje stres hormona ABA prikazan je na Slici 13.

Compound name: ABA (263>153)
 Correlation coefficient: $r = 0.999847$, $r^2 = 0.999694$
 Calibration curve: $0.969376 * x + 0.464781$
 Response type: Internal Std (Ref 6), Area * (IS Conc. / IS Area)
 Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: Null, Axis trans: Log



Slika 13. Baždarna krivulja za izračun koncentracije ABA u uzorku.

Koncentracija analita u uzorku izračunata je prema formuli:

$$\text{koncentracija analita (pmol)} = 10^{\frac{\log_{10}(y)-b}{a}}, \quad y = A_a \times \frac{IS_c}{IS_a}$$

pri čemu je:

A_a = površina ispod pika analita;

IS_c = koncentracija IS u uzorku;

IS_a = površina ispod pika IS u uzorku;

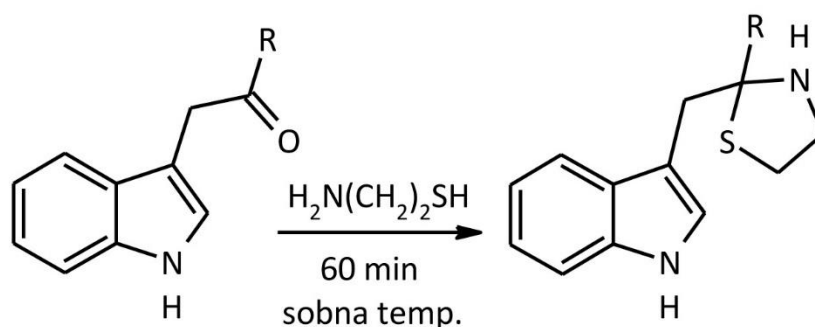
b = odsječak na osi y ; a = nagib pravca.

Tablica 3. Optimizirani UHPLC-MS/MS parametri za kvantifikaciju salicilne kiseline (SA), abscizinske kiseline (ABA), jasmonske kiseline (JA) i jasmonoil-izoleucina (JA-Ile): retencijsko vrijeme (RT), MRM prijelazi, ESI mod, kolizijska energija (CE), limit detekcije (LOD) i linearnosti mjerenja.

Analit	RT (min)	MRM prijelazi (m/z)	ESI mod	CE (V)	LOD (fmol)	Linearnost (pmol)/ R^2
		Prekursor > Produkt				
ABA	4,002 ± 0,002	263,2 > 153,1	-	12	0,5	0,01-100/0,997
[2H_6]-ABA	3,977 ± 0,005	269,1 > 159,0	-			
SA	4,381 ± 0,022	137,1 > 92,8	-	13	50	0,1-100/0,994
[2H_4]-SA	4,327 ± 0,021	141,1 > 96,8	-			
JA	4,804 ± 0,001	209,2 > 58,8	-	23	5	0,05-250/0,998
[2H_6]-JA	4,770 ± 0,005	215,1 > 58,8	-			
JA-Ile	5,837 ± 0,001	324,3 > 151,2	+	23	0,5	0,01-100/0,991
[2H_2]-JA-Ile	4,723 ± 0,004	326,1 > 151,2	+			

2.4.2. UHPLC-MS/MS analiza auksinskog metaboloma

Analiza auksinskog metaboloma izvršena je pomoću vezanog sustava tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (eng. *Ultra High Performance Liquid Chromatography*) koja koristi ultra visoke tlakove (oko 20 000 psi) i spektrometra masa s trostrukim kvadripolom prema metodi Novák i sur. (2012) uz manje modifikacije. Liofilizirani biljni materijal za analize hormona stresa usitnjen je pomoću tekućeg dušika u tarioniku do finog praha. Uzorci (2 mg tkiva) su homogenizirani su kugličnom mlinu (5 min, 27 Hz, Retsch GmbH, Haan, Njemačka) uz dodatak tri keramičke kuglice (cirkonij oksid, 2 mm) u 1 mL hladnog ekstrakcijskog pufera (50 mM natrij fosfatni, 0,1% DEDTCA, pH 7,0) koji je sadržavao stabilne deuterirane ^2H - ili ^{13}C - obilježene interne standarde (IS) hormona: [$^{13}\text{C}_6$]-ANT, [$^{13}\text{C}_6$]-IAA, [$^{13}\text{C}_6$]-IAM, [$^2\text{H}_5$]-IAOx, [$^2\text{H}_4$]-IPyA, [$^{13}\text{C}_6$]-oxIAA, [$^2\text{H}_2$]-TRA, [$^{13}\text{C}_6$]-IAAsp, [$^{13}\text{C}_6$]-IAGlu, [$^{13}\text{C}_6$]-IAA-glc, [$^{13}\text{C}_6$]-oxIAA-glc (5 pmol po uzorku); [$^{13}\text{C}_6$]-IAN (10 pmol po uzorku) i [$^2\text{H}_5$]-TRP (50 pmol po uzorku). Po završetku, homogenati su ekstrahirani (15 min, 15 rpm, +4 °C, Stuart, Staffordshire, UK) nakon čega su centrifugirani (15 min, 14 000 rpm, +4°C). Supernatanti su podjeljeni u dva jednaka volumena. Prvi volumen tretiran je s 1 M HCl do pH 2,7 neposredno prije pročišćavanja na SPE (eng. Solid Phase Extraction) HLB kolonama metodom obrnutih faza (1 cc/30 mg Oasis[®], Waters, Milford, MA, SAD). Drugi volumen supernatanta (oko 0,5 mL inkubiran je s 3 mL 0,25 M otopine cisteamina (pH 8,0 podešen s NH_3) sat vremena na sobnoj temperature u svrhu derivatizacije nestabilnog auksinskog prekursora IPyA. Po završetku reakcije, supernatant je tretiran s 3 M HCl do pH 2,7 neposredno prije pročišćavanja na SPE HLB kolonama (1 cc/30 mg Oasis[®], Waters, Milford, MA, SAD). Reakcija derivatizacije IPyA sa cisteaminom i nastanak stabilnog tiazolinidinskog derivata IPyA-TAZ prikazana je na Slici 14.



Slika 14. Derivatizacija nestabilnog auksinskog prekursora IPyA (R = COOH).

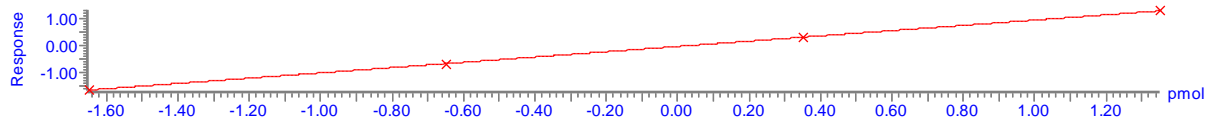
SPE pročišćavanje uzoraka obuhvaćalo je iduće korake:

- 1) kondicioniranje kolone s 1 mL 100% MeOH, 1 mL H₂O i 0,5 mL Na fosfatnog pufera (pH 2,7)
- 2) nanošenje uzorka na kolonu
- 3) ispiranje s 2 mL 5% MeOH
- 4) elucija s 2 mL 80% MeOH

Uzorci su upareni do suha u vakuum uparivaču i pohranjeni na -20 °C do analiza. Analiza je izvršena na uređaju Acquity UPLC[®] System (Waters, Milford, MA, SAD) povezanom na Xevo[™] TQ MS trostruko kvadripolni spektrometar masa (Waters MS Technologies, Manchester, UK) u pozitivnom ESI modu. Prije analize, talozi su otopljeni u 40 µL mobilne faze (10% MeOH, proflitirani kroz Micro-spin[®] filtere (0,2 µm, Grace; 3 min pri 8000 rpm) i 10 µL svakog uzorka je injektirano u RP kolonu (Kinetex C18 100A; 2,1 × 50 mm, 1,7 µm; Phenomenex) zagrijanu na 30 °C pri protoku od 0,2 mL/min. Mobilna faza se sastojala od 0,1% octene kiseline u MeOH (otopina A) i 0,1% octene kiseline u H₂O (otopina B) i razdvajanje analita je izvršeno uz gradijent kako slijedi: 0 min, 10:90 A:B; 10,0 min, 50:50 A:B; 12,5 min, 60:40 A:B. Na kraju gradijenta, kolona je isprana pomoću 100% A (2,5 min) i ekvilibrirana na početne uvjete 10 % A (5 min). Uzorci su nakon kolone odvedeni do izvora elektrona i ionizirani. Endogeni spojevi i odgovarajući interni standardi detektirani su u MRM modu (eng. *Multiple Reaction Monitoring*) pomoću MRM tranzicija prekursora (m/z) i produkta (m/z) određenih spektrometrom masa te retencijskog vremena analita. Optimizirani UHPLC-MS/MS parametri prikazani su u Tablici 4. MassLynx[™] program (verzija 4,1, Waters, Milford, MA, SAD) korišten je za kontrolu uređaja i obradu podataka.

Metodom razrijeđenja stabilnog izotopa (Rittenberg i Foster, 1940) određena je koncentracija indolnih prekursora biosinteze IAA, aktivnog auksina IAA i IAA konjugata u uzorku. Napravljena je baždarna krivulja serijom decimalnih razrijeđenja analita (1×10^{-4} – 1×10^{-10} M) uz dodatak IS u svako razrijeđenje u konačnoj koncentraciji od 1×10^{-6} M. Vrijednost na osi y predstavlja odziv (konc. IS × površina ispod pika analita/površina ispod pika IS), a vrijednost na osi x koncentraciju analita. Primjer baždarne krivulje prikazan je na Slici 15.

Compound name: IAA (176>130)
 Correlation coefficient: $r = 0.999920$, $r^2 = 0.999840$
 Calibration curve: $0.981197 * x + -0.0280907$
 Response type: Internal Std (Ref 10), Area * (IS Conc. / IS Area)
 Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: Null, Axis trans: Log



Slika 15. Baždarna krivulja za izračun koncentracije IAA u uzorku.

Koncentracija analita auksinskog metaboloma izračunata je pomoću baždarnog pravca i poznate koncentracije internog standarda u uzorku prema formulama:

$$\text{koncentracija analita (pmol)} = 10^{\frac{\log_{10}(y)-b}{a}}, \quad y = A_a \times \frac{IS_c}{IS_a}$$

pri čemu je:

A_a = površina ispod pika analita;

IS_c = koncentracija IS u uzorku;

IS_a = površina ispod pika IS u uzorku;

b = odsječak na osi y ;

a = nagib pravca.

Tablica 4. Optimizirani UHPLC-MS/MS parametri za kvantifikaciju prekursora biosinteze IAA, IAA i konjugata: retencijsko vrijeme (RT), MRM prijelazi, kolizijska energija (CE), limit detekcije (LOD) i linearnosti u pozitivnom ESI modu.

Analit	RT (min)	MRM prijelazi	CE (V)	LOD (fmol)	Linearnost (pmol)/R ²
		(<i>m/z</i>) Prekursor > Produkt			
TRP	2,075 ± 0,050	205,2 > 146,1	14	5,0	0,025–500/0,9989
[² H ₅]-TRP		210,2 > 150,1			
TRA	2,225 ± 0,057	161,1 > 144,1	6	2,5	0,005-500/0,9993
[² H ₂]-TRA		163,1 > 146,1			
oxIAA-Glc	3,400 ± 0,13	192,2 > 146,1	14	50	0,100-100/0,9991
[¹³ C ₆]-oxIAA-Glc		198,2 > 152,1			
ANT	4,227 ± 0,047	138,1 > 120,1	4	2,5	0,005-500/0,9997
[¹³ C ₆]-ANT		144,1 > 126,1			
IAM	4,378 ± 0,043	175,2 > 130,1	10	5,0	0,01-500/0,9996
[¹³ C ₆]-IAM		181,2 > 136,1			
IAAsp	4,903 ± 0,028	291,2 > 130,1	20	2,5	0,005-500/0,9994
[¹³ C ₆]-IAAsp		297,2 > 136,1			
oxIAA	5,011 ± 0,023	192,2 > 146,1	9	1,0	0,005-500/0,9998
[¹³ C ₆]-oxIAA		198,2 > 152,1			
IAA-Glc	4,481 ± 0,027	176,2 > 130,1	16	50	0,100-100/0,9976
[¹³ C ₆]-IAA-Glc		182,2 > 136,1			
IAA-Glu	5,492 ± 0,025	305,2 > 130,1	22	2,5	0,005-500/0,9999
[¹³ C ₆]-IAA-Glu		311,2 > 136,1			
IAA	7,198 ± 0,014	176,2 > 130,1	11	5,0	0,01-500/0,9994
[¹³ C ₆]-IAA		182,2 > 136,1			
<i>trans</i> -IAOx	7,576 ± 0,007	175,2 > 158,1	8	5,0	0,01-500/0,9989
[¹³ C ₆]- <i>t</i> IAOx		180,2 > 163,1			
IAN	7,988 ± 0,014	157,2 > 130,1	6	5,0	0,025-500/0,9991
[¹³ C ₆]-IAN		163,2 > 136,1			
<i>cis</i> -IAOx	8,248 ± 0,012	175,2 > 158,1	8	5,0	0,01-500/0,9987
[² H ₅]- <i>c</i> IAOx		180,2 > 163,1			
IPyA-TAZ	3,606 ± 0,012	263,1 > 132,1	11	5,0	0,01-100/0,9988
[² H ₄]- IPyA-TAZ		267,1 > 136,1			

2.5. ANALIZE EKSPRESIJE GENA ZA AUKSIN-AMIDOHIDROLAZE

2.5.1. Izolacija ukupne RNA i cDNA sinteza

Prije postupka izolacije RNA sav pribor je steriliziran i sve površine su prebrisane deterгентom za uklanjanje RNAza (1% SDS, 0,1 M NaOH, 1 mM EDTA). Uzorci tkiva korijena i listova kineskog kupusa pohranjeni na -80 °C usitnjeni su u tarioniku do finog praha pomoću tekućeg dušika. Uzorci (100 mg) su prebačeni u sterilne tubice pazeći da se tkivo ne otopi i homogenizirani u 1 mL RNAzola®RT (Molecular Research Center). Homogenati su pomiješani s 0,4 mL vode i inkubirani 15 min na sobnoj temperaturi radi taloženja DNA i proteina te zatim centrifugirani (12 000 g, 30 min, +4 °C). Supernatantima (1 mL) je dodan jednak volumen izopropanola radi taloženja RNA, zatim su inkubirani (30 min, +4 °C), centrifugirani (12 000 g, 10 min, +4 °C) i istaložena ukupna RNA bila je prisutna u obliku bijelog ili prozirnog taloga. Dobiveni talog je ispran dva puta s 0,4 mL 75% EtOH između dva koraka centrifugiranja (4 000 g, 3 min, +4 °C). Potom je RNA resuspendirana u 15, odnosno 20 µL sterilne vode u slučaju uzoraka korijena, odnosno lista te po dvije tehničke replike svake biološke replike spojene su zajedno prije određivanje koncentracije na BioDrop uređaju (Isogen Life Science B.V., De Meern, Nizozemska). RNA je pohranjena na -80 °C do tretmana DNazom radi uklanjanja zaostale DNA. Uklanjanje DNA izvršeno je u ukupnom volumenu reakcijske smjese od 50 µL pri čemu je u reakciju dodano 40 µg RNA listova odnosno 60 µg RNA korijena te 40, odnosno 60 U DNaze (10 U/µL, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Njemačka), 5 µL DNaznog pufera (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Njemačka; 10 ×, 400 mM Tris-HCl pH 8,0, 100 mM NaCl, 60 mM MgCl₂, 10 mM CaCl₂), 40, odnosno 60 U Ribolock inhibitora RNaze (40 U/µL, Thermo Fischer Scientific, Massachusetts, SAD) i voda. Reakcija je provedena 30 min na 37 °C te je po završetku u reakcijsku smjesu dodano 150 µL vode i 200 µL kloroform:izoamilnog alkohola (24:1, v/v) kako bi se uklonila DNaza. Uzorci su dobro promiješani i centrifugirani (12 000 g, 10 min, +4 °C) te gornja vodena faza prebačena je u čistu tubicu pazeći da sloj između faza u kojima se nalazi enzim ostane intaktan. Pročišćenoj RNA dodan je dvostruki volumena 96% etanola i taloženje je provedeno na -80 °C (preko noći). Ovako pohranjena RNA pogodna je za dugoročno čuvanje. Istaložena RNA spuštana je u talog centrifugiranjem (10 000 rpm, 20 min, +4 °C) i dva puta oprana s 0,5 mL 75% EtOH (v/v) između dva koraka centrifugiranja (4 000 g, 3 min, +4 °C). Talozni su resuspendirani u 20 µL sterilne vode i određena je koncentracija RNA u uzorcima i odnosi A₂₆₀/A₂₈₀ i A₂₆₀/A₂₃₀ koji su iznosili 2,0 ukazujući na zadovoljavajuću čistoću RNA.

Reverzna transkripcija RNA u cDNA izvršena je pomoću Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fischer Scientific, Massachusetts, SAD) prema uputama proizvođača koristeći 5 µg RNA po reakciji. Sintetizirana cDNA pohranjena je na -80 °C do daljnje uporabe.

2.5.2. Izrada početnica za praćenje ekspresije gena

Početnice za praćenje ekspresije gena auksin-amidohidrolaza (Tablica 5) u vrsti *Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis* kreirane su pretraživanjem nukleotidnih sekveneci u on-line bazama podataka Ensembl Plant (<http://plants.ensembl.org/index.html>) i upotrebom kompjuterskog on-line programa Primer Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) i QuantPrime (<http://www.quantprime.de/>) koristeći u pretražniku pojam *B.rapa* uz ograničavanje pretrage na zadane standardne parametre na tim stranicama. Kao referentni gen ekspresije (eng. *housekeeping gene*) odabran je gen za poliubikvitin-C (UBC) koji prema radu autora Qi i sur. (2010) pokazuje stabilnu ekspresiju u uvjetima abiotskog stresa u vrsti *Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*. Početnice su sintetizirane servisno (Macrogen Europe, Amsterdam, Nizozemska).

Tablica 5. Nukleotidni slijedovi početnica korišteni pri analizi ekspresije gena metodom qRT-PCR. F (eng. *forward*)-uzvodna početnica, R (eng. *reverse*)- nizvodna početnica

Auksin-amidohidrolaza	Pristupni broj za gen	Slijed početnice (5'→3')
IAR3	Bra030419	F: AGACATCTAGGCTCGTTAGGAC R: ATTCCACCATCTCCTGCATAGC
ILL2	Bra002800	F: TGCGTTGACTATGCAGGAAG R: CCTGTAACACGTGGAGATGTTG
ILR1	Bra040608	F: GCAGCTACACCACATTTGTCC R: GTATCCAACCGTAACCACACC
Referentni gen	Pristupni broj za gen	Slijed početnice (5'→3')
UBC	GO479262	F: TAACTGCGACTCAGGGAATCTT R: TCATCCTTTCTTAGGCATAGCG

2.5.3. Kvantitativna lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu

Ekspresija gena za auksin amidohidrolaze *BraIAR3*, *BraILL2* i *BraILR1* u korijenu i listovima kineskog kupusa uslijed povišenog saliniteta praćena je metodom kvantitativne lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu (eng. *real-time PCR*, *quantitative RT-PCR*, qRT-PCR).

2.5.3.1. Mjerenje efikasnosti reakcije qRT-PCR

Precizno praćenje ekspresije gena od interesa zahtijeva provjeru kvalitete početnice i kalupa mjerenjem efikasnosti vezanja para početnica na kalup (Pfaffl 2004) pri čemu je dozvoljena efikasnosti reakcije od 95–110%. Za provjeru efikasnosti vezanja početnica priređen je zajednički uzorak cDNA korijena miješanjem jednakih volumena svih uzoraka cDNA korijena. Iz zajedničkog uzorka cDNA korijena priređena je serija razrijeđenja: 10×, 50×, 250× i 1250×.

Isti postupak ponovljeni je i za zajednički uzorak cDNA listova. Reakcijska smjesa ukupnog volumena 15 µL priređena je prema uputama proizvođača (Applied Biosystems, Massachusetts, SAD) koristeći Power Sybr Green mastermix, 300 nM početnica i 3 µL uzorka. Svaki uzorak razrijeđenja (3 µL) unešen je u triplikatu na optičku mikrotitarsku pločicu s 96 jažica (Applied Biosystems, Massachusetts, SAD) uključujući i negativnu kontrolu (uzorak koji umjesto kalupa sadrži sterilnu vodu) i uzorak genomske DNA. Mjerenje je provedeno na uređaju Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Massachusetts, SAD) pri uvjetima: aktivacija 2 min na 50 °C, denaturacija 10 min na 95 °C, 40 ciklusa denaturacije 15 s na 95 °C i 40 ciklusa produljivanja lanca 1 min na 60 °C. Nakon svakog qRT-PCR slijedilo je mjerenje disocijacijske krivulje radi praćenja nastanka nespecifičnih produkata reakcije.

Baždarna krivulja priređena je na temelju ovisnosti Ct vrijednosti o razrijeđenju uzorka cDNA (\log_{10} broja kopija) i izračunata je efikasnost reakcije (E) prema formuli:

$$E = 10^{\left(\frac{-1}{\text{nagib pravca}}\right) - 1}$$

2.5.3.2. Mjerenje ekspresije gena *BraIAR3*, *BraILL2* i *BraILR1*

Mjerenje ekspresija gena za auksin-amidohidrolaze u korijenu i listovima kineskog kupusa uslijed povišenog saliniteta provedeno je na isti način kao i mjerenje efikasnosti vezanja početnica na kalup. U qRT-PCR reakciju ukupnog volumena 15 µL unešeno je 3 µL 10× razrijeđene cDNA svakog uzorka što odgovara količini cDNA od oko 75 ng i mjerenje je provedeno kako je prethodno opisano. Ekspresija gena u uzorcima izmjerena je minimalno dva puta u nezavisnim qRT-PCR reakcijama. Za svako mjerenje ekspresije gena od interesa u uzorku ili referentnog gena na jednoj pločici od 96 jažica određena je i efikasnost reakcije pomoću baždarne krivulje za promatrani gen kako je prethodno opisano. Ekspresija auksin-amidohidrolaza u uzorcima određena je iz baždarne krivulje prema metodi Larionov i sur. (2005) pri čemu je broj kopija gena od interesa normaliziran u odnosu na broj kopija referentnog gena u uzorku. Ekspresija auksin-amidohidrolaza uslijed solnog stresa prikazana je u odnosu na kontrolne uzorke pri čemu je kontroli dodjeljena vrijednosti 1.

2.6. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

Statistička obrada podataka izvršena je u programu XLSTAT 2016 (Addinsoft, New York, SAD) uz primjenu analize varijance (engl. *analysis of variance* – ANOVA) uz Tukey HSD (eng. *honest significant difference*) *post hoc* statistički test značajnosti utjecaja primijenjenih solnih tretmana na fiziološke i biokemijske parametre odgovora klijanaca i biljaka kineskog kupusa. Također, isti statistički test primijenjen je za analize hormona stresa i auksinskog metaboloma uslijed povišenog saliniteta u klijancima kineskog kupusa. Statistički značajne razlike prikazane su različitim slovima uz razinu značajnosti od 0,05 ($p < 0,05$).

Hormonski odgovor triju kupusnjača, hormonski odgovor divljeg tipa i mutanti uročnjaka te analiza ekspresije gena u korijenu i listovima kineskog kupusa uslijed solnih tretmana analizirani su Studentovim t-testom nakon normalizacije pojedinog tretmana na odgovarajuće kontrole. Kontrolama je dodjeljena vrijednosti 1, a statistički značajne razlike uz razinu značajnosti od 0,05 ($p < 0,05$) između kontrole i pojedinog solnog tretmana prikazane su zvjezdicama pri čemu *, **, i *** odgovaraju redom p-vrijednostima $0,05 > p > 0,01$; $0,01 > p > 0,001$; i $p < 0,001$.

Svi rezultati prikazani su kao srednje vrijednosti \pm standardna devijacija (SD) gdje je za svako mjerenje naveden broj ponavljanja.

3. REZULTATI

3.1. ODGOVOR KLIJANACA KINESKOG KUPUSA *B. rapa* NA POVIŠENI SALINITET

Odgovor klijanaca kineskog kupusa *B. rapa* na povišen salinitet praćen je na fiziološkoj, biokemijskoj i hormonskoj razini.

3.1.1. Fiziološki i biokemijski odgovori

Kao fiziološki odgovor na solni stres bila je mjerena biomasa klijanaca, praćen rast korijena te mjerena fotosintetska učinkovitost fotosustava II u kotiledonima klijanaca. U okviru biokemijskog odgovora klijanaca na solni stres analizirala sam sadržaj iona Na^+ i K^+ , sadržaj osmolita prolina, intenzitet nakupljanja reaktivnih kisikovih čestica, te antioksidacijski odgovor klijanaca: enzimatski (specifične aktivnosti antioksidacijskih enzima) i ne-enzimatski (askorbinska kiselina, glutation i fenolne kiseline). Konačno, kao pokazatelji oštećenja klijanaca uslijed stresa izmjereni su produkti lipidne peroksidacije (malondialdehidi) i proteinske reaktivne karbonilne grupe (karbonili).

3.1.1.1. Promjene u biomasi klijanaca, rastu korijena i fotosintetskoj učinkovitosti fotosustava II kotiledona

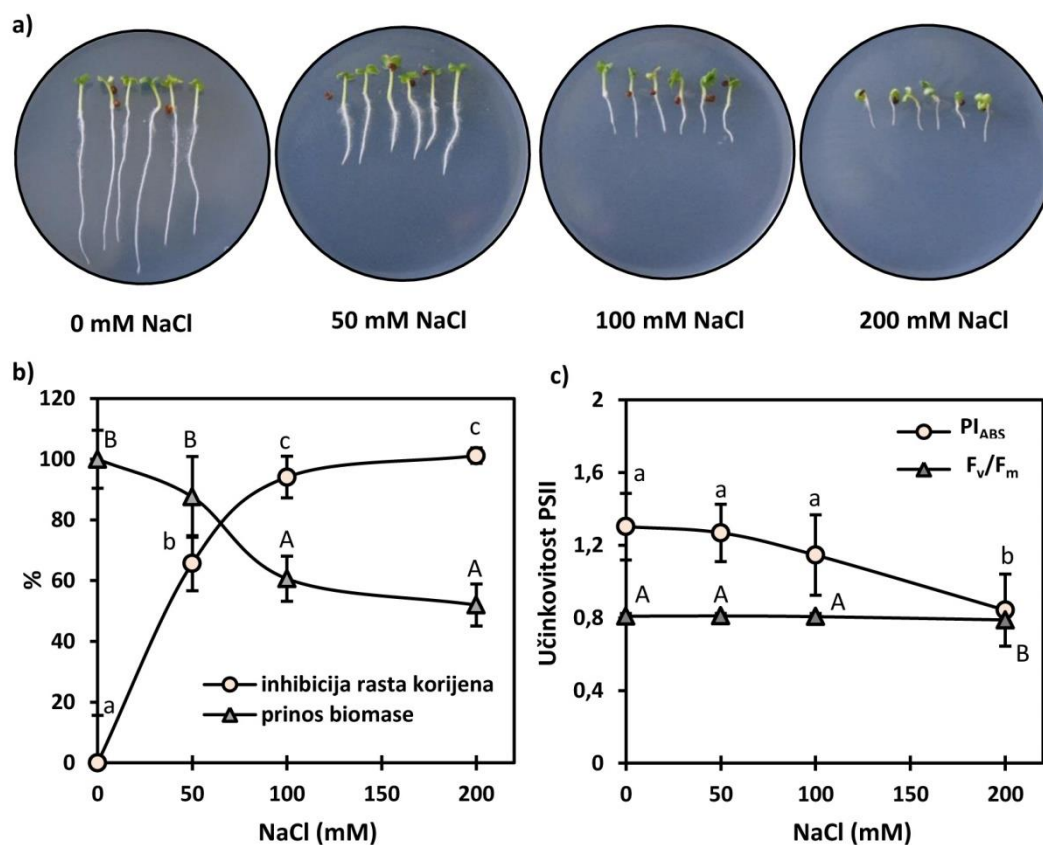
Prinos biomase klijanaca, rast korijena te fotosintetska učinkovitost fotosustava II u kotiledonima kineskog kupusa ispitani su na podlogama uz dodatak NaCl u koncentracijama 0-200 mM (Slika 16).

Prisutnost soli u podlogama uzrokovala je smanjenje prinosa biomase klijanaca u skladu s porastom koncentracije NaCl. Tretman 50 mM natrijevim kloridom rezultirao je smanjenjem prinosa za 10 % u odnosu na kontrolne klijance. Prinos biomase na višim koncentracijama soli (100 i 200 mM) iznosio je 60 % prinosa kontrolnih klijanaca.

Testovi inhibicije rasta korijena (Slika 16a i 16b) pokazali su inhibitorni učinak soli u skladu s porastom koncentracije NaCl (50, 100 i 200 mM) na rast korijena klijanaca kineskog kupusa. Tretman najnižom koncentracijom soli (50 mM) inhibirao je rast korijena kineskog kupusa za 63%, a tretman 100 mM soli rezultirao je 94% inhibicijom rasta korijena kineskog kupusa u odnosu na kontrolne klijance. Pri najvišoj koncentraciji soli (200 mM), rast korijena kineskog kupusa bio je u potpunosti inhibiran (100%).

Utjecaj solnog stresa na fotosintetsku učinkovitost fotosustava II kotiledona klijanaca kineskog kupusa prikazan je na Slici 16c. Fotosintetska učinkovitost fotosustava II dobivena mjerenjima fluorescencije klorofila *a* iskazana je pomoću dva parametra: indeksom fotosintetske učinkovitosti (PI_{ABS}) i maksimalnim prinosom kvanta fotosustava II (F_v/F_m). Rezultati pokazuju da je najviša koncentracija soli (200 mM) negativno utjecala na parametre fotosintetske učinkovitosti. Vrijednosti oba parametara PI_{ABS} i F_v/F_m pri 200 mM natrijeva

klorida bile su statistički značajno niže u odnosu na kontrolne klijance i klijance tretirane s 50 i 100 mM NaCl.



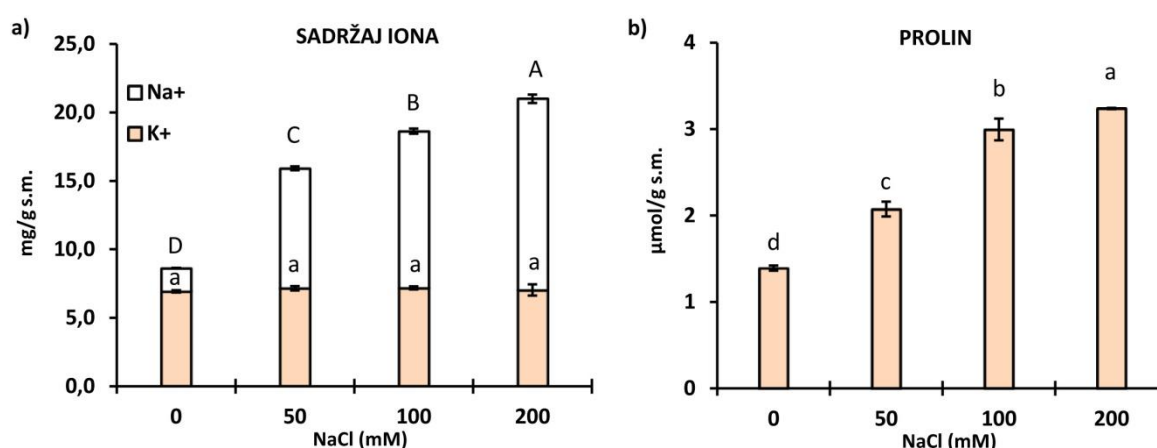
Slika 16. Klijanci kineskog kupusa uslijed solnog stresa (0-200 mM NaCl) nakon 24 h tretmana (a), inhibicija rasta korijena klijanaca kineskog kupusa i prinos biomase izražene kao postotak (%) u odnosu na odgovarajuće kontrole (b) i učinkovitost fotosustava II u kotiledonima (c). Rezultati su srednja vrijednost \pm SD ($n=30$ pri (b); $n=16$ pri (c)). Na slici (b), različita velika slova predstavljaju statistički značajne razlike prinosa biomase, a mala slova predstavljaju statistički značajne razlike inhibicije rasta korijena; na slici (c), različita velika slova predstavljaju statistički značajne razlike u vrijednostima F_v/F_m , a mala slova predstavljaju statistički značajne razlike u vrijednostima PI_{ABS} (c). Vrijednosti označene različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ($p < 0,05$).

3.1.1.2. Sadržaj iona natrija i kalija i osmolita prolina

Promjene u sadržaju iona kalija i natrija u klijancima kineskog kupusa uslijed solnog stresa prikazane su na Slici 17a, a utjecaj saliniteta na nakupljanje osmolita prolina u klijancima kineskog kupusa prikazan je na Slici 17b.

Sadržaj iona kalija ostao je nepromijenjen pri sve tri koncentracije NaCl (50, 100, 200 mM) te jednak sadržaju iona kalija u kontrolnim klijancima ($6,9 \pm 0,09$ mg/g s.m.). U kontrolnim klijancima izmjereno je $1,7 \pm 0,03$ mg/g s.m. iona natrija, a povišenje saliniteta rezultiralo je značajnim kontinuiranim porastom iona natrija ($8,8 \pm 0,14$, $11 \pm 0,18$ i $14 \pm 0,31$ mg/g s.m. pri 50, 100 i 200 mM soli). Sukladno tome, omjer iona natrija i kalija (Na^+/K^+) u tretiranim klijancima bio je povišen u korist iona natrija te je iznosio 1,22, 1,59 i 1,98 pri 50, 100 i 200 mM NaCl, dok je Na^+/K^+ omjer u kontrolnim klijancima iznosio 0,24.

Solni stres utjecao je i na kontinuirani porast prolina u klijancima kineskog kupusa. Količina prolina u netretiranim klijancima iznosila je $1,39 \pm 0,03$ $\mu\text{mol/g}$ s.m. Povišenje koncentracije soli rezultiralo je pojačanim nakupljanjem prolina u tretiranim klijancima pri čemu je porast prolina za svaku koncentraciju soli bio statistički značajan te je najviše prolina ($3,24 \pm 0,01$ $\mu\text{mol/g}$ s.m.) izmjereno pri najvišem salinitetu (200 mM).

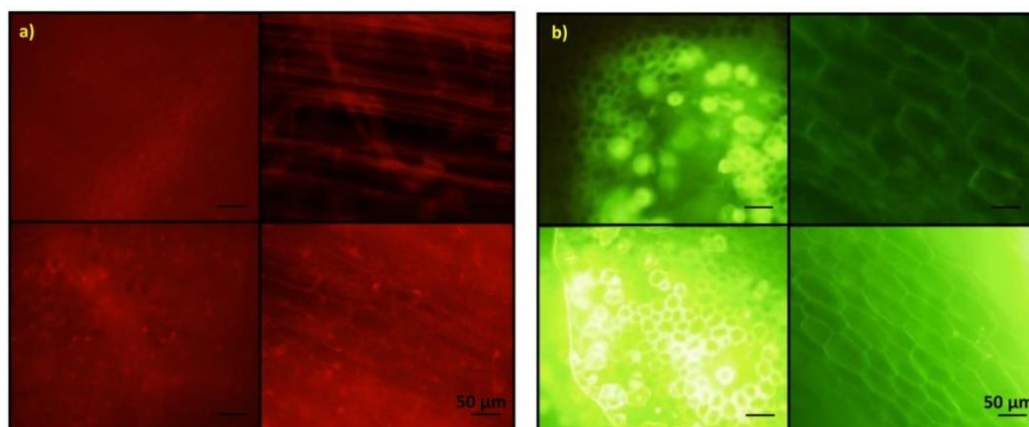


Slika 17. Sadržaj iona natrija i kalija (a) i prolina (b) u klijancima kineskog kupusa uslijed solnog stresa (0-200 mM NaCl). Rezultati su srednja vrijednost \pm SD ($n=3$ pri (a); $n=4$ pri (b)). Vrijednosti označene različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ($p < 0,05$).

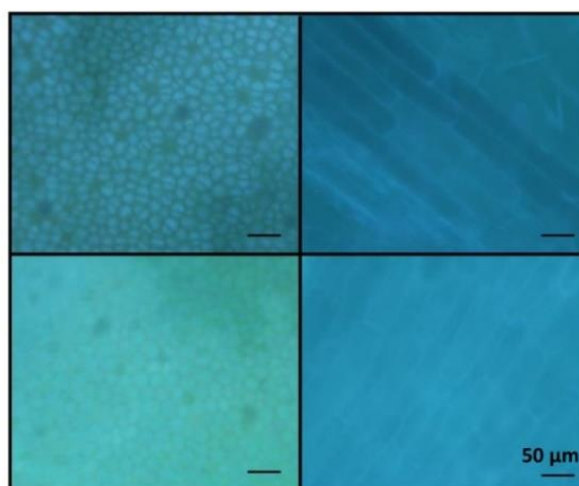
3.1.1.3. Određivanje reaktivnih kisikovih čestica i glutationa *in situ*

Promjene u redoks potencijalu klijanaca kineskog kupusa izloženih solnom stresu praćene su *in situ* metodom fluorescencijske mikroskopije. Pri tome su korištene karakteristične boje koje reagiraju s reaktivnim kisikovim česticama (ROS) i reduciranim glutationom (GSH) rezultirajući pojavom fluorescencije. Reprezentativni primjer fluorescencije nastale kao

rezultat prisutnosti ROS i GSH kod kontrolnih klijanaca i klijanca tretiranih najvišom koncentracijom soli (200 mM) prikazana je na Slikama 18 i 19x.

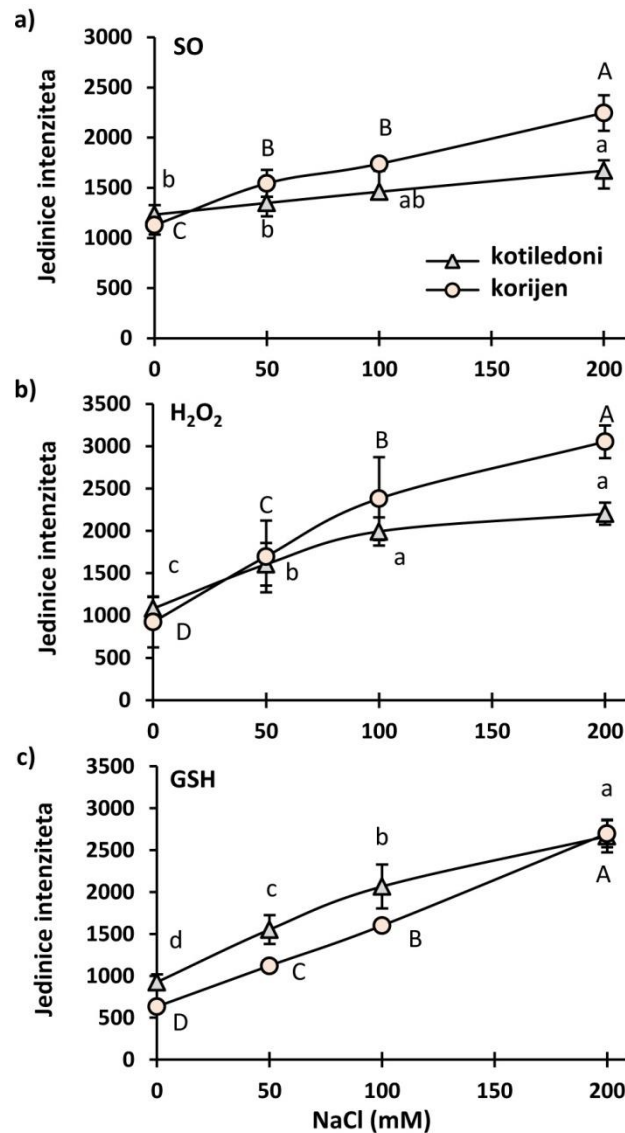


Slika 18. Mikroskopska fotografija fluorescncije *in situ* reaktivnih kisikovih čestica: superoksidnog radikala (a) i vodikova peroksida (b) u kotiledonima (lijevi dio panela) i korijenu (desni dio panela) u klijancima kineskog kupusa pri tretmanu 200 mM NaCl (donji red) u odnosu na kontrolu (gornji red: 0 mM NaCl). Bar = 50 μm.



Slika 19. Mikroskopska fotografija fluorescencije *in situ* reduciranog glutationa u kotiledonima (lijevi dio panela) i korijenu (desni dio panela) u kontrolama (gornji red) i u klijancima tretiranim 200 mM NaCl (donji red). Bar = 50 μm.

Rezultati kvantifikacije intenziteta fluorescencije reaktivnih kisikovih čestica (Slika 20a i 20b) i glutationa (Slika 20c) upućuju na promjene u redoks statusu klijanaca uslijed povišenog saliniteta.



Slika 20. Rezultati kvantifikacije *in situ* mjerenja intenziteta fluorescencije u klijancima kineskog kupusa uslijed solnog stresa (0-200 mM NaCl): (a) superoksidni radikal (SO), vodikov peroksid (H₂O₂) i (c) reducirani glutation (GSH). Rezultati su srednja vrijednost \pm SD (n=5). Različita velika slova predstavljaju statistički značajne razlike u korijenu klijanaca, a različita mala slova predstavljaju statistički značajne razlike u kotiledonima klijanaca ($p < 0,05$).

Tretmani NaCl (50, 100 i 200 mM) uzrokovali su kontinuirani porast superoksidnog radikala u korijenu klijanaca s porastom koncentracije saliniteta na statistički značajnoj razini. U kotiledonima tretiranih klijanaca značajno nakupljenje superoksidnog radikala detektirano je pri najvišoj koncentraciji soli (200 mM). Tretman 100 mM soli djelomično je utjecao na porast superoksidnog radikala u kotiledonima tretiranih klijanaca. Najniža koncentracija soli (50 mM) nije utjecala na promjene u superoksidnom radikalu i kvantificirane vrijednosti odgovarale su onima u kontrolnim klijancima.

Sličan trend zabilježen je i u nakupljanju vodikova peroksida uslijed povišenog saliniteta. Tretmani NaCl (50, 100 i 200 mM) uzrokovali su kontinuirani porast sadržaja vodikova peroksida u korijenu klijanaca na statistički značajnoj razini pri svim koncentracijama soli. Također, kotiledoni klijanaca značajno su nakupljali vodikov peroksid uslijed solnog stresa pri čemu je najviši sadržaj vodikovog peroksida izmjeren na 100 i 200 mM soli.

Porast reaktivnih kisikovih čestica uslijed povišenog saliniteta pratilo je i nakupljanje glutationa u klijancima. Zabilježen je kontinuirani i statistički značajan porast glutationa u kotiledonima i korijenu klijanaca kineskog kupusa u skladu s porastom koncentracije soli. Porast reaktivnih kisikovih čestica i glutationa pri svim koncentracijama soli bio je izraženiji u korijenu klijanaca u odnosu na kotiledone.

3.1.1.4. Antioksidacijski odgovor: aktivnosti antioksidacijskih enzima

Specifične aktivnosti antioksidacijskih enzima katalaze (CAT), askorbat peroksidaze (APX), gvajakol peroksidaze (GPOX) i superoksid dismutaze (SOD) u klijancima kineskog kupusa uslijed povišenog saliniteta prikazane su u Tablici 6.

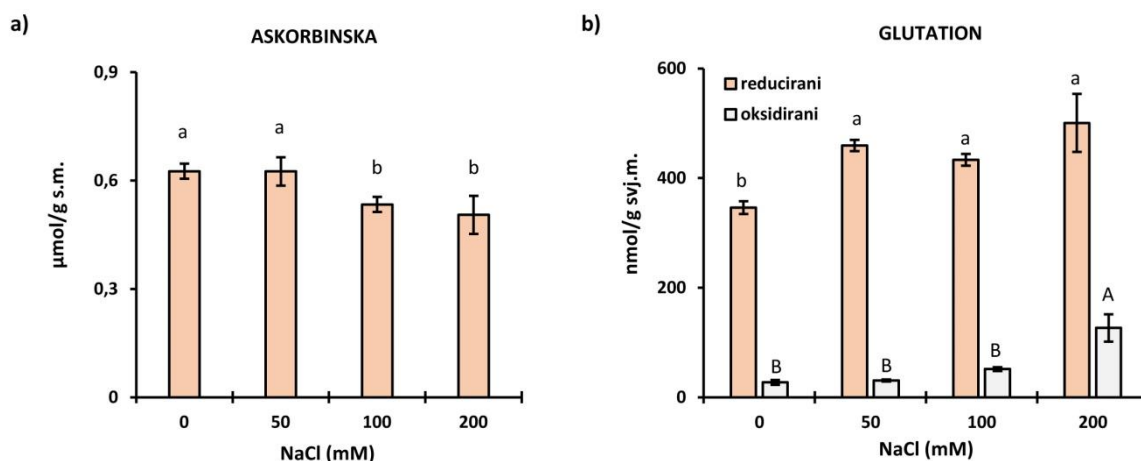
Tablica 6. Specifične aktivnosti antioksidacijskih enzima: katalaze (CAT), askorbat peroksidaze (APX), gvajakol peroksidaze (GPOX) i superoksid dismutaze (SOD) u klijancima kineskog kupusa uslijed solnog stresa (0-200 mM NaCl). Aktivnosti enzima definirana je kao jedinica aktivnosti po miligramu proteina (U/mg proteina). Rezultati su srednja vrijednost \pm SD (n=4). Vrijednosti označene različitim slovima u svakom stupcu međusobno se statistički značajno razlikuju ($p < 0,05$).

NaCl (mM)	CAT	APX	GPOX	SOD
0	0,72 \pm 0,01 ^a	0,97 \pm 0,02 ^b	2,96 \pm 0,06 ^a	9,51 \pm 0,18 ^a
50	0,57 \pm 0,03 ^b	1,99 \pm 0,30 ^a	2,91 \pm 0,08 ^a	10,24 \pm 1,22 ^a
100	0,58 \pm 0,03 ^b	1,84 \pm 0,36 ^a	2,83 \pm 0,21 ^a	11,15 \pm 1,67 ^a
200	0,58 \pm 0,02 ^b	1,79 \pm 0,29 ^a	1,44 \pm 0,15 ^b	11,41 \pm 0,97 ^a

Solni tretmani (50, 100 i 200 mM NaCl) utjecali su na specifične aktivnosti CAT, APX i GPX na statistički značajnoj razini. Aktivnost CAT u klijancima kineskog kupusa bila je statistički niža, a aktivnost APX statistički viša pri svim tretmanima u odnosu na kontrolne klijance. Aktivnost GPOX bila je statistički niža samo pri najvišoj koncentraciji NaCl (200 mM) dok aktivnost SOD nije pokazala statistički značajnu razliku uslijed tretmana.

3.1.1.5. Antioksidacijski odgovor: sadržaj askorbinske kiseline i glutationa

Spektrofotometrijskim metodama određen je utjecaj solnog stresa na glavne komponente aksoibat-glutation ciklusa, askorbinsku kiselinu i glutation (Slika 21).



Slika 21. Sadržaj askorbinske kiseline (a) i oksidiranog i reduciranog glutationa (b) u klijancima kineskog kupusa uslijed solnog stresa (0-200 mM NaCl). Rezultati su srednja vrijednost \pm SD ($n=4$ pri (a); $n=3$ pri (b)). Vrijednosti označene različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ($p < 0,05$).

Tretmani višim koncentracijama soli (100 i 200 mM) utjecali su na značajno smanjenje askorbinske kiseline u odnosu na njen sadržaj u kontrolnim klijancima i klijancima tretiranim s 50 mM soli.

Solni tretmani pri koncentracijama 50, 100 i 200 mM NaCl uzrokovali su statistički značajan porast reduciranog glutationa u tretiranim klijancima u odnosu na kontrolne klijance. Statistički značajan porast oksidiranog glutationa utvrđen je samo pri najvišoj koncentraciji soli (200 mM).

3.1.1.6. Antioksidacijski odgovor: profil i sadržaj fenolnih kiselina

Sastav fenolnih kiselina (slobodnih i vezanih na stanične stijenke) u klijancima kineskog kupusa uslijed povišenog saliniteta određen je tekućinskom kromatografijom visoke učinkovitosti uz korištenje spektrometra masa (UHPLC-MS/MS). Dobiveni rezultati prikazani su u Tablici 7.

U netretiranim klijancima kineskog kupusa najzastupljenija slobodna fenolna kiselina je sinapinska kiselina (43 $\mu\text{g/g}$ s.m.), a zatim slijedi salicilna (17 $\mu\text{g/g}$ s.m.) i ferulinska kiselina (1,3 $\mu\text{g/g}$ s.m.). Ostale kiseline u slobodnom obliku bile su prisutne u koncentraciji nižoj od 1

$\mu\text{g/g}$ s.m. ili nisu detektirane korištenom metodom (galna, gentisinska, *m*-hidroksibenzojeva, vanilinska, izoferulinska). Solni tretmani rezultirali su promjenama u koncentraciji fenolnih kiselina pri čemu je najznačajniji utjecaj imao tretman najvišom koncentracijom soli (200 mM) uslijed kojeg je detektirano dvostuko više kava kiseline i *p*-kumarinske kiseline te trostruko više ferulinske kiseline u odnosu na kontrolne klijance. Također, tretmani svim koncentracijama soli (50, 100 i 200 mM NaCl) uzrokovali su kontinuirani porast *p*-hidroksibenzojeve kiseline. Solni stres je imao najintenzivniji učinak na sadržaj sinapinske kiseline koja je bila statistički značajno povišena 1,5, 3 i 6,4 puta pri 50, 100 i 200 mM NaCl. Suprotan učinak solnih tretmana na tretirane klijance zabilježen je na razini protokatehinske i salicilne kiseline čija je koncentracija porastom saliniteta bila niža u odnosu na kontrolu. Izmjereni sadržaj salicilne kiseline uslijed najvišeg saliniteta (200 mM) iznosio je 24% količine salicilne kiseline u kontrolnim klijancima.

U kontrolnim klijancima kineskog kupusa od kvantificiranih fenolnih kiselina vezanih na stanične stijenke najzastupljenija je sinapinska kiselina (228 $\mu\text{g/g}$ s.m.). Ferulinska kiselina (7 $\mu\text{g/g}$ s.m.), *p*-kumarinska i salicilna kiselina (2 $\mu\text{g/g}$ s.m.) detektirane su u dva reda veličine nižim koncentracijama u odnosu na sinapinsku kiselinu, a preostale vezane fenolne kiseline izmjerene su u količinama od oko 1 $\mu\text{g/g}$ s.m. te nižim. Galna kiselina, gentisinska, *m*-hidroksibenzojeva i klorogenska kiselina nisu detektirane u vezanom obliku. Solni tretmani utjecali su na promjene u sadržaju vezanih fenolnih kiselina u klijancima pri čemu je zabilježen statistički značajan kontinuirani pad sadržaja protokatehinske, kava kiseline, *p*-kumarinske, sinapinske, ferulinske i salicilne kiseline porastom saliniteta. Pri tretmanu najvišom koncentracijom soli (200 mM) sadržaj najzastupljenijih vezanih fenolnih kiselina (sinapinske, ferulinske, *p*-kumarinske i salicilne) iznosio je redom 66%, 57%, 35% i 22% količine izmjerene u netretiranim klijancima. Solni tretmani nisu utjecali na koncentraciju *p*-hidroksibenzojeve kiseline, siringinske i izoferulinske kiseline, dok uslijed povišenog saliniteta vanilinska kiselina u tretiranim klijancima nije detektirana.

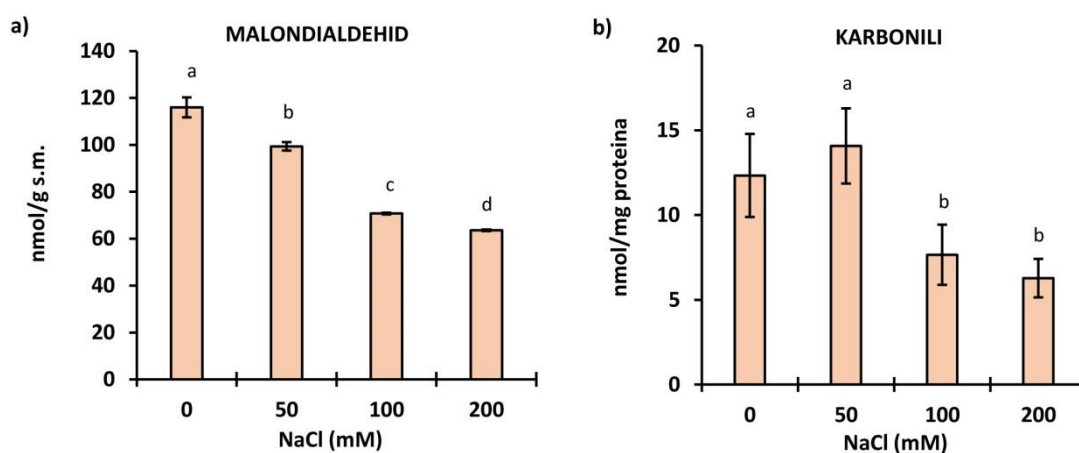
Zaključno, odgovor klijanca kineskog kupusa na povišeni salinitet koordiniran je porastom većine kvantificiranih fenolnih kiselina u slobodnom obliku te smanjenjem fenolnih kiselina vezanih na stijenke stanica.

Tablica 7. Sastav i koncentracija slobodnih fenolnih kiselina i fenolnih kiselina vezanih na stanične stijenke ($\mu\text{g/g}$ s.m.) u klijancima kineskog kupusa uslijed solnog stresa (0-200 mM NaCl). Rezultati su srednja vrijednost \pm SD ($n=3$). Vrijednosti označene različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ($p < 0,05$). s.m. suha masa, n.d. - nije detektirano

Slobodne kiseline ($\mu\text{g/g}$ s.m.)	0 mM NaCl	50 mM NaCl	100 mM NaCl	200 mM NaCl
galna	n.d	n.d	n.d	n.d
protokatehinska	$0,36 \pm 0,02^a$	$0,34 \pm 0,01^{ab}$	$0,23 \pm 0,03^{bc}$	$0,29 \pm 0,03^c$
gentisinska	n.d	n.d	n.d	n.d
<i>p</i> -hidroksibenzojeva	$0,76 \pm 0,02^c$	$0,82 \pm 0,04^b$	$1,00 \pm 0,03^b$	$1,70 \pm 0,02^a$
<i>m</i> -hidroksibenzojeva	n.d	n.d	n.d	n.d
klorogenska	n.d.	$0,026 \pm 0,001^b$	$0,031 \pm 0,003^{ab}$	$0,03 \pm 0,001^a$
kava	$0,16 \pm 0,01^b$	$0,16 \pm 0,01^b$	$0,20 \pm 0,00^b$	$0,30 \pm 0,03^a$
vanilinska	n.d ili n.k	$0,71 \pm 0,03^b$	n.d ili n.k	$0,72 \pm 0,12^b$
siringinska	$0,41 \pm 0,02$	n.d	n.d	n.d
<i>p</i> -kumarinska	$0,42 \pm 0,02^b$	$0,39 \pm 0,03^{ab}$	$0,29 \pm 0,02^{ab}$	$0,70 \pm 0,05^a$
sinapinska	$43,45 \pm 5,42^d$	$66,03 \pm 0,54^c$	$125,11 \pm 2,88^b$	$277,11 \pm 6,06^a$
ferulinska	$1,30 \pm 0,08^b$	$1,46 \pm 0,11^b$	$1,86 \pm 0,06^b$	$3,89 \pm 0,33^a$
izoferulinska	n.d	n.d	n.d	n.d
salicilna	$17,42 \pm 0,33^a$	$14,60 \pm 0,19^b$	$10,99 \pm 0,11^c$	$4,10 \pm 0,02^d$
Vezane kiseline ($\mu\text{g/g}$ s.m.)	0 mM NaCl	50 mM NaCl	100 mM NaCl	200 mM NaCl
galna	n.d	n.d	n.d	n.d
protokatehinska	$0,39 \pm 0,04^a$	$0,27 \pm 0,02^b$	$0,17 \pm 0,02^c$	$0,14 \pm 0,022^c$
gentisinska	n.d	n.d	n.d	n.d
<i>p</i> -hidroksibenzojeva	$1,20 \pm 0,05^a$	$1,20 \pm 0,00^a$	$1,19 \pm 0,02^a$	$1,06 \pm 0,07^a$
<i>m</i> -hidroksibenzojeva	n.d	n.d	n.d	n.d
klorogenska	n.d	n.d	n.d	n.d
kava	$0,22 \pm 0,02^a$	$0,13 \pm 0,01^b$	$0,09 \pm 0,01^c$	$0,05 \pm 0,00^d$
vanilinska	$0,43 \pm 0,07^a$	n.d	n.d	n.d
siringinska	$0,65 \pm 0,163^a$	$0,41 \pm 0,05^a$	$0,47 \pm 0,03^a$	$0,41 \pm 0,05^a$
<i>p</i> -kumarinska	$2,14 \pm 0,10^a$	$2,05 \pm 0,16^{ab}$	$1,76 \pm 0,13^b$	$0,76 \pm 0,04^c$
sinapinska	$228,11 \pm 30,65^a$	$224,94 \pm 3,13^a$	$188,24 \pm 11,63^{ab}$	$152,96 \pm 11,84^b$
ferulinska	$6,99 \pm 1,37^a$	$5,67 \pm 0,24^{ab}$	$5,49 \pm 0,70^{ab}$	$4,02 \pm 0,02^b$
izoferulinska	$0,38 \pm 0,04^a$	$0,34 \pm 0,025^a$	$0,32 \pm 0,06^a$	$0,23 \pm 0,011^a$
salicilna	$2,07 \pm 0,14^a$	$1,59 \pm 0,03^b$	$1,23 \pm 0,03^c$	$0,45 \pm 0,02^d$

3.1.1.7. Pokazatelji oksidativnih oštećenja

Pokazatelji oksidativnih oštećenja staničnih makromolekula prikazani su na Slici 22. Sadržaj malondialdehida koji ukazuje na prisutnost lipidne peroksidacije u klijancima kineskog kupusa kontinuirano je opadao uslijed povišenog saliniteta. Na sličan način, NaCl (100 i 200 mM) je utjecao i na sadržaj karbonila tj. reaktivnih proteinskih grupa koje nastaju uslijed oksidacije, a u uvjetima povišenog saliniteta u klijancima kineskog kupusa karbonili su bili sniženi.



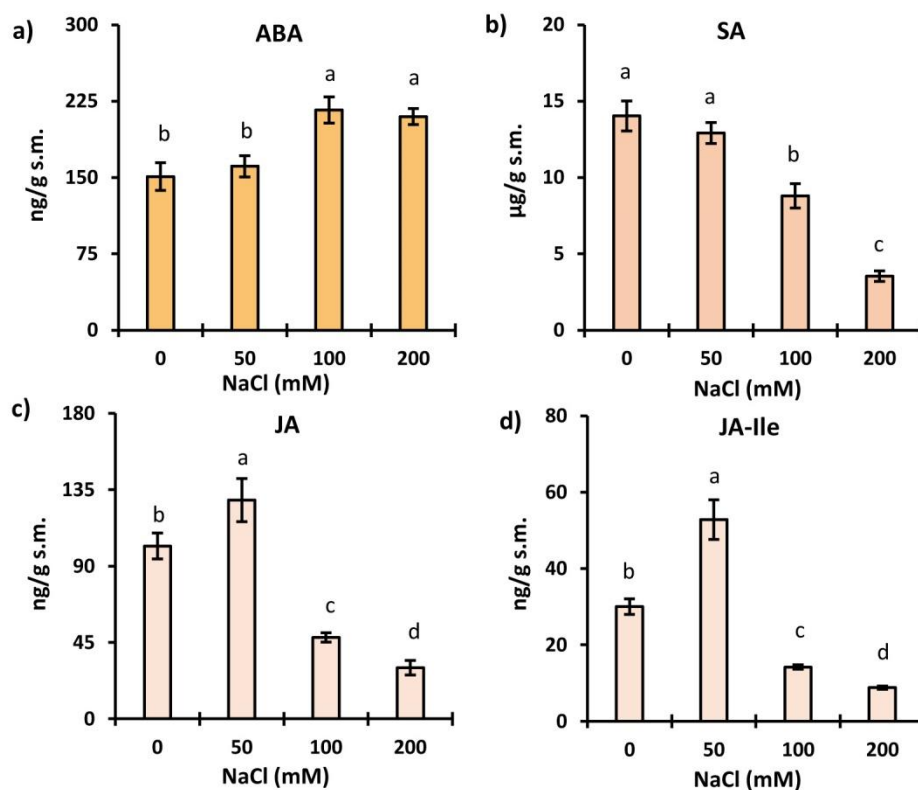
Slika 22. Pokazatelji oksidativnih oštećenja: malondialdehid (a) i karbonili (b) u klijancima kineskog kupusa uslijed solnog stresa (0-200 mM NaCl). Rezultati su srednja vrijednost \pm SD (n=5). Vrijednosti označene različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ($p < 0,05$).

3.1.2. Hormonski odgovor

U okviru hormonskog odgovora klijanaca *B. rapa* na solni stres analizirani su hormoni stresa (ABA, SA, JA i JA-Ile) te detaljno komponente metabolizma auksina: IAA, prekursori biosinteze i metaboliti IAA.

3.1.2.1. Analize hormona stresa

Hormoni stresa: apscizinska kiselina (ABA), salicilna kiselina (SA) i jasmonati (jasmonska kiselina (JA) i jasmonoil-izoleucin (Ja-Ile)) identificirani su i kvantificirani u klijancima kineskog kupusa uslijed povišenog saliniteta metodom tekućinske kromatografije visoke učinkovitosti uz korištenje spektrometra masa (UHPLC-MS/MS). Dobiveni rezultati prikazani su na Slici 23.



Slika 23. Hormoni stresa: apscizinska kiselina (ABA) (a), salicilna kiselina (SA) (b), jasmonska kiselina (JA) (c) i jasmonoil-izoleucin (JA-Ile) (d) u klijancima kineskog kupusa uslijed solnog stresa (0-200 mM NaCl). Rezultati su srednja vrijednost \pm SD (n=4). Vrijednosti označene različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ($p < 0,05$).

Solni stres uzrokovao je promjene u sadržaju hormona stresa ovisno o koncentraciji soli u odnosu na kontrolu. Tretmani višim koncentracijama natrijeva klorida (100 i 200 mM) rezultirali su na statistički značajnoj razini povišenom sadržajem ABA u odnosu na klijance tretirane nižom koncentracijom soli (50 mM) te kontrolne klijance. Nasuprot tome, više koncentracije soli (100 i 200 mM) prouzročile su statistički značajan pad sadržaja SA. Učinak solnog stresa rezultirao je sličnim trendom promjena u razini JA i JA-Ile i bio je statistički značajan za sve tri ispitane koncentracije. Najniža koncentracija soli (50 mM) dovela je do porasta JA i JA-Ile u odnosu na kontrolne klijance, a više koncentracije soli (100 i 200 mM) utjecale su na smanjenje JA i JA-Ile za više od 50% u odnosu na kontrolne klijance.

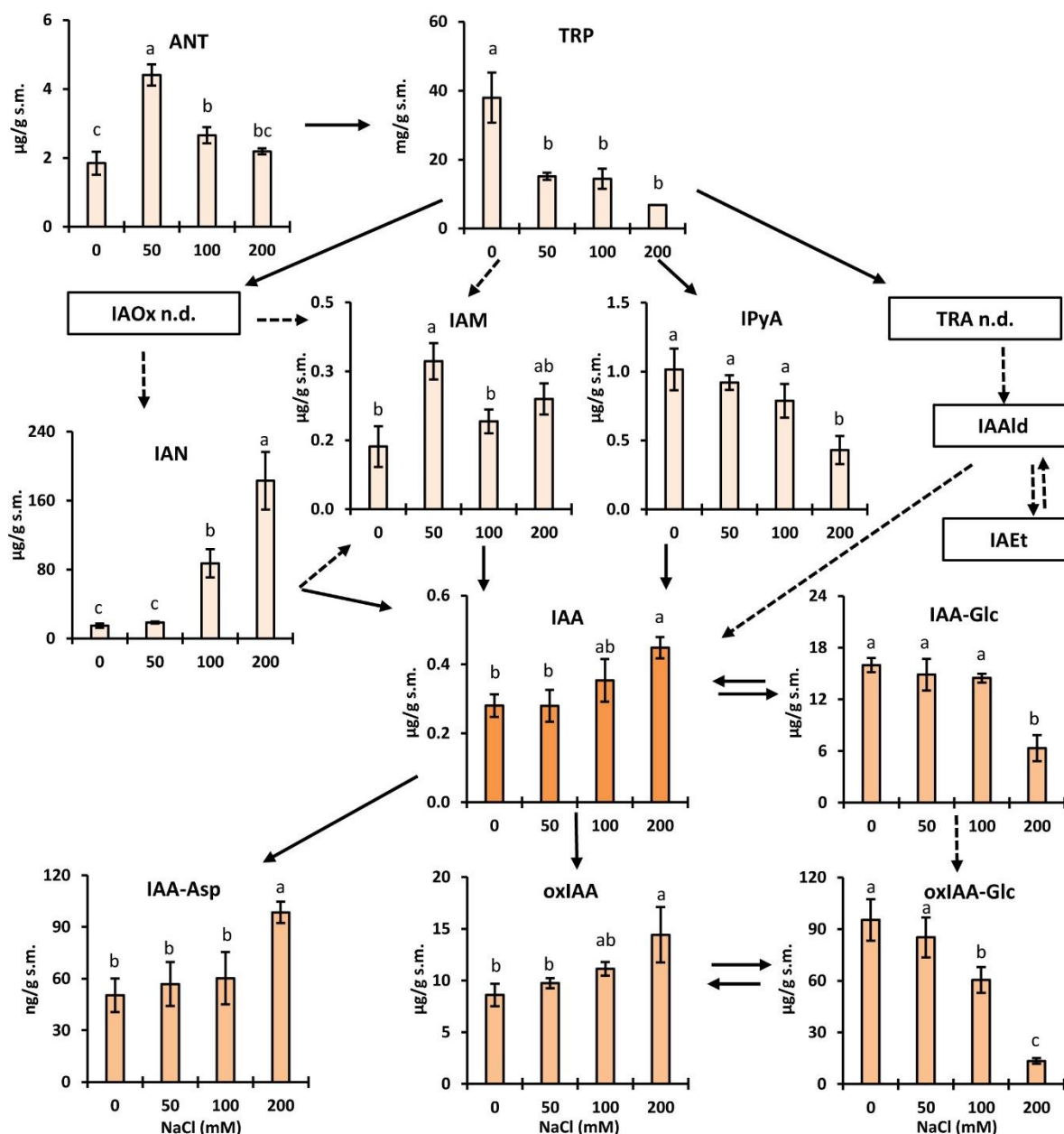
3.1.2.2. Analize auksina: indol-3-octene kiseline i indolskih spojeva uključenih u procese homeostaze auksina

Detaljno je analiziran sadržaj auksina u klijancima kineskog kupusa uslijed povišenog saliniteta, uključujući slobodnu indol-3-octenu kiselinu (IAA), te prekursore triptofan (Trp)-ovisnih puteva biosinteze i metabolite auksina koji sudjeluju u procesima homeostaze auksina (reverzibilna i ireverzibilna konjugacija i detoksifikacija). Identifikacija i kvantifikacija auksinskih metabolita određene su tekućinskom kromatografijom visoke učinkovitosti uz korištenje spektrometra masa (UHPLC-MS/MS). Dobiveni rezultati Trp-ovisnog biosintetskog puta auksina prikazani su na Slici 24.

Solni stres utjecao je na oba rana prekursora sinteze auksina, antranilat (ANT) i triptofan (TRP). Najniža koncentracija natrijeva klorida (50 mM) rezultirala je značajnim porastom ANT u klijancima. Pri višim koncentracijama soli (100 i 200 mM) ANT je također bio statistički značajno povišen u odnosu na kontrolne klijance, no značajno niži u odnosu na 50 mM tretman. Svi primjenjeni solni tretmani rezultirali su značajno nižim količinama TRP u tretiranim u odnosu na kontrolne klijance.

Sinteza auksina IAA iz TRP moguća je preko četiri puta: indol-3-acetaldoksima (IAOx); indol-3-acetamida (IAM); indol-3-piruvatne kiseline (IPyA) i triptamina (TRA). Prekursori biosinteze IAA: IAOx i TRA u klijancima kineskog kupusa nisu detektirani. Povišeni salinitet rezultirao je statistički značajnim porastom indol-3-acetonitrila (IAN), intermedijera IAOx puta biosinteze auksina. Sadržaj IAN bio je povišen 5 puta uslijed tretmana 100 mM NaCl te čak više od 10 puta uslijed tretmana 200 mM NaCl u odnosu na kontrolne klijance. Solni stres uzrokovao je promjene i u preostala dva prekursora sinteze auksina. Najniža koncentracija soli (50 mM) rezultirala je značajnim povišenjem razine IAM dok je pri tretmanima 100 i 200 mM soli zabilježen trend opadanja i približavanje količinama izmjenjenim u kontrolnim klijancima. Koncentracija IPyA ostala je nepromjenjena uslijed 50 i 100 mM saliniteta u odnosu na kontrolne klijance, a tretman najvišom koncentracijom soli rezultirao je njenim smanjenjem.

Osim učinka na prekursore biosinteze, povišeni salinitet rezultirao je i promjenama u količini IAA u odnosu na kontrolne klijance. Više koncentracije soli (100 i 200 mM) rezultirale su porastom IAA u tretiranim klijancima pri čemu je statistički značajan rast zabilježen pri koncentraciji od 200 mM NaCl. Povišeni salinitet na isti je način utjecao na promjene u razinama oksidirane forme IAA, tj. 2-oksoindol-3-octenoj kiselinu (oxIAA) i kataboličkom metabolitu, konjugatu indol-3-octene kiseline s aspartatom (IAA-Asp). Pri najvišoj koncentraciji soli (200 mM) sadržaj oxIAA i IAA-Asp bio je statistički značajno viši u odnosu na ostale tretmane i kontrolne klijance. Nasuprot tome, količine konjugata IAA s glukozom (IAA-Glc) i oksidirane forme tog konjugata (oxIAA-Glc), pri najvišim koncentracijama soli bile su statistički niže.



Slika 24. Profil auksina u klijancima kineskog kupusa (*B. rapa*) uslijed solnog stresa (0-200 mM NaCl): indol-3-octena kiselina (IAA); prekursori sinteze: antranilat (ANT), triptofan (TRP), indol-3-acetamid (IAM), indol-3-piruvatna kiselina (IPyA), indol-3-acetonitril (IAN) i auksinski metaboliti: 2-oksoindol-3-octena kiselina (oxIAA), indol-3-acetil-L-aspartat (IAA-Asp), indol-3-acetil-1-glukozil ester (IAA-Glc), 2-oksoindol-3-acetil-1-glukozil ester (oxIAA-Glc). Rezultati su srednja vrijednost \pm SD (n=4). Vrijednosti označene različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ($p < 0,05$). Pune strelice predstavljaju reakcije za koje su poznati enzimi i/ili geni, dok isprekidane strelice predstavljaju reakcije katalizirane trenutno nepoznatim enzimima.

3.2. ODGOVOR BILJAKA KINESKOG KUPUSA (*B. rapa*) NA POVIŠENI SALINITET

Biljke kineskog kupusa uzgojene su hidroponski do starosti tri tjedna te tretirane NaCl (50-200 mM) u trajanju od 24 h (Slika 25a). Odgovor biljaka kineskog kupusa (*B. rapa*) na povišen salinitet praćen je na fiziološkoj, biokemijskoj, hormonskoj i molekularnoj razini u listovima i korijenu.

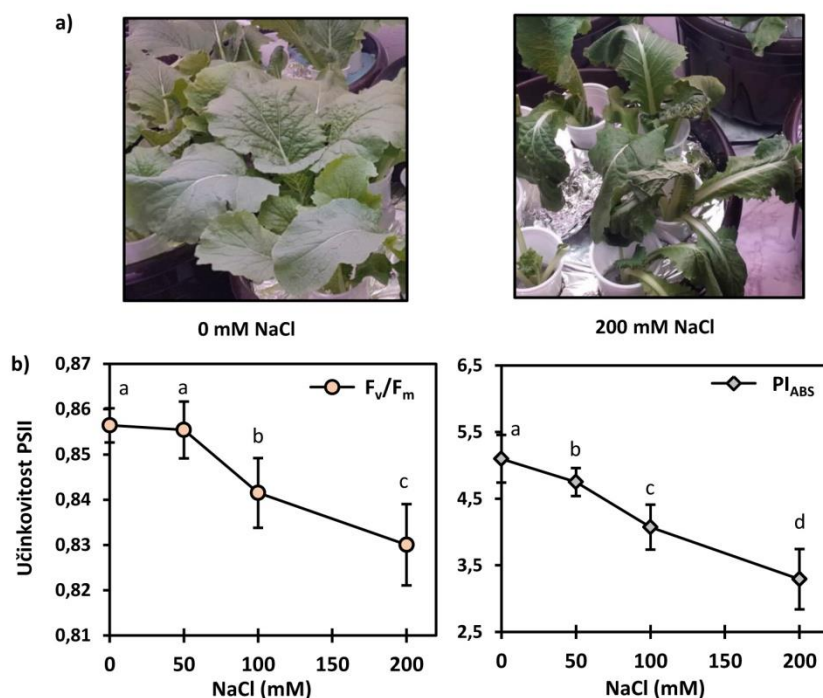
3.2.1. Fiziološki i biokemijski odgovori

U okviru fiziološkog odgovora praćena je učinkovitost fotosustava II. Biokemijski odgovori biljaka obuhvaćaju analize iona Na⁺ i K⁺, sadržaj osmolita prolina, te antioksidacijski odgovor biljaka: enzimatski (aktivnosti antioksidacijskih enzima) i ne-enzimatski (promjene u sadržaju askorbinske kiseline, glutationa i fenolnih kiselina). Nadalje, u okviru biokemijskih analiza praćeni su produkti lipidne peroksidacije (malondialdehidi) i proteinske reaktivne karbonilne grupe (karbonili) čija razina može biti povećana uslijed prisutnosti stresora.

3.2.1.1. Fotosintetska učinkovitost fotosustava II

Utjecaj solnog stresa na fotosintetsku učinkovitost fotosustava II u listovima hidroponski uzgojenih biljaka kineskog kupusa uslijed tretmana različitim koncentracijama natrijevog klorida (0-200 mM) prikazan je na Slici 25.

Mjerenjima fluorescencije klorofila a uočen je učinak solnih tretmana na fotosintetsku učinkovitost biljaka kineskog kupusa. U uvjetima blagog saliniteta (50 mM) maksimalni prinos kvanta fotosustava II (Fv/Fm) tretiranih biljaka bio je jednak Fv/Fm vrijednostima kontrole (0 mM). Porast koncentracije soli u otopini rezultirao je smanjenjem Fv/Fm na statistički značajnoj razini pri obje koncentracije soli (100 i 200 mM). Indeks fotosintetske učinkovitosti (PIABS) kontinuirano se statistički značajno snižavao uslijed povišenja saliniteta te je pri 200 mM NaCl iznosio oko 60% vrijednosti izmjerenih u kontrolama.



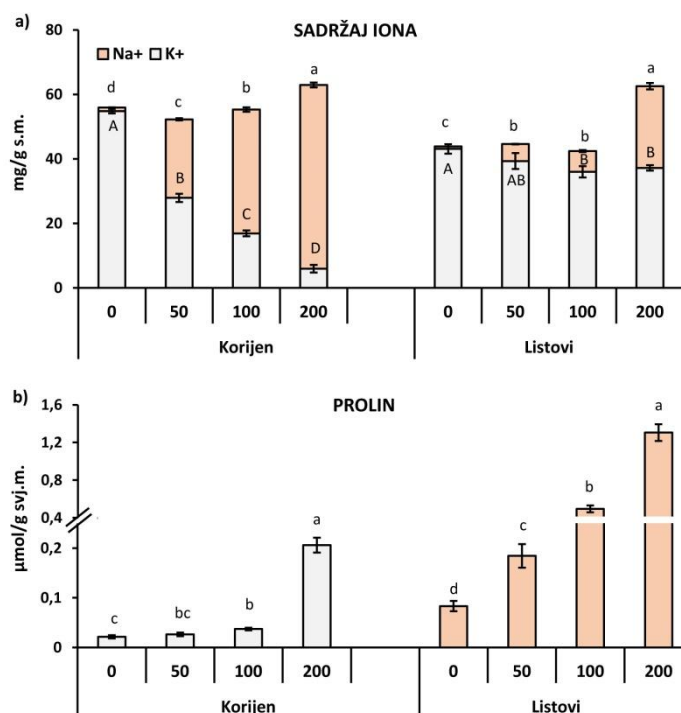
Slika 25. Reprezentativne fotografije tri tjedna starih biljaka kineskog kupusa u kontrolnim uvjetima (0 mM NaCl) i pri najvišem salinitetu (200 mM) nakon 24h tretmana (a) i učinkovitost fotosustava II uslijed solnog stresa (0-200 mM NaCl) nakon 24 h tretmana (b). Rezultati su srednja vrijednost \pm SD ($n=18$). Vrijednosti označene različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ($p < 0,05$).

3.2.1.2. Sadržaj natrijevih i kalijevih iona i osmolita prolina

Tretmani različitim koncentracijama NaCl (50-200 mM) rezultirali su promjenama u sadržaju iona kalija i natrija u korijenu i listovima kineskog kupusa (Slika 26a).

U korijenu netretiranih biljaka kineskog kupusa izmjereno je $54,83 \pm 0,68$ mg/g s.m. iona K^+ te $1,15 \pm 0,05$ mg/g s.m. iona Na^+ . Uslijed povišenja saliniteta sadržaj iona kalija kontinuirano je opadao porastom koncentracije soli u otopini uz istovremeni porast iona natrija u korijenu kineskog kupusa na statistički značajnoj razini. Pri 50, 100 i 200 mM tretmanu sadržaj iona K^+ u korijenu tretiranih biljaka iznosio je 51%, 31% i 11% od vrijednosti u kontrolama, a sadržaj iona Na^+ bio je povišen 21, 33 i 50 puta u odnosu na vrijednosti u kontrolnim biljkama. Sukladno tome, omjer iona natrija i kalija (Na^+/K^+) u korijenu tretiranih biljaka iznosio je: 0,8, 2,2 i 9,5 pri 50, 100 i 200 mM soli, što predstavlja porast od 41, 108 i 453 puta u odnosu na korijen kontrolnih biljaka čiji je Na^+/K^+ omjer iznosio 0,02. U listovima netretiranih biljaka koncentracija K^+ iznosila je $43,12 \pm 1,50$ mg/g s.m, a Na^+ $0,76 \pm 0,00$ mg/g s.m. tj. omjer Na^+/K^+ je bio isti kao u korijenu (0,02). U tretiranih biljaka pri 50 mM NaCl sadržaj K^+ je bio snižen za 9%, a pri 100 i 200 mM soli za oko 15% u odnosu na kontrole. Usporedno, sadržaj iona Na^+ statistički značajno je porastao 7, 9 i 39 puta uslijed 50, 100 i 200 mM saliniteta

čime je Na^+/K^+ omjer porastao sa 0,02 u kontrolnih biljaka na 0,13, 0,18 i 0,8 pri spomenutim tretmanima. Uočeno je da je destabilizacija omjera Na^+/K^+ izrazitija u korijenu nego u listovima kineskog kupusa uslijed solnog stresa.



Slika 26. Sadržaj iona natrija i kalija (a) i prolina (b) u korijenu i listovima kineskog kupusa uslijed solnog stresa (0-200 mM NaCl). Vrijednosti označene različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ($p < 0,05$). Rezultati su srednja vrijednost \pm SD ($n=3$ pri (a); $n=5$ pri (b)). Na slici (a) velika tiskana slova predstavljaju statističku usporedbu sadržaja iona kalija, a mala tiskana slova statističku usporedbu sadržaja iona natrija.

Promjene u sadržaju prolina u korijenu i listovima kineskog kupusa uslijed povišenog saliniteta prikazane su na Slici 26b. Netretirane biljke kineskog kupusa imaju $0,02 \pm 0,00$ $\mu\text{mol/g svj.m.}$ prolina u korijenu te $0,08 \pm 0,01$ $\mu\text{mol/g svj.m.}$ prolina u listovima. Blagi porast prolina u korijenu kineskog kupusa zabilježen je pri koncentraciji soli 50 mM uz kontinuirani porast prilikom povišenja saliniteta. Pri najvišem solnom tretmanu (200 mM) sadržaj prolina bio je povišen 10 puta u odnosu na kontrolu ($0,2 \mu\text{mol/g svj.m.}$). U listovima tretiranih biljaka nakupljanje prolina bilo je jače izraženo. Solni tretmani uzrokovali su statistički značajan porast prolina uslijed povišenja saliniteta pri čemu je prolin bio povišen 2, 6 i 15 puta pri 50, 100 i 200 mM NaCl u odnosu na kontrolu.

3.2.1.3. Antioksidacijski odgovor: aktivnosti antioksidacijskih enzima

Specifične aktivnosti antioksidacijskih enzima u korijenu i listovima kineskog kupusa uslijed povišenog saliniteta prikazane su u Tablici 8. Pri svim koncentracijama soli (50, 100 i 200 mM) aktivost CAT u korijenu biljaka bila je statistički niža u odnosu na aktivnost CAT u kontrolama dok je aktivnost APX bila statistički značajno povišena pri 100 mM tretmanu. Porastom saliniteta na 200 mM NaCl aktivnost APX statistički opada ispod aktivnosti APX korijena kontrole. Solni tretmani na sličan su način utjecali i na aktivnost SOD u korijenu kineskog kupusa pri čemu je aktivnost uslijed 100 mM soli bila statistički viša u odnosu na kontrolu. Pri najvišoj koncentraciji saliniteta (200 mM) aktivnost SOD snizila se na kontrolne vrijednosti. Aktivnost GPX bila je povišena pri svim koncentracijama soli pri čemu je tretman 200 mM NaCl najizraženije aktivirao enzim.

U listovima, slično kao i u korijenu, aktivnost CAT bila je snižena porastom koncentracije stresora. Aktivnost APX bila je statistički najviša pri 50 mM tretmanu, a pri višim koncentracijama soli (100 i 200 mM) jednaka kontroli. Pri svim koncentracijama soli (50, 100 i 200 mM) aktivnost GPOX bila je povišena u odnosu na kontrolu no najviša aktivnost enzima izmjerena je pri 100 mM NaCl. Aktivnost SOD u listovima kineskog kupusa pri 50 i 100 mM soli bila je statistički povišena u odnosu na kontrolu, a porast saliniteta na 200 mM dodatno je povisio aktivnost enzima.

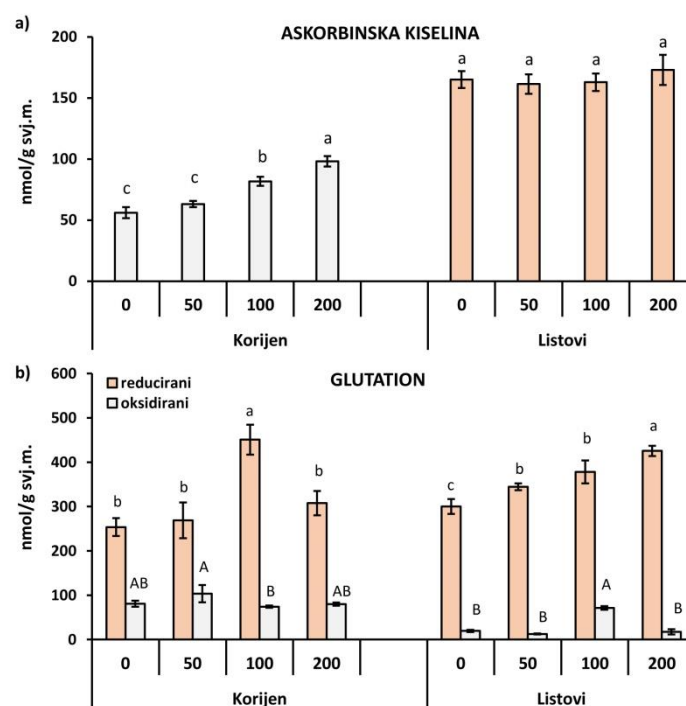
Tablica 8. Specifične aktivnosti antioksidacijskih enzima: katalaza (CAT), askorbat peroksidaza (APX), gvajakol peroksidaza (GPOX) i superoksid dismutaza (SOD) u korijenu i listovima kineskog kupusa uslijed solnog stresa (0-200 mM NaCl). Aktivnosti enzima definirana je kao jedinica aktivnosti po miligramu proteina (U/mg proteina). Rezultati su srednja vrijednost \pm SD (n=4). Aktivnost enzima izmjerena u korijenu i aktivnost enzima izmjerena u listovima označene različitim slovima u svakom stupcu međusobno se statistički značajno razlikuju ($p < 0,05$).

	NaCl (mM)	CAT	APX	GPOX	SOD
Korijen	0	0,040 \pm 0,003 ^a	0,50 \pm 0,03 ^b	5,80 \pm 1,04 ^c	85,50 \pm 1,60 ^b
	50	0,011 \pm 0,002 ^b	0,45 \pm 0,03 ^b	8,49 \pm 1,34 ^{bc}	101,55 \pm 11,58 ^b
	100	0,009 \pm 0,001 ^b	0,73 \pm 0,06 ^a	11,23 \pm 3,17 ^{ab}	141,19 \pm 11,26 ^a
	200	0,011 \pm 0,002 ^b	0,31 \pm 0,07 ^c	15,26 \pm 1,51 ^a	93,11 \pm 4,36 ^b
	NaCl (mM)	CAT	APX	GPOX	SOD
Listovi	0	0,016 \pm 0,002 ^a	0,12 \pm 0,07 ^b	0,47 \pm 0,01 ^b	22,25 \pm 0,73 ^c
	50	0,014 \pm 0,002 ^{ab}	0,26 \pm 0,16 ^a	0,50 \pm 0,13 ^{ab}	44,01 \pm 4,98 ^b
	100	0,011 \pm 0,002 ^{bc}	0,18 \pm 0,02 ^b	0,68 \pm 0,06 ^a	38,88 \pm 3,47 ^b
	200	0,008 \pm 0,001 ^c	0,20 \pm 0,03 ^b	0,63 \pm 0,02 ^{ab}	71,71 \pm 9,40 ^a

3.2.1.4. Antioksidacijski odgovor: sadržaj askorbinske kiseline i glutationa

Askorbinska kiselina i glutation spojevi su s antioksidacijskim djelovanjem koji sudjeluju u održavanju redoks stanja u biljnim stanicama. Promjene u sadržaju askorbinske kiseline, reduciranog (GSH) i oksidiranog (GSSG) glutationa u korijenu i listovima kineskog kupusa uslijed povišenog saliniteta prikazane su na Slici 27.

U korijenu netretiranih biljaka izmjerena je koncentracija askorbinske kiseline od $56,12 \pm 4,58$ nmol/g svj.m. dok listovi sadrže 3 puta više askorbinske kiseline ($165,16 \pm 6,97$ nmol/g svj.m.). Učinak saliniteta na količinu askorbinske kiseline u korijenu tretiranih biljaka vidljiv je pri višem salinitetu (100 i 200 mM) gdje je došlo do povećanja sadržaja askorbinske kiseline na statistički značajnoj razini. U listovima uslijed solnih tretmana nije došlo do promjena u količini askorbinske kiseline.



Slika 27. Promjene u sadržaju antioksidansa: askorbinske kiseline (a) i reduciranog i oksidiranog glutationa (b) u listovima i korijenu kineskog kupusa uslijed solnog stresa (0-200 mM NaCl). Rezultati su srednja vrijednost \pm SD ($n=5$ pri (a); $n=3$ pri (b)). Vrijednosti označene različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ($p < 0,05$). Na slici (b) velika tiskana slova predstavljaju statističku usporedbu sadržaja oksidiranog glutationa, a mala tiskana slova statističku usporedbu sadržaja reduciranog glutationa.

Količina GSH u korijenu kontrolnih biljaka iznosila je $253,61 \pm 20,24$ nmol/g svj.m., dok su listovi kontrola sadržavali $300,00 \pm 16,70$ nmol/g svj.m. GSSG bio je zastupljen u

četverostruko višoj količini u korijenu kineskog kupusa ($80,56 \pm 6,79$ nmol/g svj.m.) u odnosu na listove kontrola ($19,43 \pm 2,60$ nmol/g svj.m.). Povišenje količine GSH u korijenu tretiranih biljaka zabilježeno je jedino pri 100 mM soli, a porastom saliniteta na 200 mM količina GSH opada na kontrolne vrijednosti. GSSG bio je značajno najviši pri 50 mM NaCl. U listovima, povišenje saliniteta uzrokovalo je kontinuirani porast GSH, a statistički značajno najviše GSSG izmjereno je pri 100 mM tretmanu.

3.2.1.5. Antioksidacijski odgovor: profil i sadržaj fenolnih kiselina

U korijenu i listovima kineskog kupusa ukupno je identificirano i kvantificirano 14 fenolnih kiselina (u slobodnom obliku i vezanih na stanične stijenke) tekućinskom kromatografijom visoke učinkovitosti uz korištenje spektrometra masa (UHPLC-MS/MS) te su zabilježene promjene u njihovu sadržaju uslijed povišenog saliniteta.

Sastav i količina fenolnih kiselina u korijenu kineskog kupusa uslijed solnog stresa prikazani su u Tablici 9. U korijenu kontrolnih biljaka najzastupljenija slobodna fenolna kiselina je salicilna kiselina ($6,5 \mu\text{g/g s.m.}$), a zatim slijede: vanilinska i *p*-kumarinska ($2,0 \mu\text{g/g s.m.}$), *p*-hidroksibenzojeva i ferulinska ($1,7 \mu\text{g/g s.m.}$) te protokatehinska kiselina ($1,2 \mu\text{g/g s.m.}$). Ostale slobodne fenolne kiseline bile su zastupljene u koncentracijama nižim od $1 \mu\text{g/g s.m.}$ ili nisu detektirane korištenom metodom (izoferulinska). Solni tretmani (50, 100 i 200 mM NaCl) utjecali su na promjene u sastavu i količini slobodnih fenolnih kiselina. Solni tretmani rezultirali su statistički značajno nižim količinama protokatehinske, sinapinske i siringinske kiseline u korijenu tretiranih u odnosu na korijen kontrolnih biljaka. Također, uslijed 50 mM saliniteta količina galne kiseline bila je 2,5 puta niža u odnosu na kontrolu dok pri višim koncentracijama soli galna kiselina nije detektirana. Tretman 50 mM NaCl inducirao je porast salicilne i klorogenske kiseline na statistički značajnoj razini, a više koncentracije soli (100 i 200 mM) uzrokovale su kontinuirani pad u sadržaju obje kiseline u korijenu tretiranih biljaka. Svi solni tretmani (50, 100 i 200 mM) utjecali su na porast *p*-hidroksibenzojeve i *p*-kumarinske kiseline pri čemu je najizraženiji porast izmjeren pri 50 mM salinitetu uslijed kojeg je količina *p*-hidroksibenzojeve bila povišena 3 puta, a količina *p*-kumarinske kiseline 1,5 puta u odnosu na kontrolu. Također, solni tretmani rezultirali su porastom vanilinske i ferulinske kiseline u korijenu tretiranih biljaka pri čemu su uslijed 200 mM soli količine obje kiseline bile statistički značajno najviše (1,5 puta u odnosu na kontrolu) dok je sadržaj *m*-hidroksibenzojeve kiseline i kava kiseline uslijed solnog stresa ostao nepromjenjen. Također, gentisinska kiselina pri 50 mM salinitetu bila je nepromjenjena, a pri višim koncentracijama soli nije detektirana u slobodnom obliku.

Najzastupljenija fenolna kiselina vezana na stanične stijenke stanica korijena kontrolnih biljaka kineskog kupusa je ferulinska kiselina ($21,4 \mu\text{g/g s.m.}$) (Tablica 9). Potom iza nje po količini slijede vanilinska i *p*-kumarinska (oko $3,3 \mu\text{g/g s.m.}$) te salicilna i *p*-hidroksibenzojeva kiselina ($2,1 \mu\text{g/g s.m.}$). Ostale vezane fenolne kiseline bile su zastupljene u koncentracijama

od oko 1 µg/g s.m i nižim, a neke fenolne kiseline nisu detektirane u vezanom obliku (galna kiselina, *m*-hidroksibenzojeva kiselina, klorogenska kiselina). Solni tretmani utjecali su i na promjene u sadržaju fenolnih kiselina staničnih stijenki korijena. Zabilježen je kontinuirani statistički značajan porast *p*-hidroksibenzojeve i vanilinske kiseline kao rezultat porasta saliniteta pri čemu je uslijed 200 mM soli sadržaj obje vezane kiseline bio oko 2,3 puta viši u odnosu na kontrolu. Također, pri svim koncentracijama soli (50, 100 i 200 mM) kava kiselina i *p*-kumarinska bile su statistički značajno povišene. Također, uslijed solnih tretmana vidljiv je trend porasta ferulinske kiseline pri čemu je najviša koncentracija najzastupljenije fenolne kiseline staničnih stijenki izmjerena uslijed 100 mM saliniteta (1,5 puta više u odnosu na kontrolu). Porast u količini protokatehinske i siringinske kiseline zabilježen je jedino uslijed 200 mM saliniteta. Tretman 100 mM soli inducirao je porast razine vezane gentisinske kiseline od 2,4 puta u odnosu na kontrolu, a porastom saliniteta (200 mM) količina gentisinske kiseline opada na količinu u stijenkama korijena kontrolnih biljaka. Najniža koncentracija NaCl (50 mM) rezultirala je statistički značajnim dvostukim povećanjem vezane salicilne kiseline, a porast saliniteta (100 i 200 mM) uzrokovao je kontinuirano smanjenje količine salicilne kiseline ispod vrijednosti kontrola. Tijekom solnih tretmana (50, 100 i 200 mM NaCl) sadržaj sinapinske i izoferulinske kiseline u staničnim stijenkama kineskog kupusa bio je nepromijenjen.

Tablica 9. Sastav i količina slobodnih fenolnih kiselina i fenolnih kiselina vezanih na stanične stijenske ($\mu\text{g/g}$ s.m.) u korijenu kineskog kupusa uslijed solnog stresa (0-200 mM NaCl). Rezultati su srednja vrijednost \pm SD ($n=3$). Vrijednosti označene različitim slovima u istom redu međusobno se statistički značajno razlikuju ($p < 0,05$). s.m.-suha masa, n.d.-nije detektirano

Slobodne kiseline ($\mu\text{g/g}$ s.m.)	0 mM NaCl	50 mM NaCl	100 mM NaCl	200 mM NaCl
galna	0,61 \pm 0,04 ^a	0,25 \pm 0,03 ^b	n.d.	n.d.
protokatehinska	1,20 \pm 0,02 ^a	0,79 \pm 0,04 ^b	0,63 \pm 0,02 ^c	0,58 \pm 0,03 ^c
gentisinska	0,32 \pm 0,05 ^a	0,30 \pm 0,04 ^a	n.d.	n.d.
<i>p</i> -hidroksibenzojeva	1,70 \pm 0,05 ^c	3,70 \pm 0,06 ^a	2,36 \pm 0,01 ^b	2,46 \pm 0,02 ^b
<i>m</i> -hidroksibenzojeva	0,08 \pm 0,01 ^a	0,07 \pm 0,01 ^a	0,06 \pm 0,01 ^a	0,06 \pm 0,01 ^a
klorogenska	0,56 \pm 0,04 ^b	0,68 \pm 0,03 ^a	0,41 \pm 0,04 ^c	0,09 \pm 0,00 ^d
kava	0,60 \pm 0,06 ^a	0,51 \pm 0,07 ^a	0,64 \pm 0,08 ^a	0,80 \pm 0,11 ^a
vanilinska	2,00 \pm 0,06 ^b	2,84 \pm 0,46 ^{ab}	2,56 \pm 0,20 ^{ab}	3,07 \pm 0,35 ^a
siringinska	0,82 \pm 0,06 ^a	0,62 \pm 0,02 ^b	0,54 \pm 0,05 ^b	0,58 \pm 0,08 ^b
<i>p</i> -kumarinska	1,93 \pm 0,05 ^b	2,98 \pm 0,18 ^a	2,40 \pm 0,36 ^{ab}	2,26 \pm 0,16 ^{ab}
sinapinska	0,31 \pm 0,05 ^a	0,19 \pm 0,04 ^b	0,14 \pm 0,02 ^b	0,14 \pm 0,01 ^b
ferulinska	1,62 \pm 0,11 ^c	2,15 \pm 0,11 ^{ab}	1,90 \pm 0,04 ^{bc}	2,51 \pm 0,21 ^a
izoferulinska	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
salicilna	6,45 \pm 0,11 ^b	15,86 \pm 0,18 ^a	4,82 \pm 0,02 ^c	2,38 \pm 0,05 ^d
Vezane kiseline ($\mu\text{g/g}$ s.m.)	0 mM NaCl	50 mM NaCl	100 mM NaCl	200 mM NaCl
galna	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
protokatehinska	0,49 \pm 0,01 ^{ab}	0,42 \pm 0,00 ^b	0,43 \pm 0,03 ^b	0,52 \pm 0,03 ^a
gentisinska	1,08 \pm 0,12 ^b	1,10 \pm 0,14 ^b	2,43 \pm 0,07 ^a	1,17 \pm 0,09 ^b
<i>p</i> -hidroksibenzojeva	2,01 \pm 0,12 ^d	3,00 \pm 3,06 ^c	3,57 \pm 0,04 ^b	4,72 \pm 0,09 ^a
<i>m</i> -hidroksibenzojeva	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
klorogenska	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
kava	0,32 \pm 0,03 ^b	0,43 \pm 0,01 ^a	0,45 \pm 0,03 ^a	0,48 \pm 0,01 ^a
vanilinska	3,30 \pm 0,04 ^c	5,42 \pm 0,07 ^b	5,62 \pm 0,08 ^b	7,72 \pm 0,20 ^a
siringinska	1,20 \pm 0,07 ^b	1,40 \pm 0,05 ^b	1,24 \pm 0,08 ^b	1,73 \pm 0,06 ^a
<i>p</i> -kumarinska	3,20 \pm 0,05 ^b	4,50 \pm 0,09 ^a	4,85 \pm 0,30 ^a	4,73 \pm 0,33 ^a
sinapinska	0,06 \pm 0,00 ^a	0,08 \pm 0,01 ^a	0,06 \pm 0,00 ^a	0,06 \pm 0,00 ^a
ferulinska	21,48 \pm 0,36 ^c	26,10 \pm 0,22 ^{bc}	30,99 \pm 1,38 ^a	28,72 \pm 2,53 ^{ab}
izoferulinska	1,28 \pm 0,03 ^a	1,28 \pm 0,02 ^a	1,29 \pm 0,04 ^a	1,21 \pm 0,03 ^a
salicilna	2,10 \pm 0,05 ^b	4,01 \pm 0,08 ^a	1,89 \pm 0,02 ^c	1,37 \pm 0,04 ^d

Sastav i količina fenolnih kiselina u listovima kineskog kupusa uslijed solnog stresa prikazani su u Tablici 10. Od kvantificiranih slobodnih kiselina, najzastupljenija fenolna kiselina u listovima kontrolnih biljaka je klorogenska kiselina (10,98 $\mu\text{g/g}$ s.m.). Potom po količini slijede izoferulinska i kava kiselina (1,6 $\mu\text{g/g}$ s.m.), *p*-hidroksibenzojeva (1,5 $\mu\text{g/g}$ s.m.), salicilina kiselina i protokatehinska (0,9 $\mu\text{g/g}$ s.m.). U najnižim koncentracijama u slobodnom obliku bile su zastupljene vanilinska kiselina (0,7 $\mu\text{g/g}$ s.m.) i siringinska kiselina (0,26 $\mu\text{g/g}$ s.m.). Pojedine fenolne kiseline nisu detektirane (galna, gentisinska i *m*-hidroksibenzojeva) te pojedine, radi ko-elucija s drugim metabolitima tijekom analize nisu kvantificirane (*p*-kumarinska, sinapinska, ferulinska). Uslijed solnih tretmana (50, 100 i 200 mM NaCl) količine protokatehinske kiseline, *p*-hidroksibenzojeve i kava kiseline bile su znatno niže u listovima tretiranih biljaka u odnosu na listove kontrolnih biljaka, a razina siringinske kiseline ostala je gotovo nepromijenjena pri povišenom salinitetu. Suprotno tome, zabilježen je statistički značajan kontinuirani porast klorogenske kiseline pri svim koncentracijama soli pri čemu je najviša količina klorogenske kiseline izmjerena pri 200 mM tretmanu (1,5 puta više u odnosu na kontrolu). Također, tretmani 50 i 100 mM soli rezultirali su povišenim sadržajem izoferulinske i salicilne kiseline, a najviša točka saliniteta (200 mM) rezultirala je s 1,5 puta više izoferulinske te 2,4 puta više salicilne kiseline u listovima tretiranih biljaka u odnosu na kontrolu.

Jednako kao i u korijenu kineskog kupusa, najzastupljenija fenolna kiselina vezana na stanične stijenke u stanicama listova kineskog kupusa je ferulinska kiselina (130 $\mu\text{g/g}$ s.m.) (Tablica 10). Potom slijede sinapinska kiselina (101 $\mu\text{g/g}$ s.m.), izoferulinska (33 $\mu\text{g/g}$ s.m.), *p*-kumarinska (27 $\mu\text{g/g}$ s.m.), kava kiselina (2,5 $\mu\text{g/g}$ s.m.), 4-hidroksibenzojeva (1,7 $\mu\text{g/g}$ s.m.) i vanilinska kiselina (1,4 $\mu\text{g/g}$ s.m.) dok ostale vezane kiseline su bile prisutne u koncentracijama nižim od 1 $\mu\text{g/g}$ s.m. ili nisu detektirane (galna kiselina). Uslijed solnog stresa zabilježene su promjene u razini vezanih fenolnih kiselina u listovima kineskog kupusa. Količina vezane sinapinske kiseline kontinuirano se smanjivala porastom saliniteta te je pri 200 mM NaCl iznosila 50% količine kontrole. Također, koncentracija *p*-kumarinske kiseline bila je djelomično smanjena uslijed solnih tretmana u odnosu na kontrolu, dok su *p*-hidroksibenzojeva, kava, siringinska i izoferulinska kiselina bile nepromjenjene. Najniža koncentracija soli (50 mM) utjecala je na statistički značajan porast protokatehinske i gentisinske kiseline, a pri višem salinitetu (100 i 200 mM) sadržaj obje kiseline približno je jednak kontrolama. Dvostruko više *m*-hidroksibenzojeve kiseline izmjereno je pri 100 mM soli, dok je količina vezane vanilinske kiseline i salicilne kiseline statistički značajno bila povišena pri sve tri koncentracije saliniteta (50, 100 i 200 mM) u odnosu na kontrolu. Također, solni tretmani uzrokovali su porast vezane ferulinske kiseline pri čemu je uslijed tretmana 100 mM soli količina vezane ferulinske kiseline na stanične stijenke listova kineskog kupusa bila statistički najviša.

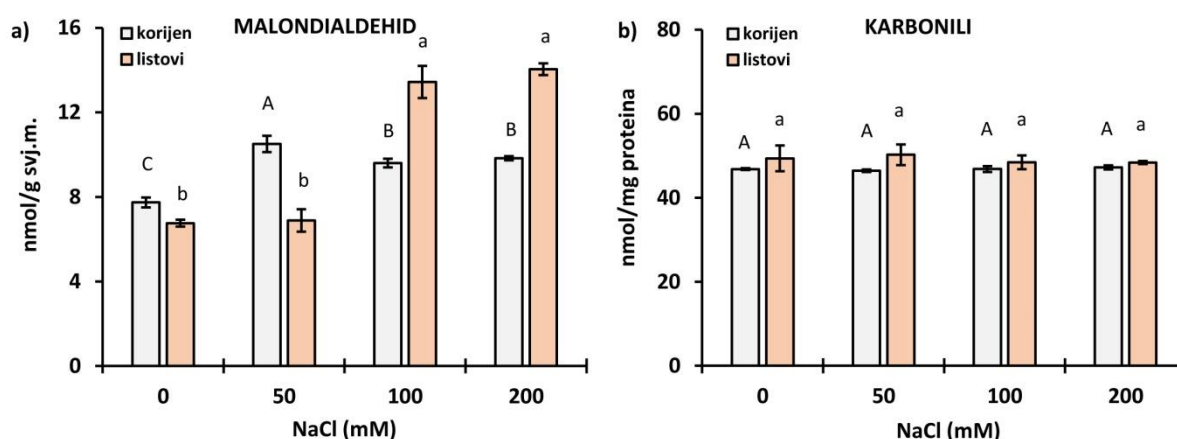
Tablica 10. Sastav i količina slobodnih fenolnih kiselina i fenolnih kiselina vezanih na stanične stijenke ($\mu\text{g/g}$ s.m.) u listovima kineskog kupusa uslijed solnog stresa (0-200 mM NaCl). Rezultati su srednja vrijednost \pm SD ($n=3$). Vrijednosti označene različitim slovima u istom redu međusobno se statistički značajno razlikuju ($p < 0,05$). s.m.-suha masa, n.d.-nije detektirano, n.k.-nije kvantificirano.

Slobodne kiseline ($\mu\text{g/g}$ s.m.)	0 mM NaCl	50 mM NaCl	100 mM NaCl	200 mM NaCl
galna	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
protokatehinska	$0,86 \pm 0,01^a$	$0,69 \pm 0,03^b$	$0,58 \pm 0,03^c$	$0,68 \pm 0,02^b$
gentisinska	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>p</i> -hidroksibenzojeva	$1,48 \pm 0,04^a$	$1,38 \pm 0,02^b$	$1,16 \pm 0,02^c$	$0,98 \pm 0,01^d$
<i>m</i> -hidroksibenzojeva	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
klorogenska	$10,98 \pm 0,06^d$	$15,57 \pm 0,14^b$	$13,47 \pm 0,15^c$	$16,92 \pm 0,17^a$
kava	$1,65 \pm 0,04^a$	$1,51 \pm 0,02^b$	$1,03 \pm 0,02^c$	$1,02 \pm 0,03^c$
vanilinska	$0,65 \pm 0,06$	n.d.	n.d.	n.d.
siringinska	$0,26 \pm 0,00^a$	$0,33 \pm 0,05^a$	$0,14 \pm 0,01^b$	$0,28 \pm 0,06^a$
<i>p</i> -kumarinska	n.k.	n.k.	n.k.	n.k.
sinapinska	n.k.	n.k.	n.k.	n.k.
ferulinska	n.k.	n.k.	n.k.	n.k.
izoferulinska	$1,67 \pm 0,04^c$	$2,07 \pm 0,10^b$	$1,90 \pm 0,10^b$	$2,44 \pm 0,02^a$
salicilna	$0,91 \pm 0,04^c$	$1,38 \pm 0,03^b$	$1,27 \pm 0,04^b$	$2,35 \pm 0,03^a$
Vezane kiseline ($\mu\text{g/g}$ s.m.)	0 mM NaCl	50 mM NaCl	100 mM NaCl	200 mM NaCl
galna	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
protokatehinska	$0,09 \pm 0,01^b$	$0,14 \pm 0,02^a$	$0,10 \pm 0,02^{ab}$	$0,10 \pm 0,00^{ab}$
gentisinska	$0,75 \pm 0,03^{bc}$	$0,95 \pm 0,02^a$	$0,68 \pm 0,05^c$	$0,85 \pm 0,03^{ab}$
<i>p</i> -hidroksibenzojeva	$1,68 \pm 0,03^a$	$1,67 \pm 0,03^a$	$1,60 \pm 0,02^a$	$1,65 \pm 0,02^a$
<i>m</i> -hidroksibenzojeva	$0,03 \pm 0,01^{bc}$	$0,02 \pm 0,00^c$	$0,06 \pm 0,01^a$	$0,05 \pm 0,01^{ab}$
klorogenska	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
kava	$2,50 \pm 0,07^a$	$3,78 \pm 0,41^a$	$3,92 \pm 0,37^a$	$3,96 \pm 0,78^a$
vanilinska	$1,38 \pm 0,01^b$	$1,83 \pm 0,12^a$	$1,81 \pm 0,07^a$	$1,78 \pm 0,14^a$
siringinska	$0,41 \pm 0,02^a$	$0,48 \pm 0,04^a$	$0,47 \pm 0,01^a$	$0,53 \pm 0,08^a$
<i>p</i> -kumarinska	$27,33 \pm 0,14^a$	$24,66 \pm 1,01^c$	$27,12 \pm 0,29^{ab}$	$25,54 \pm 0,14^{bc}$
sinapinska	$101,42 \pm 4,81^a$	$83,04 \pm 0,21^b$	$63,04 \pm 0,23^c$	$41,65 \pm 0,70^d$
ferulinska	$130,52 \pm 9,34^c$	$162,98 \pm 1,65^b$	$184,12 \pm 0,49^a$	$176,73 \pm 0,79^{ab}$
izoferulinska	$33,09 \pm 0,29^a$	$38,63 \pm 4,58^a$	$42,35 \pm 3,55^a$	$39,81 \pm 1,94^a$
salicilna	$0,39 \pm 0,01^c$	$0,46 \pm 0,02^b$	$0,47 \pm 0,01^b$	$0,64 \pm 0,02^a$

3.2.1.6. Pokazatelji oksidativnih oštećenja: sadržaj malondialdehida i karbonila

Povećani sadržaj malondialdehida ukazuje na oksidativno oštećenje lipida dok je povećana razina karbonila rezultat oksidativnih oštećenja proteina. Utjecaj solnog stresa na količinu malondialdehida i karbonila u listovima i korijenu kineskog kupusa pri različitim koncentracijama soli (0-200 mM NaCl) prikazan je na Slici 28. Solni tretmani (50-200 mM NaCl) uzrokovali su statistički značajan porast malondialdehida u korijenu kineskog kupusa. U listovima, više koncentracije NaCl (100 i 200 mM) uzrokovale su dvostruko povećanje količine malondialdehida.

Solni tretmani (50, 100 i 200 mM NaCl) nisu utjecali na promjene u količini reaktivnih karbonilnih grupa proteina u korijenu i listovima kineskog kupusa.



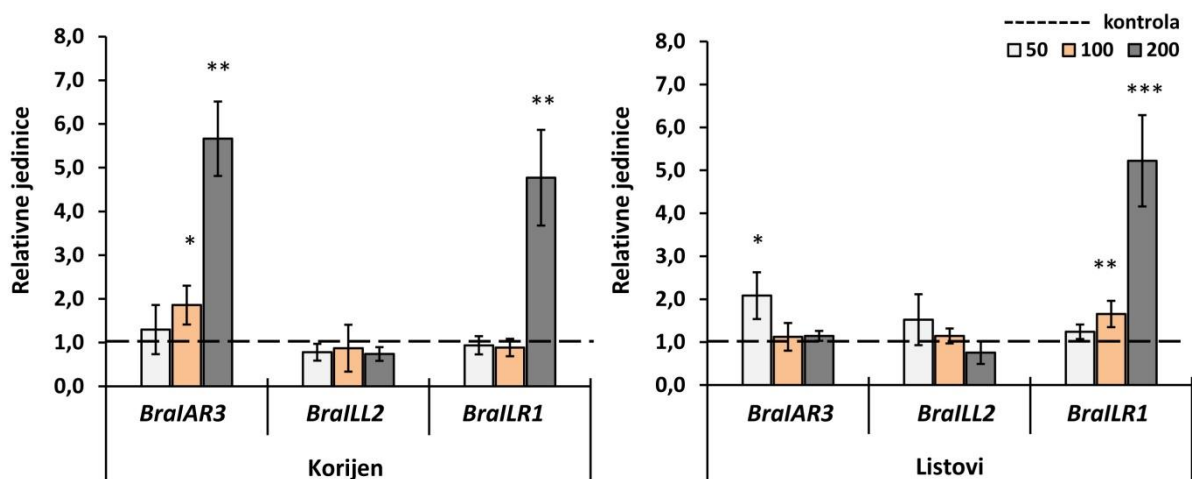
Slika 28. Pokazatelji oksidativnih oštećenja: malondialdehid (a) i karbonili (b) u listovima i korijenu kineskog kupusa uslijed solnog stresa (0-200 mM NaCl). Rezultati su srednja vrijednost \pm SD (n=5). Vrijednosti označene različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ($p < 0,05$). Velika tiskana slova predstavljaju statističku usporedbu vrijednosti u korijenu, a mala tiskana slova statističku usporedbu vrijednosti u listovima.

3.2.2. Hormonski odgovor: hormoni stresa i auksini

Utjecaj povišenog saliniteta na hormone stresa i auksinski metabolizam u korijenu i listovima kineskog kupusa prikazani su u poglavlju: 3.3. Komparacija odgovora kupusnjača: kineskog kupusa (*B. rapa*), bijelog kupusa (*B. oleracea* var. *capitata*) i raštike (*B. oleracea* var. *acephala*) na povišeni salinitet.

3.2.3. Molekularni odgovor: ekspresija gena za auksin-amidohidrolaze

Auksin-amidohidrolaze su porodica enzima uključena u održavanje homeostaze auksina pri čemu kataliziraju reakcije hidrolize reverzibilnih auksinskih konjugata prvenstveno s aminokiselinama te šećerima radi oslobađanja slobodnih auksina, ponajprije IAA. Promjene u ekspresiji gena za auksin-amidohidrolaze IAR3, ILL2 i ILR1 uslijed povišenog saliniteta prikazane su na Slici 29. Ekspresija gena praćena je nakon šest sati tretmana pojedinom koncentracijom NaCl.



Slika 29. Ekspresija gena *BraIAR3*, *BraILL2* i *BraILR1* uslijed solnog stresa (50-200 mM NaCl) normalizirana na razinu ekspresije gena u kontrolnim biljkama (vrijednost 1) nakon 6 h tretmana. Rezultati su srednja vrijednost \pm SD (n=4). Zvezdice prikazuju statistički značajnu razliku u tretmanima (50, 100 i 200 mM NaCl) u odnosu na kontrolu (0 mM NaCl) u Studentovom t-testu (t-test; *, **, i *** odgovaraju redom p-vrijednostima $0,05 > p > 0,01$; $0,01 > p > 0,001$; i $p < 0,001$).

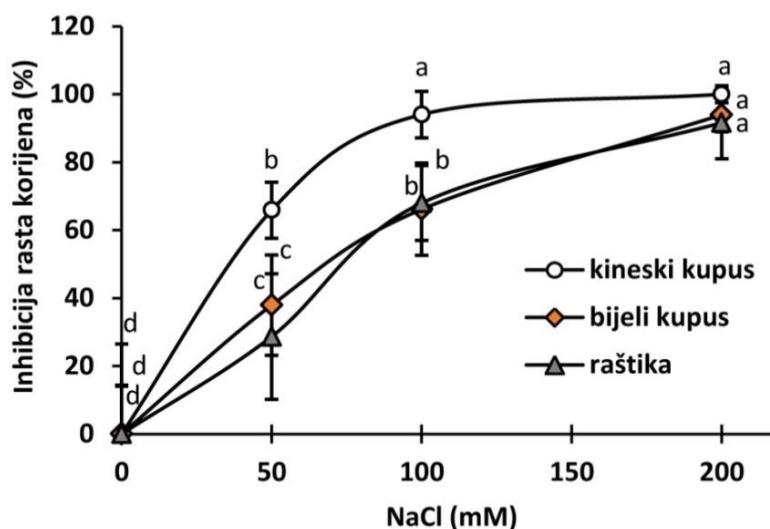
Razina ekspresije gena za auksin-amidohidrolaze pri povišenom salinitetu bila je promjenjena u odnosu na kontrole. U korijenu kineskog kupusa zabilježen je dvostruki porast količine transkripta *BraIAR3* pri 100 mM NaCl te čak šest puta pri 200 mM. Najviši saliniteta (200 mM) također je utjecao na porast razine transkripta *BraILR1* od pet puta u korijenu kineskog kupusa, dok pri nižim koncentracijama soli nisu zabilježene statistički značajne promjene. Solni stres nije utjecao na promjene u ekspresiji gena *BraILL2*, kako u korijenu tako i u listovima. U listovima, transkript *BraIAR3* bio je dvostruko povišen jedino pri 50 mM u odnosu na kontrolu dok su više točke saliniteta (100 i 200 mM) utjecale na promjene u razini ekspresije *BraILR1* čime je peterostruko više transkripta izmjereno pri 200 mM solnom stresu.

3.3. KOMPARACIJA ODGOVORA KUPUSNJAČA: KINESKOG KUPUSA (*B. rapa*), BIJELOG KUPUSA (*B. oleracea* var. *capitata*) I RAŠTIKE (*B. oleracea* var. *acephala*) NA POVIŠENI SALINITET

Tri komercijalno interesantne kupusnjače (kineski kupus, bijeli kupus i raštika) ispitane su na solni stres testom inhibicije korijena te su njihovi odgovori na stres komparirani na hormonskoj razini.

3.3.1. Inhibicija rasta korijena klijanaca

Brzi odgovor triju komercijalno važnih kupusnjača na povišeni salinitet istražen je testom inhibicije korijena na klijanacima. Rezultati testova inhibicije rasta korijena pokazali su inhibitorni učinak rastuće koncentracije NaCl (50, 100 i 200 mM) na rast korijena klijanaca kineskog kupusa, bijelog kupusa i raštike (Slika 30). Tretman 50 mM soli inhibirao je rast korijena kineskog kupusa 63%, bijelog kupusa 37% i raštike 28% u odnosu na kontrolne klijanice. Tretman 100 mM soli rezultirao je 94% inhibicijom rasta korijena kineskog kupusa dok je pri istoj koncentraciji soli inhibicija rasta korijena bijelog kupusa i raštike iznosila 67% u odnosu na kontrolne klijanice. Pri 200 mM NaCl, rast korijena kineskog kupusa bio je u potpunosti inhibiran (100%) dok je inhibicija rasta korijena bijelog kupusa i raštike iznosila 93% u odnosu na kontrolne klijanice. Na osnovu rezultata testova inhibicije korijena vidljivo je da su klijaneci kineskog kupusa značajno osjetljiviji na solni stres u odnosu na klijanice bijelog kupusa i raštike.



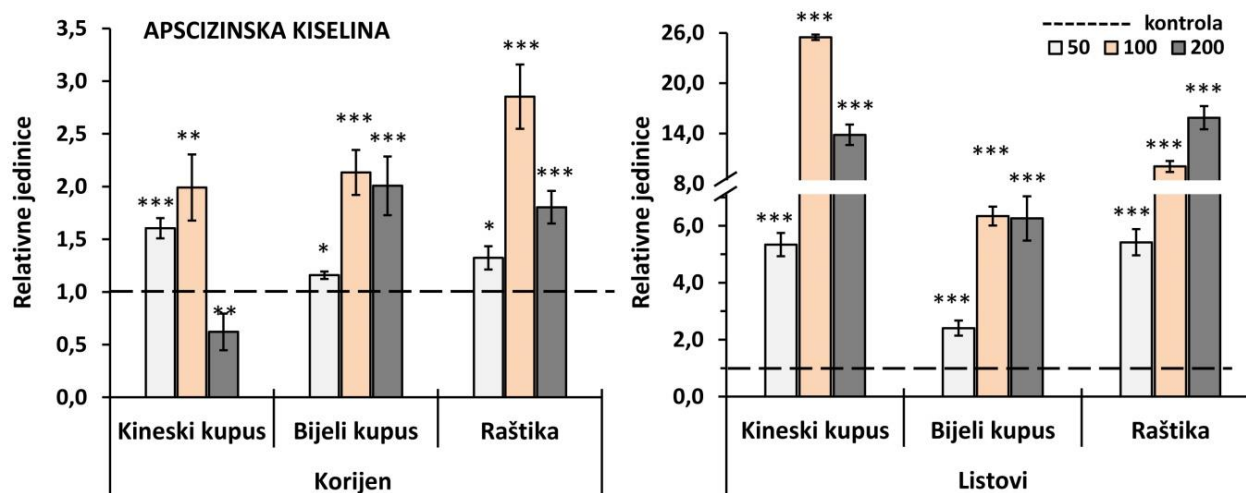
Slika 30. Inhibicija rasta korijena kineskog kupusa, bijelog kupusa i raštike uslijed solnog stresa (0-200 mM NaCl). Rezultati su izraženi kao postotak (%) u odnosu na odgovarajuće kontrole (netretirane klijanice) uslijed 24h tretmana. Rezultati su srednja vrijednost \pm SD (n=30). Vrijednosti označene različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju u

3.3.2. Analize hormona stresa

Hormoni stresa: abscizinska kiselina (ABA), salicilna kiselina (SA) i jasmonati tj. jasmonska kiselina (JA) i jasmonoil-izoleucin (JA-IIe) identificirani su i kvantificirani tekućinskom kromatografijom visoke učinkovitosti uz korištenje spektrometra masa (UHPLC-MS/MS) u listovima i korijenu kupusnjača uzgojenih hidroponski i tretiranih NaCl (50-200 mM). Apsolutne količine hormona stresa (pmol/g s.m.) prikazane su u poglavlju 9. Prilozi. Izmjerene vrijednosti pri različitim koncentracijama soli (50-200 mM NaCl) normalizirane su na odgovarajuće kontrole (0 mM) za svaki kultivar i prikazane na Slikama 31-33.

Promjene u količinama ABA u korijenu i listovima kineskog kupusa, bijelog kupusa i raštike uslijed solnog stresa prikazane su na Slici 31.

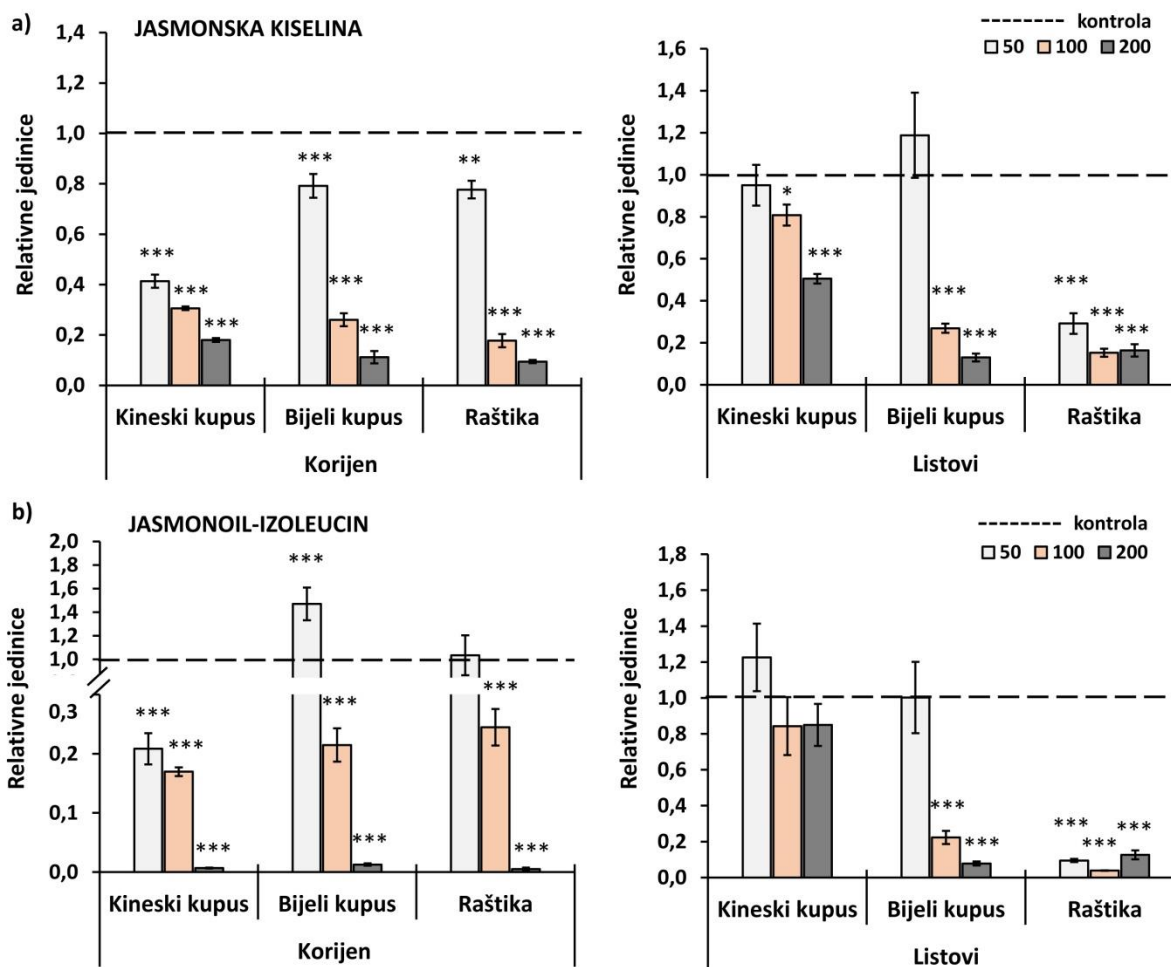
Tretman najnižom koncentracijom NaCl (50 mM) rezultirao je porastom količine ABA u korijenu triju kupusnjača na statistički značajnoj razini u odnosu na kontrolne biljke pri čemu je najizraženiji porast zabilježen u korijenu kineskog kupusa. Pri 100 mM otopini soli u korijenu kineskog kupusa i bijelog kupusa koncentracija ABA je porasla dva puta, a u korijenu raštike tri puta u odnosu na kontrolne biljke. Najviša koncentracija soli (200 mM) prouzročila je pad razine ABA u korijenu kineskog kupusa na 40% vrijednosti izmjerene u kontrolnim uzorcima. U korijenu bijelog kupusa pri 200 mM NaCl razina ABA bila je približno jednaka kao i pri 100 mM tretmanu, a u korijenu raštike gotovo dvostruko viša u odnosu na kontrolne biljke. U listovima triju kultivara pri svim koncentracijama soli (50, 100 i 200 mM) izmjeren je statistički značajan porast abscizinske kiseline s najvišom razinom značajnosti. Uslijed 50 mM NaCl porast ABA u listovima bijelog kupusa bio je 2,5 puta viši, a u listovima kineskog kupusa i raštike 5,5 puta viši u odnosu na kontrolne biljke. Porast koncentracije soli (100 mM) inducirao je porast količine ABA u listovima bijelog kupusa 6 puta, u listovima raštike 10 puta te u listovima kineskog kupusa čak 25 puta u odnosu na kontrole. Pri 200 mM soli u listovima bijelog kupusa koncentracija ABA je bila približno jednaka kao i pri 100 mM tretmanu, dok je kod kineskog kupusa i raštike bila oko 15 puta viša u odnosu na kontrolne listove. Tretman najvišom koncentracijom soli uzrokovao je pad sadržaja ABA u listovima kineskog kupusa, a u listovima raštike porast oko 1,5 puta u odnosu na 100 mM NaCl.



Slika 31. Promjene u razini apscizinske kiseline u korijenu i listovima kineskog kupusa, bijelog kupusa i raštike uslijed solnog stresa (50, 100 i 200 mM NaCl). Rezultati su izraženi kao relativne jedinice u odnosu na odgovarajuće kontrole (vrijednost 1) za svaki kultivar (n=3 za kineski kupus; n=4 za bijeli kupus i raštiku). Zvezdice prikazuju statistički značajnu razliku u tretmanima (50, 100 i 200 mM NaCl) u odnosu na kontrolu (0 mM NaCl) u Studentovom t-testu (t-test; *, **, i *** odgovaraju redom p-vrijednostima $0,05 > p > 0,01$; $0,01 > p > 0,001$; i $p < 0,001$).

Utjecaj solnog stresa na promjene u koncentracijama jasmonata u korijenu i listovima kineskog kupusa, bijelog kupusa i raštike prikazan je na Slici 32.

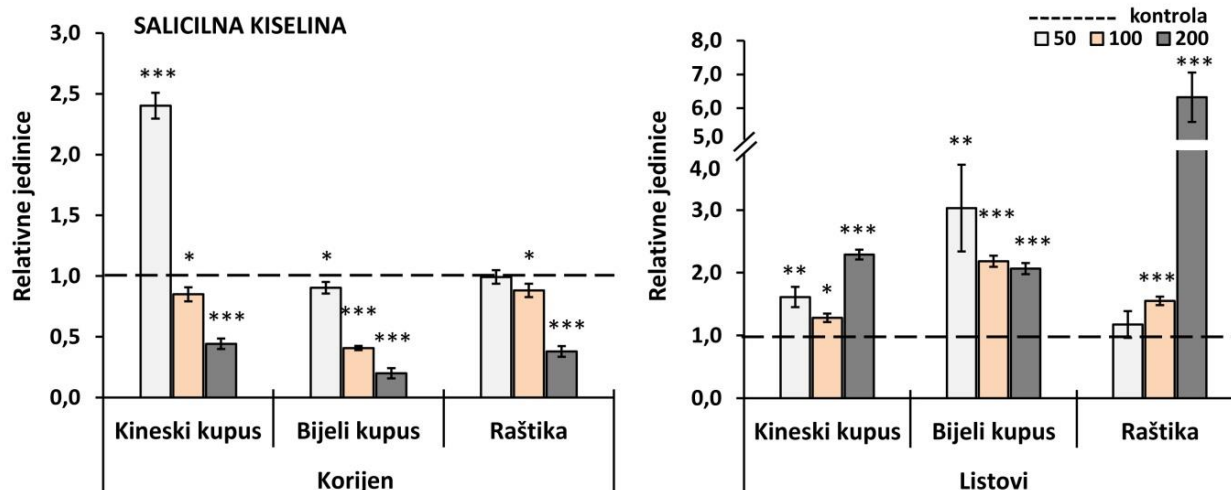
Tretmani različitim koncentracijama soli (50, 100 i 200 mM) djelovali su inhibitorno na jasmonsku kiselinu (JA) u korijenu triju kupusnjača u odnosu na kontrolne biljke na statistički značajnoj razini (Slika 32a). JA u korijenu bijelog kupusa i raštike je iznosila 80%, 20% i 10% sadržaja JA izmjerene u kontrolnim biljkama pri 50, 100 i 200 mM soli. Pad u sadržaju JA od 60%, 70% i 80% u odnosu na kontrolne biljke izmjeren je pri 50, 100 i 200 mM NaCl u korijenu kineskog kupusa. Solni tretmani pokazali su sličan učinak i na koncentracije jasmonoil-izoleucina (JA-Ile) u korijenu sva tri kultivara (Slika 32b). Pri najnižoj koncentraciji soli (50 mM) JA-Ile u korijenu raštike je bio nepromijenjen, u korijenu bijelog kupusa statistički povišen 1,2 puta, a u korijenu kineskog kupusa 5 puta niži u odnosu na kontrolne biljke. S porastom koncentracija soli (100 i 200 mM NaCl) količine JA-Ile u sva tri kultivara bile su dodatno značajno smanjene. U listovima, najniža koncentracija NaCl (50 mM) nije utjecala na promjene u sadržaju JA kod kineskog i bijelog kupusa, dok je u listovima raštike izmjereno 3,3 puta manje JA u odnosu na kontrolne biljke (Slika 32a). Porast koncentracije soli u tretmanima rezultirao je statistički značajnim kontinuiranim opadanjem količine JA u listovima triju kupusnjača. Količina JA u listovima kineskog kupusa pri 100 mM soli iznosila je 80%, a pri 200 mM soli 50% sadržaja JA prisutne u kontrolama. U listovima bijelog kupusa pad sadržaja JA od 70% i od 87% izmjeren je pri 100 i 200 mM tretmanu. U listovima raštike, uslijed povišene koncentracije soli (100 i 200 mM) značajno se smanjila razina JA (za 80% od vrijednosti izmjerene u kontrolama). Tretman trima koncentracijama soli nije rezultirao promjenama u JA-Ile u listovima kineskog kupusa na statistički značajnoj razini (Slika 32b). Više koncentracije soli (100 i 200 mM), prouzročile su statistički značajan pad JA-Ile u listovima bijelog kupusa na 20% i 10% sadržaja JA-Ile u kontrolnim biljkama. Svi solni tretmani uzrokovali su statistički značajno smanjenje razine JA-Ile u listovima raštike pri čemu su se izmjerene vrijednosti kretale oko 10% kontrole.



Slika 32. Promjene u razini jasmonske kiseline (a) i jasmonoil-izoleucina (b) u korijenu i listovima kineskog kupusa, bijelog kupusa i raštike uslijed uslijed solnog stresa (50, 100 i 200 mM NaCl). Rezultati su izraženi kao relativne jedinice u odnosu na odgovarajuće kontrole (vrijednost 1) za svaki kultivar (n=3 za kineski kupus; n=4 za bijeli kupus i raštiku). Zvezdice prikazuju statistički značajnu razliku u tretmanima (50, 100 i 200 mM NaCl) u odnosu na kontrolu (0 mM NaCl) u Studentovom t-testu (t-test; *, **, i *** odgovaraju p-vrijednostima redom $0,05 > p > 0,01$; $0,01 > p > 0,001$; i $p < 0,001$).

Promjene u salicilnoj kiselini u korijenu i listovima kineskog kupusa, bijelog kupusa i raštike uslijed solnog stresa prikazane su na Slici 33.

Promjene u koncentraciji salicilne kiseline pri solnim tretmanima u korijenu i listovima triju kupusnjača zabilježene su gotovo pri svim solnim tretmanima (50, 100 i 200 mM NaCl) na statistički značajnoj razini. Tretman 50 mM NaCl rezultirao je porastom koncentracije SA u korijenu kineskog kupusa, dok je pri istoj koncentraciji soli SA u korijenu bijelog kupusa bila blago snižena, a u korijenu raštike nepromijenjena u odnosu na kontrolne biljke. Salinitet od 100 mM soli uzrokovao je statistički značajan pad količine SA u korijenu kineskog kupusa i raštike od 10%, a u korijenu bijelog kupusa od 50% u odnosu na kontrole. Porast koncentracije soli (200 mM) potaknuo je daljnji pad SA u korijenu sva tri kultivara pri čemu je razina SA kod kineskog kupusa i raštike iznosila 40%, a kod bijelog kupusa 20% sadržaja SA u kontrolnim biljkama. U listovima bijelog kupusa najniža koncentracija soli (50 mM) dovela je do najvišeg porasta SA od 3 puta te porasta od 1,6 puta u listovima kineskog kupusa u odnosu na kontrole. Tretman 50 mM NaCl nije imao utjecaja na SA u listovima raštike. Pri 100 mM soli SA je porasla približno oko 1,5 puta u listovima raštike i kineskog kupusa i 2 puta u listovima bijelog kupusa. U najvišoj točki saliniteta (200 mM) koncentracija SA u listovima bijelog kupusa približno je ostala jednaka kao i pri 100 mM soli, a u listovima kineskog kupusa je bila dvostruko viša u odnosu na kontrolne biljke. Najizraženiji utjecaj najviše koncentracije soli i porast količine SA od 6 puta u odnosu na kontrolne biljke izmjeren je u listovima raštike.



Slika 33. Promjene u razini salicilne kiseline u korijenu i listovima kineskog kupusa, bijelog kupusa i raštike uslijed uslijed solnog stresa (50, 100 i 200 mM NaCl). Rezultati su izraženi kao relativne jedinice u odnosu na odgovarajuće kontrole (vrijednost 1) za svaki kultivar (n=3 za kineski kupus; n=4 za bijeli kupus i raštiku). Zvezdice prikazuju statistički značajnu razliku u tretmanima (50, 100 i 200 mM NaCl) u odnosu na kontrolu (0 mM NaCl) u Studentovom t-testu (t-test; *, **, i *** odgovaraju redom p-vrijednostima $0,05 > p > 0,01$; $0,01 > p > 0,001$; i $p < 0,001$).

3.3.3. Analize indolskih spojeva uključenih u biosintezu i metabolizam auksina

Utjecaj povišenog saliniteta na metabolizam auksina (indol-3-octene kiseline, IAA) u kupusnjača uzgojenih hidroponski i tretiranih NaCl (0-200 mM) određen je na osnovu analiza indolskih spojeva koji su glavne komponente homeostatskih procesa auksina (tj. procesa biosinteze, konjugacije i detoksifikacije). Prekursori i metaboliti auksina te aktivni auksin IAA određeni su tekućinskom kromatografijom visoke učinkovitosti uz korištenje spektrometra masa (UHPLC-MS/MS). Apsolutne kvantificirane količine (pmol/g s.m.) metabolita auksina u korijenu i listovima triju kultivara kupusnjača prikazane su u poglavlju poglavlju 9. Prilozi. Kako bi bile usporedive, izmjerene vrijednosti uslijed solnih tretmana (50-200 mM NaCl) normalizirane su na odgovarajuće kontrole (0 mM) za svaki kultivar. Promjene u prekursorima Trp-ovisnog biosintetskog puta indol-3-octene kiseline (IAA), slobodnoj IAA i kataboličkim spojevima u korijenu kineskog kupusa, bijelog kupusa i raštike prikazane su na Slici 34, a promjene u listovima kupusnjača prikazane su na Slici 35.

Koncentracije antranilata (ANT), koji predstavlja rani prekursor biosintetskog puta IAA, bile su statistički povišene u kineskom i bijelom kupusu pri svim solnim tretmanima, dok je sadržaj ANT u korijenu raštike ostao nepromijenjen u odnosu na kontrolne biljke. Tretman 50 mM soli inducirao je porast ANT 1,6 puta u korijenu kineskog kupusa te 2,1 puta u korijenu bijelog kupusa u odnosu na kontrole. Pri višim koncentracijama soli (100 i 200 mM), ANT se u korijenu kineskog i bijelog kupusa kupusa zadržao povišen: od 1,2 u kineskom te 2,3-1,7 u bijelom kupusu u odnosu na kontrole.

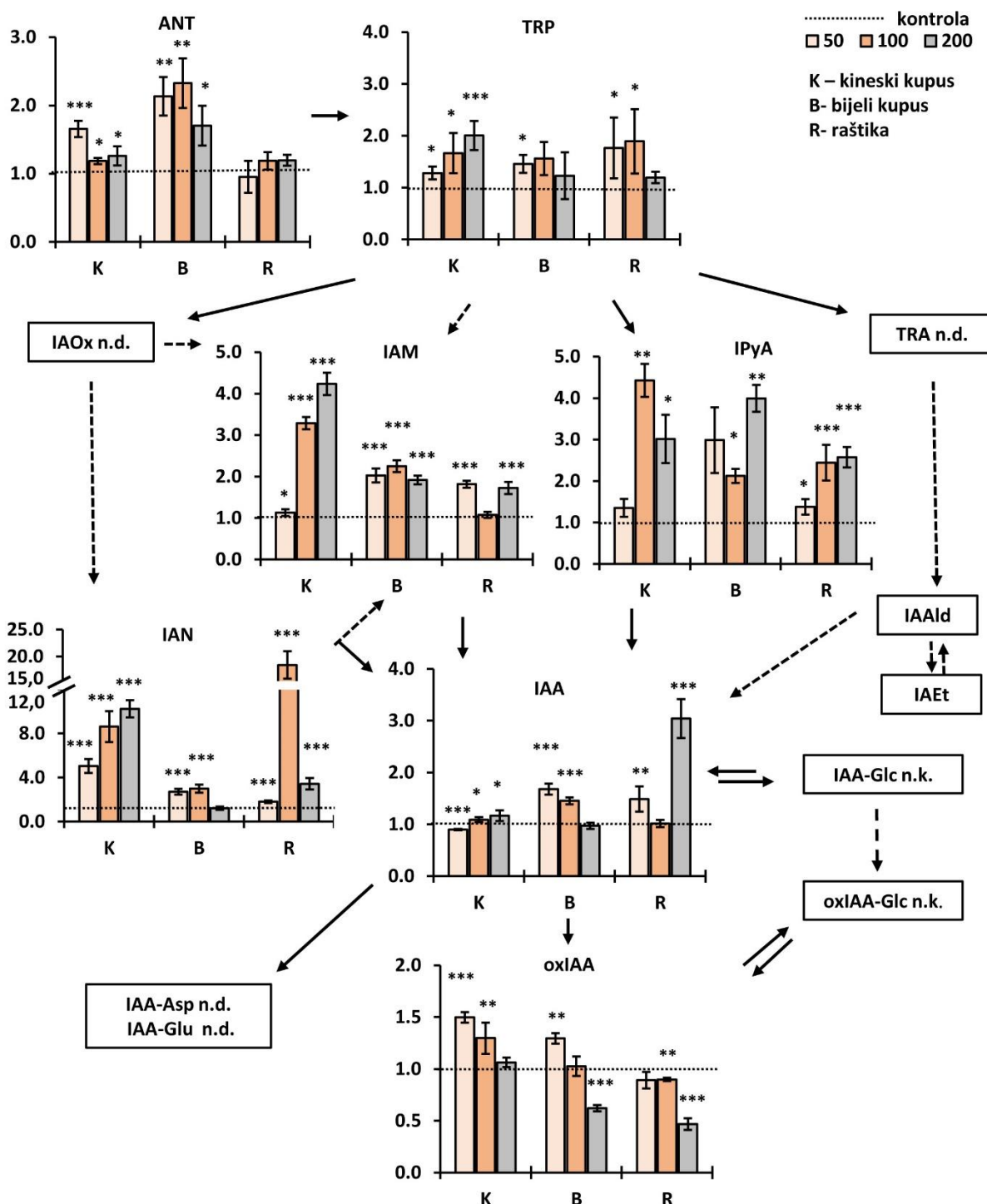
Solni tretmani utjecali su na porast triptofana (TRP) u korijenu kineskog kupusa na statistički značajnoj razini, pri čemu je na 200 mM soli izmjereno dvostruko više TRP u odnosu na korijen kontrolnih biljaka. U korijenu bijelog kupusa TRP je bio statistički povišen samo pri 50 mM soli (1,5 puta), a u korijenu raštike 1,8 puta pri 50 i 100 mM salinitetu u odnosu na kontrole.

Dva od četiri moguća prekursora auksina u Trp-ovisnim putevima biosinteze IAA, indol-3-acetaldoxim (IAOx) i triptamin (TRA) nisu detektirani u kupusnjačama u primijenjenim eksperimentalnim uvjetima. Osim IAOx i TRA, biosinteza IAA moguća je iz indol-3-acetonitrila (IAN), indol-3-acetamida (IAM) i indol-3-piruvatne kiseline (IPyA). Solni tretmani (50, 100 i 200 mM) rezultirali su kontinuiranim porastom IAN od 5, 8,6 i 10 puta u korijenu kineskog kupusa u odnosu na kontrole. U korijenu bijelog kupusa, pri 50 i 100 mM salinitetu IAN je bio statistički povišen 2,7 i 3 puta u odnosu na kontrole, a tretman pri 200 mM NaCl rezultirao je padom IAN na količine u kontrolnim biljkama. U korijenu raštike, IAN je bio statistički povišen pri svim koncentracijama soli i to 1,8, 18 i 3,4 puta pri 50, 100 i 200 mM NaCl u odnosu na kontrole. Solni tretmani utjecali su i na promjene u sadržaju IAM u korijenu kupusnjača. Najizraženiji porast IAM zabilježen je u korijenu kineskog kupusa pri 100 i 200 mM soli pri čemu su izmjerene količine bile 3,3 i 4,2 puta više u odnosu na one u korijenu kontrola. U korijenu bijelog kupusa pri sve tri koncentracije soli IAM je bio dvostruko viši u odnosu na kontrolne biljke. Tretmani najnižom i najvišom koncentracijom NaCl rezultirali su porastom

IAM 1,8 i 1,7 puta u korijenu raštike, dok je pri 100 mM salinitetu sadržaj IAM bio jednak kontrolama. Utjecaj solnih tretmana na IPyA na statistički značajnoj razini zabilježen je u korijenu kineskog, bijelog kupusa i raštike pri višim koncentracijama soli. Najniža koncentracija soli (50 mM) značajno je utjecala na porast IPyA u korijenu raštike. Tretman 100 mM natrijevim kloridom rezultirao je porastom IPyA od 4,4 puta kod kineskog kupusa, te 2 i 2,4 puta kod bijelog kupusa i raštike na statistički značajnoj razini u odnosu na korijene kontrolnih biljaka. Pri najvišoj koncentraciji soli (200 mM) sadržaj IPyA u korijenu kineskog kupusa bio je trostruko viši, u korijenu bijelog kupusa četverostruko viši, a u korijenu raštike 2,5 puta viši u odnosu na kontrole.

Solni tretmani rezultirali su i promjenama koncentracije aktivnog auksina tj. IAA u korijenu kupusnjača. Pri najnižem salinitetu (50 mM) količina IAA u korijenu kineskog kupusa bila je statistički značajno snižena na 90% vrijednosti kontrole. Suprotno tome, ista koncentracija uzrokovala je porast IAA od 1,7 te 1,5 puta kod bijelog kupusa i raštike u odnosu na korijene kontrolnih biljaka. Pri koncentracijama soli od 100 i 200 mM zabilježen je porast IAA od 1,1 i 1,2 puta u korijenu kineskog kupusa. U korijenu bijelog kupusa pri 100 mM soli IAA je bila 1,5 puta viša dok je u korijenu raštike sadržaj IAA bio isti u odnosu na kontrole. Tretman najvišom koncentracijom soli (200 mM) rezultirao je padom IAA na vrijednosti kontrole u korijenu bijelog kupusa te trostrukim porastom IAA u korijenu raštike.

Količina oksidirane forme IAA, 2-oksoindol-3-octena kiselina (oxIAA) u uvjetima saliniteta bila je statistički povišena u korijenu kineskog i bijelog kupusa pri 50 mM soli (1,5 i 1,2 puta u odnosu na kontrole). Porastom koncentracije soli, oxIAA opada u korijenu kineskog kupusa gdje je pri najvišoj koncentraciji soli (200 mM) sadržaj oxIAA bio jednak sadržaju kontrolnih biljaka. U korijenu bijelog kupusa uslijed 100 mM saliniteta količina oxIAA je bila jednaka kontrolnim vrijednostima, a pri 200 mM soli 40% niža u odnosu na kontrolu. U korijenu raštike došlo je do statistički značajnog smanjenja sadržaja oxIAA, tj. količine su iznosile 10% pri 100 mM NaCl te 50% pri 200 mM NaCl u odnosu na vrijednosti izmjerene u kontrolnim biljkama. Aminokiselinski konjugati IAA-Asp i IAA-Glu nisu detektirani u korijenu kupusnjača, a IAA-glukozil ester te oxIAA-glukozil ester nisu kvantificirani uslijed tehničkih problema tijekom analiza.

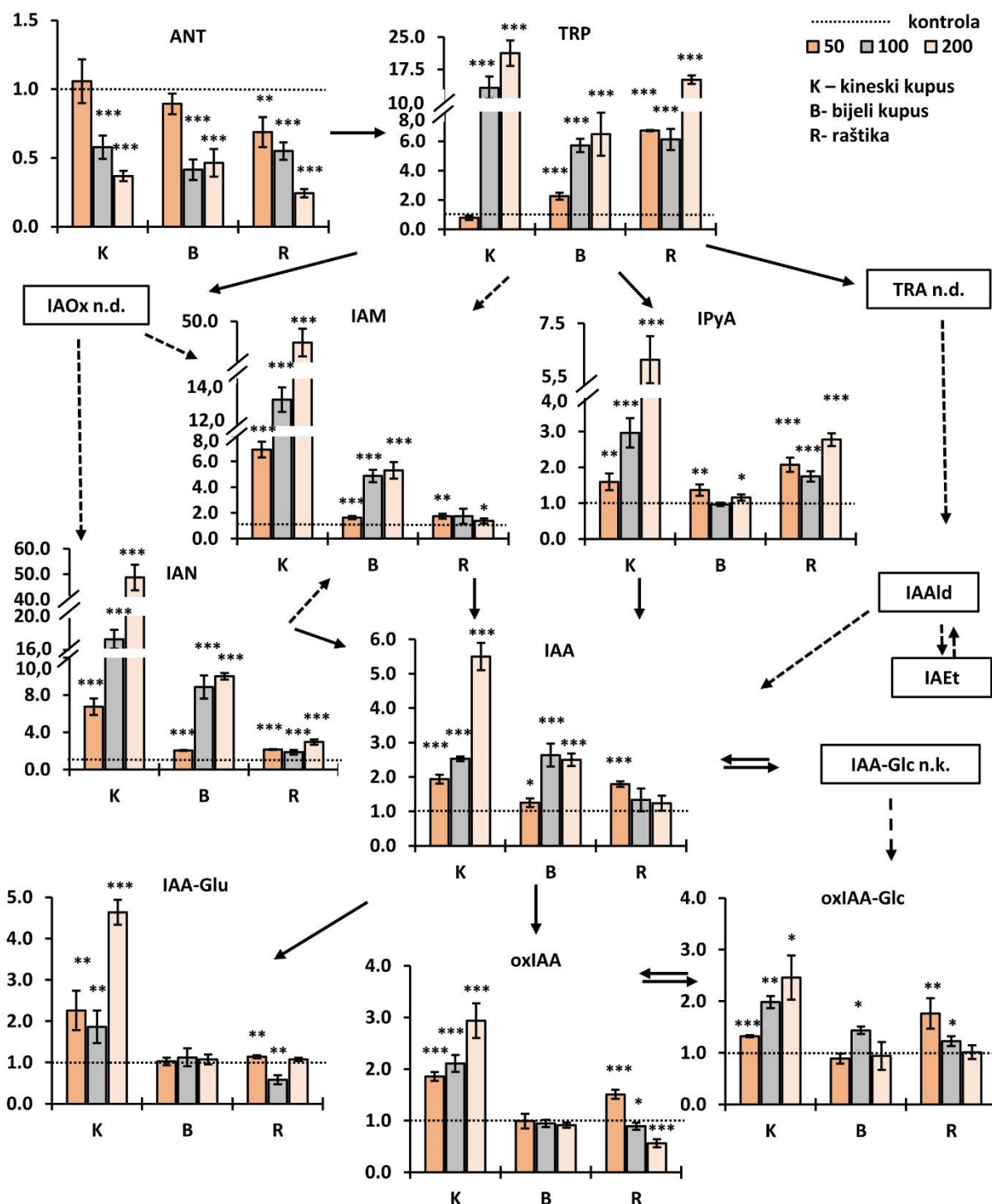


Slika 34. Promjene u metabolizmu auksina u korijenu kupusnjača pri povišenom salinitetu (50, 100 i 200 mM NaCl): indol-3-octena kiselina (IAA); prekursori biosinteze: antranilat (ANT), triptofan (TRP), indol-3-acetamid (IAM), indol-3-piruvatna kiselina (IPyA), indol-3-acetonitril (IAN) i metaboliti: 2-oksoindol-3-octena kiselina (oxIAA), indol-3-acetil-L-aspartat (IAA-Asp), indol-3-acetil-1-glukozil ester (IAA-Glc), 2-oksoindol-3-acetil-1-glukozil ester (oxIAA-Glc). Rezultati su izraženi kao relativne jedinice u odnosu na odgovarajuće kontrole (vrijednost 1) za svaki kultivar (n=4). Zvijezdice prikazuju statistički značajnu razliku u tretmanima (50, 100 i 200 mM NaCl) u odnosu na kontrolu (0 mM NaCl) u Studentovom t-testu (t-test; *, **, i *** odgovaraju redom p-vrijednostima $0,05 > p > 0,01$; $0,01 > p > 0,001$; i $p < 0,001$). n.d. - nije detektirano, n.k. - nije kvantificirano.

Promjene u indolskim metabolitima bile su praćene i u listovima raštike, te kineskog i bijelog kupusa uslijed solnih tretmana (Slika 35). Tako je zabilježen kontinuirani pad u količinama ANT u listovima kupusnjača s povećanjem koncentracije soli. Tretman najnižom koncentracijom soli (50 mM) rezultirao je padom ANT od 30% u listovima raštike u odnosu na kontrolne biljke, dok u listovima kineskog i bijelog kupusa nije bilo statistički značajnih promjena. Više koncentracije soli uzrokovale su dodatno smanjenje razina ANT do 60% u listovima kineskog kupusa, do 50% u listovima bijelog kupusa te do 75% u listovima raštike u odnosu na kontrole. Nasuprot negativnom učinku na količine ANT, povišeni salinitet uzrokovao je kontinuirani porast TRP u tretiranim kupusnjačama. Tretman 50 mM NaCl uzrokovao je porast TRP od 2,2 puta u listovima bijelog kupusa i 6,7 puta u listovima raštike, dok u listovima kineskog kupusa nije bilo promjena u odnosu na kontrole. U listovima kineskog kupusa je tako koncentracija TRP porasla 20 puta, u bijelom kupusu 6 puta, a u raštike 15 puta pri tretmanu maksimalnom koncentracijom NaCl (200 mM) u odnosu na kontrolne biljke. Na statistički značajnoj razini sve koncentracije soli utjecale su na porast IAN u listovima tretiranih kupusnjača. U listovima kineskog kupusa IAN je kontinuirano rastao porastom koncentracije soli u otopini te je sadržaj IAN u odnosu na kontrolne biljke bio 7, 17 i 49 puta viši pri 50, 100 i 200 mM salinitetu. U listovima bijelog kupusa IAN je porastao za 2, 9 i 10 puta u odnosu na kontrole porastom saliniteta. U listovima raštike IAN je pri 50 i 100 mM soli bio dvostruko viši, a pri 200 mM soli trostruko viši u odnosu na kontrole. Povišeni salinitet imao je sličan učinak i na IAM pri čemu je kontinuirani porast IAM najizraženije prisutan u listovima kineskog kupusa gdje je zabilježeno 45 puta veća koncentracija pri najvišem solnom stresu u odnosu na kontrolne biljke. U listovima bijelog kupusa došlo je porasta IAM do 5 puta pri 100 i 200 mM soli u odnosu na kontrole. Najslabije izražen porast IAM prisutan je u listovima raštike (do 1,5 puta pri svim solnim tretmanima). Sadržaj prekursora IPyA uslijed povišenog saliniteta također je bio promjenjen. Tretman 50 mM soli utjecao je na porast u sadržaju IPyA od 1,6 puta, 1,4 puta i 2 puta u listovima kineskog kupusa, bijelog kupusa i raštike u odnosu na kontrolne biljke. Značajnije razlike u porastu IPyA kod kineskog kupusa izmjerene su pri višim koncentracijama soli. U listovima kineskog kupusa IPyA je bila trostruko viša pri tretmanu 100 mM NaCl, te šesterostuko viša uslijed 200 mM saliniteta. U listovima bijelog kupusa samo je najviši solni tretman uzrokovao promjene u razini IPyA (do 1,3 puta). Povišenje sadržaja IPyA od 1,7 te 2,7 puta uslijed 100 i 200 mM saliniteta je izmjereno u listovima raštike.

Kontinuirani porast IAA uslijed solnih tretmana izmjeren je u listovima kineskog kupusa i bijelog kupusa, dok je u raštike prisutan padajući trend s porastom koncentracije soli. Razina IAA se povećala u listovima kineskog kupusa od 2 (pri 50 mM NaCl) do 5,5 puta (pri 200 mM NaCl) te u listovima bijelog kupusa od 1,3 puta (pri 50 mM NaCl) do 2,5 puta pri višim solnim tretmanima. U listovima raštike statistički značajan porast od 1,8 puta u odnosu na kontrole izmjeren je pri 50 mM salinitetu, a porastom koncentracije soli došlo je do opadanja sadržaja IAA na razinu kontrole.

Koncentracija oksidiranog oblika IAA, oxIAA statistički je bila značajno povišena pri sve tri koncentracije NaCl-a u listovima kineskog kupusa što upućuje na pojačani proces oksidacije auksina uslijed stresa. Tako je količina oxIAA u kineskom kupusu bila trostruko viša pri 200 mM NaCl u odnosu na kontrolne biljke. U listovima bijelog kupusa nije došlo do promjena u oxIAA uslijed povišenog saliniteta, dok je u listovima raštike sadržaj oxIAA porastao 1,5 puta u odnosu na kontrole pri 50 mM tretmanu da bi zatim značajno bio smanjen pri višim koncentracijama soli. Trend promjena u sadržaju oksidiranog konjugata s glukozom oxIAA-Glc sličan je promjenama u katabolitu oxIAA u ispitivanim kupusnjačama: javlja se porast kod kineskog kupusa, pad kod raštike te relativno nepromijenjeno stanje kod bijelog kupusa s obzirom na porast koncentracije stresora. Povišeni salinitet utjecao je na sličan način i na promjene u aminokiselinskom konjugatu IAA-Glu koji predstavlja detoksificiranu formu IAA. Značajniji porast IAA-Glu sa solnim stresom zabilježen je u kineskom kupusu (do 5 puta pri 200 mM NaCl), dok su te promjene manje značajne u listovima raštike ili nema promjena u razini IAA-Glu kao u slučaju bijelog kupusa. U listovima kupusnjača IAA-Glc nije kvantificiran uslijed nisu kvantificirani uslijed tehničkih problema tijekom analiza.



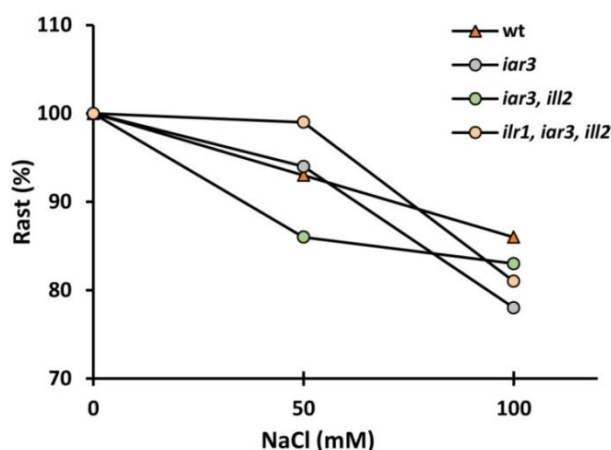
Slika 35. Promjene u metabolizmu auksina u listovima kupusnjača pri povišenom salinitetu: indol-3-octena kiselina (IAA); prekursori biosinteze: antranilat (ANT), triptofan (TRP), indol-3-acetamid (IAM), indol-3-piruvatna kiselina (IPyA), indol-3-acetonitril (IAN) i auksinski metaboliti: 2-oksoindol-3-octena kiselina (oxIAA), indol-3-acetil-L-aspartat (IAA-Asp), indol-3-acetil-1-glukozil ester (IAA-Glc), 2-oksoindol-3-acetil-1-glukozil ester (oxIAA-Glc). Rezultati su izraženi kao relativne jedinice u odnosu na odgovarajuće kontrole (vrijednost 1) za svaki kultivar (n=4). Zvezdice prikazuju statistički značajnu razliku u tretmanima (50, 100 i 200 mM NaCl) u odnosu na kontrolu (0 mM NaCl) u Studentovom t-testu (t-test; *, **, i *** odgovaraju redom p-vrijednostima $0,05 > p > 0,01$; $0,01 > p > 0,001$; i $p < 0,001$). n.d. - nije detektirano, n.k. - nije kvantificirano.

3.4. FUNKCIONALNA ISTRAŽIVANJA NA UROČNJAKU (*Arabidopsis thaliana*) USLIJED POVIŠENOG SALINITETA

Funkcionalna istraživanja uloge gena uključenih u održavanje homeostaze auksina uslijed povišenog saliniteta provedena su na mutantama i odgovarajućem divljem tipu uročnjaka (*A. thaliana*) ekotipa Wassilewskija. Mutante primijenjene u istraživanju imaju narušene funkcije enzima auksin-amidohidrolaza IAR3, ILL2 i ILR1. Istraživanje je provedeno na jednostrukoj *iar3*, dvostrukoj *iar3, ill2* i trostrukoj *ilr1, iar3, ill2* mutanti te divljem tipu. Odgovor klijanaca uročnjaka praćen je testom inhibicije rasta korijena te su izvršene analize hormona stresa i indolskih spojeva uključenih u biosintezu i metabolizam auksina uslijed povišenog saliniteta.

3.4.1. Inhibicija rasta korijena

Rast korijena klijanaca divljeg tipa (wt) i auksin-amidohidrolaznih mutanti uročnjaka uslijed povišenog saliniteta (50 i 100 mM NaCl) u trajanju od tri dana prikazan je na Slici 36.

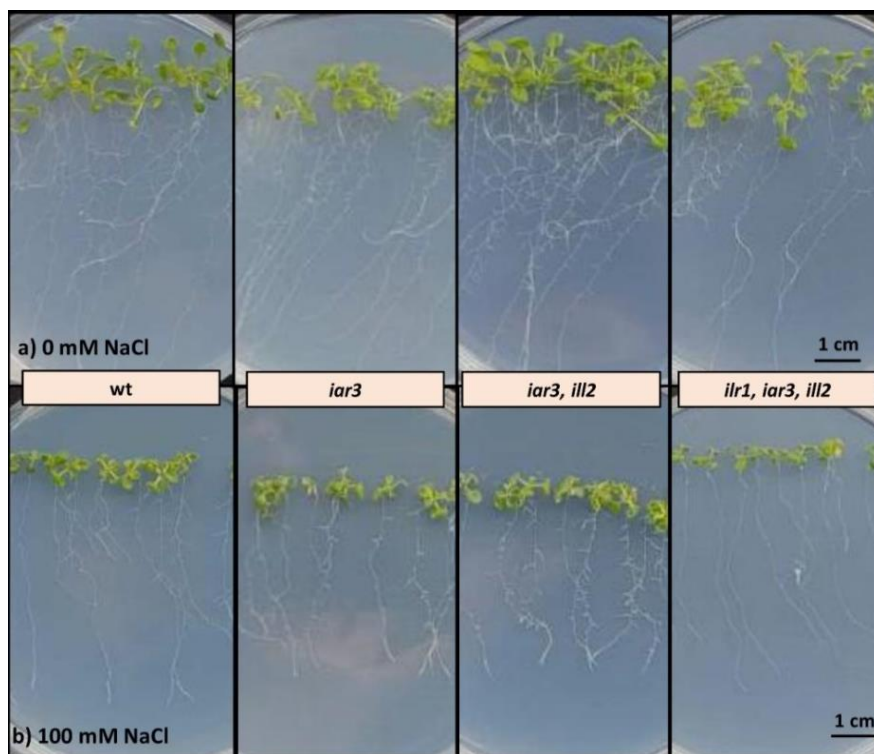


NaCl (mM)	Rast klijanaca (%)			
	wt	<i>iar3</i>	<i>iar3, ill2</i>	<i>ilr1, iar3, ill2</i>
0	100 ± 19	100 ± 16	100 ± 28	100 ± 14
50	93 ± 21	94 ± 19	86 ± 22	99 ± 16
100	86 ± 18	78 ± 17	83 ± 13	81 ± 12

Slika 36. Rast korijena klijanaca uročnjaka *A. thaliana*: divljeg tipa (wt) i auksin-amidohidrolaznih mutanti (jednostruka mutanta *iar3*, dvostruka mutanta *iar3, ill2* i trostruka mutanta *ilr1, iar3, ill2*) uslijed solnog stresa (0- 100 mM NaCl) izražen kao postotak (%) u odnosu na odgovarajuću kontrolu u trajanju od tri dana (n=30).

Krivulje rasta upućuju na promjene u dinamici rasta korijena ispitanih klijanaca uslijed povišenog saliniteta, no radi velike biološke varijabilnosti statistički značajne promjene nisu uočene. Pri 50 mM soli rast korijena wt iznosio je 93%, a pri 100 mM soli 86% rasta korijena kontrolnih klijanaca. Sličan učinak nižeg saliniteta (50 mM) zabilježen je i na rast korijena jednostruke mutante *iar3* uslijed kojeg je izmjereno 94% rasta korijena kontrola. Najviša koncentracija soli (100 mM) rezultirala je inhibicijom rasta korijena *iar3* na 78% kontrolne vrijednosti pri čemu je to ujedno i najviša stopa inhibicije u odnosu na wt i druge mutante. Rast korijena dvostruke mutante *iar3, ill2* uslijed oba tretmana (50 i 100 mM) bio je približno isti i iznosio je 86% i 83% rasta klijanaca u kontrolni uvjetima. Tretman najnižom koncentracijom soli (50 mM) nije utjecao na rast trostruke mutante *ilr1, iar3, ill2* (99%), a pri 100 mM salinitetu stopa rasta iznosila je 81% rasta kontrolnih klijanaca.

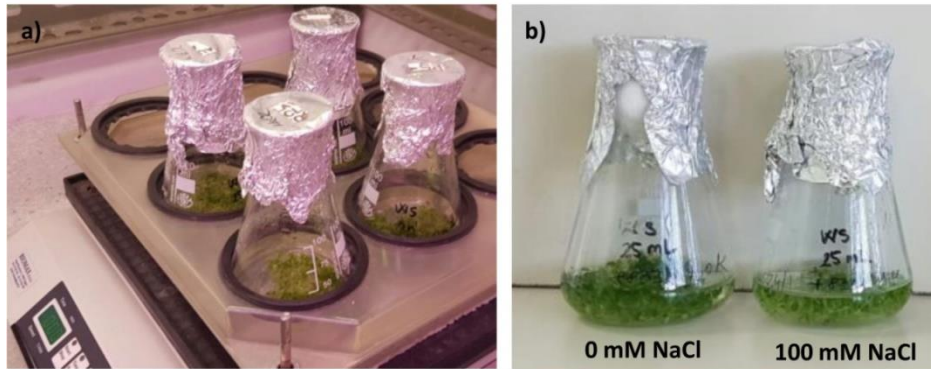
Reprezentativne fotografije klijanaca divljeg tipa (wt) i auksin-amidohidrolaznih mutanti uročnjaka *A. thaliana* u kontrolnim uvjetima (0 mM NaCl) i pri povišenom salinitetu (100 mM NaCl) u trajanju tretmana od 11 dana prikazane su na Slici 37.



Slika 37. Reprezentativne fotografije klijanaca uročnjaka *A. thaliana*: divljeg tipa (wt) i auksin-amidohidrolaznih mutanti (jednostruka mutanta *iar3*, dvostruka mutanta *iar3, ill2* i trostruka mutanta *ilr1, iar3, ill2*) na kontrolnim MS pločama (a) i pri 100 mM NaCl u trajanju od 11 dana (b).

3.4.2. Analize hormona stresa

Uzgoj divljeg tipa uročnjaka i auksin-amidohidrolaznih mutanti za analize hormona stresa uslijed povišenog saliniteta (100 mM NaCl) izvršen je u tekućem MS mediju. Na Slici 38 vidljiv je eksperimentalni postav uzgoja na tresilici.



Slika 38. Uzgoj uročnjaka *A. thaliana* u tekućem MS mediju na tresilici (a) te kontrolni i 100 mM NaCl tretirani *A. thaliana* wt uslijed tri dana solnog stresa (b).

Hormoni stresa: abscizinska kiselina, salicilna kiselina, jasmonati (jasmonska kiselina i jasmonoil-izoleucin) identificirani su i kvantificirani u klijancima divljeg tipa *A. thaliana* te jednostukoj, dvostrukoj i trostrukoj mutanti u genima za auksin-amidohidrolaze pri 100 mM salinitetu metodom tekućinske kromatografije visoke učinkovitosti uz korištenje spektrometra masa (UHPLC-MS/MS). Rezultati su prikazani u Tablici 11.

Trodnevni tretman 100 mM NaCl nije utjecao na promjene u razini hormona stresa (ABA, SA, JA i JA-Ile) u wt uročnjaka. Nadalje, u jednostrukoj auksin-amidohidrolaznoj mutanti *iar3* te trostrukoj *ilr1*, *iar3*, *ill2* zabilježen je statistički značajan porast u razini SA oko 1,6 puta uslijed 100 mM saliniteta u odnosu na kontrolu. Također, u navedenim mutanima sadržaj JA bio je gotovo dvostruko viši uslijed tretmana u odnosu na netretirane mutante. Razina JA-Ile bila je također povišena u obje mutante uslijed solnog stresa, no statistički značajan porast izmjeren je jedino u trostrukoj mutanti. Solni tretman dvostruke mutante *iar3*, *ill2* nije rezultirao promjenama u razini hormona stresa u odnosu na mutante u kontrolnim uvjetima.

Tablica 11. Hormoni stresa: abscizinska kiselina (ABA), salicilna kiselina (SA), jasmonska kiselina (JA) i jasmonoil-izoleucin (JA-Ile) u divljem tipu (wt) te mutantama *iar3*; *iar3, ill2* i *ilr1, iar3, ill2* u kontrolnim uvjetima (0 mM NaCl) i pri salinitetu (100 mM NaCl). Rezultati su srednja vrijednost \pm SD (n=4). Zvezdice prikazuju statistički značajnu razliku između tretmana i kontrole u Studentovom t-testu ($p < 0,05$).

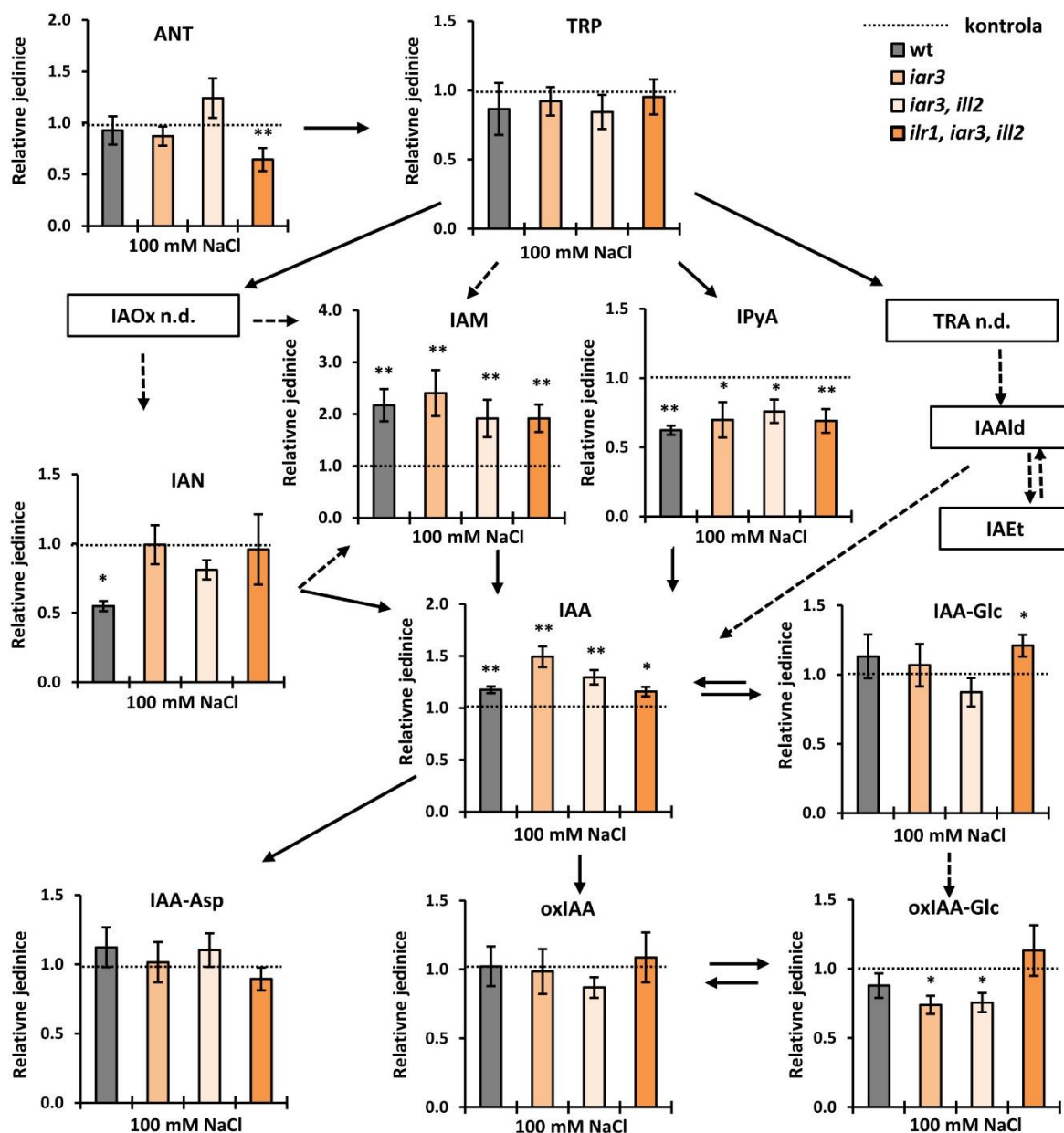
	NaCl (mM)	ABA (ng/g s.m.)	SA (μ g/g s.m.)	JA (ng/g s.m.)	JA-Ile (ng/g s.m.)
wt	0	5,02 \pm 1,71	2,96 \pm 0,23	128,13 \pm 11,84	266,8 \pm 37,1
	100	4,51 \pm 1,07	2,56 \pm 0,77	94,31 \pm 13,75	271,9 \pm 31,0
<i>iar3</i>	0	5,11 \pm 1,23	3,70 \pm 0,92	43,04 \pm 2,88	186,2 \pm 40,0
	100	5,06 \pm 1,37	6,04 \pm 0,54*	90,40 \pm 12,81*	260,1 \pm 55,8
<i>iar3, ill2</i>	0	3,77 \pm 1,21	3,41 \pm 0,41	144,62 \pm 19,81	396,8 \pm 84,3
	100	5,93 \pm 1,47	4,75 \pm 0,97	137,60 \pm 36,09	265,7 \pm 103,5
<i>ilr1, iar3, ill2</i>	0	5,47 \pm 1,63	3,56 \pm 0,18	57,23 \pm 11,22	155,5 \pm 16,9
	100	3,83 \pm 0,59	6,26 \pm 1,18*	101,52 \pm 3,40*	261,4 \pm 36,3*

3.4.3. Analize indolskih spojeva uključenih u biosintezu i metabolizam auksina

Promjene u razini biosintetskih indolnih prekursora, zatim aktivnog auksina IAA, reverzibilnih konjugata IAA koji sudjeluju u procesima održavanja auksinske homeostaze te ireverzibilnih konjugata i metabolita koji pripadaju detoksifikacijskom putu praćene su uslijed povišenog saliniteta (100 mM NaCl) u divljem tipu *A. thaliana* i auksin-amidohidrolaznim mutantama uzgojenim u tekućem MS mediju. Detaljna identifikacija i kvantifikacija auksinskog metabolizma izvršena je tekućinskom kromatografijom visoke učinkovitosti uz korištenje spektrometra masa (UHPLC-MS/MS). Apsolutne kvantificirane količine (pmol/g s.m.) metabolita auksina u wt i mutantama prikazane su u poglavlju 9. Prilozi. U svrhu komparacije, izmjerene vrijednosti uslijed solnog tretmana (100 mM NaCl) normalizirane su na odgovarajuće kontrole (0 mM) za wt i svaki mutantu. Rezultati su prikazani na Slici 39.

Promjene u ranom prekursoru biosinteze auksina, ANT, zabilježene su uslijed 100 mM saliniteta jedino u trostrukoj amidohidrolaznoj mutanti *ilr1, iar3, ill2* pri čemu je izmjerena količina ANT bila za 35% niža u odnosu na kontrole. Solni tretman nije utjecao na promjene u razini TRP u tretiranim mutantama i wt, dok je razina IAM, jednog od četiri IAA prekursora, bila značajno dvostruko viša uslijed 100 mM saliniteta u svim mutantama te wt u odnosu na kontrole. Suprotno tome, solni tretman inducirao je pad auksinskog prekursora IPyA u wt na 60% kontrole te u svim mutantama na oko 70% sadržaja pripadajućih kontrola. Druga dva IAA biosintetska prekursora, IAOx i TRA nisu bili detektirani. Uslijed solnog tretmana količina IAN bila je gotovo dvostruko niža u wt u odnosu na kontrolu, dok je utjecaj saliniteta na promjene u razini IAN u mutantama izostao. Razina IAA u wt i svim auksin-amidohidrolaznim mutantama uslijed 100 mM soli bila je statistički značajno povišena pri čemu je najviši porast u količini IAA (od 1,5 puta u odnosu na kontrolu) zabilježen kod jednostruke mutante *iar3*.

Solni tretman utjecao je na porast reverzibilnog IAA-Glc konjugata jedino u trostrukoj mutanti u odnosu na kontrolu. Nadalje, salinitet nije rezultirao promjenama količine kataboličkih metabolita, IAA-Asp i oxIAA kako u wt tako i u auksin-amidohidrolaznim mutantima, no razina kataboličkog metabolita oxIAA-Glc bila je snižena u jednostrukoj *iar3* te dvostukoj *iar3, ill2* mutanti uslijed solnog tretmana na oko 75% sadržaja kontrola.



Slika 39. Promjene u metabolizmu auksina u *A. thaliana*: divljem tipu (wt) te jednostrukoj mutanti *iar3*, dvostrukoj *iar3, ill2* i trostrukoj *ilr1, iar3, ill2* pri salinitetu od 100 mM NaCl: indol-3-octena kiselina (IAA); prekursori biosinteze: antranilat (ANT), triptofan (TRP), indol-3-acetamid (IAM), indol-3-piruvatna kiselina (IPyA), indol-3-acetonitril (IAN) i metaboliti: 2-oksoindol-3-octena kiselina (oxIAA), indol-3-acetil-L-aspartat (IAA-Asp), indol-3-acetil-1-glukozil ester (IAA-Glc), 2-oksoindol-3-acetil-1-glukozil ester (oxIAA-Glc). Rezultati su izraženi kao relativne jedinice u odnosu na odgovarajuće kontrole (vrijednost 1) za svaku mutantu i wt (n=4). Zvezdice prikazuju statistički značajnu razliku između tretmana i kontrole u Studentovom t-testu (t-test; *, **, i *** odgovaraju redom p-vrijednostima $0,05 > p > 0,01$; $0,01 > p > 0,001$; i $p < 0,001$). n.d. - nije detektirano.

4. RASPRAVA

Povišeni salinitet predstavlja jedan od vodećih problema u poljoprivrednoj proizvodnji te je glavni uzrok smanjenja prinosa različitih poljoprivrednih kultura uključujući i kupusnjače. Negativan učinak zasoljenih tala na uzgoj kupusnjača ponajviše se očituje u područjima s polusuhom ili suhom klimom poput Sredozemne gdje se različite vrste i varijeteti kupusnjača tradicionalno uzgajaju. Povišeni salinitet osim redukcije rasta i smanjenja prinosa negativno utječe i na kvalitetu uroda (Su i sur. 2013, Zhang i sur. 2014).

Svrha ovog istraživanja bila je detaljno okarakterizirati odgovor kineskog kupusa (*B. rapa*), u dva razvojna stadija: stadij klijanaca i stadij tri tjedna starih biljaka uslijed izloženosti kratkotrajnom solnom stresu (24 h) na fiziološkoj i biokemijskoj razini. Izbor vrste *B. rapa* kao glavnog objekta istraživanja bio je uvjetovan činjenicom da je to prva, komercijalno važna vrsta kupusnjača čiji je genom sekvencioniran (Wang i sur. 2011) te je stoga moguće pratiti i ekspresije gena od interesa (u ovom slučaju gena za auksin-amidohidrolaze kineskog kupusa *BralAR3*, *BralLL2* i *BralLR1*). Poseban naglasak istraživanja stavljen je na ulogu hormona auksina i hormona stresa apscizinske, salicilne i jasmonske kiseline u moduliranju odgovora klijanaca i biljaka kineskog kupusa na povišeni salinitet. Također, u svrhu razumijevanja uloge navedenih fitohomona praćen je i hormonski status biljaka bijelog kupusa (*B. oleracea* var. *capitata*) i raštike (*B. oleracea* var. *acephala*) uslijed solnog stresa. Navedene kupusnjače su odabrane za evaluaciju hormonskog odgovora pod pretpostavkom da pokazuju različitu toleranciju na povišeni salinitet u odnosu na kineski kupus. Nadalje, funkcionalna istraživanja provedena su koristeći mutante uročnjaka (*Arabidopsis thaliana*) s disfunkcionalnim homolozima gena za auksin-amidohidrolaze radi razumijevanja njihove uloge u održavanju auksinske homeostaze uslijed stresa.

Za postizanje solnog stresa korištena je sol NaCl u koncentracijama od 50, 100 i 200 mM. Zasoljenost tla mjeri se u jedinicama (dS/m) električne provodljivosti (EC) pri čemu 1 dS/m odgovara koncentraciji NaCl od 10 mM. Slana tla karakteriziraju se kao tla s električnom provodljivošću većom od 4 dS/m (40 mM soli), no stvarni salinitet tla na otvorenim obradivim površinama može doseći vrijednosti od oko 8-12 dS/m (Zhang i sur. 2014). Stoga koncentracije soli primijenjene u istraživanju odgovaraju salinitetu koji je moguć u okolišu.

4.1. TEST INHIBICIJE RASTA KORIJENA KLIJANACA KAO POKAZATELJ TOLERANCIJE KUPUSNJAČA NA SALINITET

Velika bioraznolikost roda *Brassica* doprinosi razlici u brojnim karakteristikama vrsta među kojima je i tolerancija na salinitet. S obzirom na podrijetlo i evolucijske odnose između šest glavnih vrsta: diploida *B. oleracea*, *B. nigra* i *B. rapa* i alotetraploida *B. juncea*, *B. napus* i *B. carinata* uočeno je kako alotetraploidi posjeduju višu stopu tolerancije na salinitet (Ashraf i McNeilly 2004). U svrhu utvrđivanja razlika u toleranciji na salinitet između pripadnika diploidnih genoma *B. rapa* i *B. oleracea* evaluiran je fiziološki odgovor vrste *B. rapa* (kineski kupus) te vrste *B. oleracea* (bijeli kupus i raštika) testom inhibicije rasta korijena klijanaca.

Inhibicija rasta korijena uslijed solnog tretmana jedan je od značajnih biomarkera osjetljivosti na solni stres (Zhang i sur. 2014). Test je proveden na krutim agarским podlogama uz dodatak NaCl (50-200 mM) uz trajanje tretmana od 24 h. Rezultati (Slika 30) inhibicije rasta korijena izdvojili su vrstu *B. rapa* kao osjetljiviju vrstu na solni stres u odnosu na predstavnike vrste *B. oleracea* (var. *capitata* i var. *acephala*). Također, varijeteti vrste *B. oleracea*: bijeli kupus (var. *capitata*) i raštika (var. *acephala*) u testu inhibicije rasta korijena pokazali su jednaku razinu tolerancije na salinitet. Literaturni podatci karakteriziraju pripadnike Pekinensis grupe kao umjereno tolerantne i svrstavaju ih u isti razred osjetljivosti s bijelim kupusom, cvjetačom i prokulicom, no osjetljivost ovisi prvenstveno o kultivaru (Shannon i Grieve 1999). Na temelju duljine korijena klijanca pri 200 mM NaCl *B. oleracea* i *B. rapa* grupirane su u istu kategoriju osjetljivosti na salinitet u odnosu na drugu pripadnike vrsta *Brassica* (Purty i sur. 2008). Prag osjetljivosti na salinitet za pripadnike Capitata grupe iznosi oko 1,8 dS/m (oko 180 mM soli) nakon čega njihova produktivnost opada porastom saliniteta. O pripadnicima Acephala grupe nema puno literaturnih podataka, no dostupni podatci karakteriziraju predstavnike grupe kao kupusnjače koje podnose zasoljavanje vodom električne provodljivosti od 2,3 do 5,5 dS/m (230-550 mM soli) (Shannon i Grieve 1999).

4.2. FIZIOLOŠKI I BIOKEMIJSKI POKAZATELJI SOLNOG STRESA KOD KINESKOG KUPUSA

Brassica rapa je u literaturi, kao što je prethodno navedeno, okarakterizirana kao vrsta umjereno osjetljiva na solni stres (Su i sur. 2013, Jan i sur. 2016). Odgovor biljke na solni stres, osim što ovisi o vrsti/varijetetu, uvelike ovisi i o razvojnem stadiju. Stoga, istraživanje cijelog životnog ciklusa biljke, ili najosjetljivijih razvojnih faza je važno radi utvrđivanja faktora tolerancije i usporedbe tolerancije različitih vrsta/varijeteta/kultivara (Zhang i sur. 2014). Iz tog razloga ispitan je utjecaj solnog stresa na dvije faze razvoja kineskog kupusa: I) ranu fazu razvoja tj. klijance stare jedan dan i II) fazu biljaka s potpuno razvijena četiri lista. Također, istraživanja su provedena nakon 24 sata tretmana radi praćenja inicijalnog, brzog odgovor biljaka na solni stres. Značajna inhibicija rasta primarnog korijena klijanca kao i redukcija prinosa biomase te kraći hipokotili vidljivi su pokazatelji toksičnosti soli ponajprije pri višim koncentracijama (Slika 16a i b). Fenotip klijanaca kineskog kupusa u skladu je s literaturnim podacima i pojačanom akumulacijom Na⁺ u klijancima *B. rapa* u odnosu na druge predstavnike roda *Brassica* uslijed solnog stresa (Purty i sur. 2008). Zbog veličine klijanaca i dostupne biomase, naročito uslijed viših koncentracija NaCl u analizama su korišteni kompletni klijanci. Biljke u "odrasloj fazi" uzgojene su i tretirane (50-200 mM NaCl) hidroponski. Ta razvojna faza kupusa odgovara presadnicama ("flancima") koje se nakon uzgoja u staklenicima ili zatvorenom prostoru presađuju na poljoprivredne površine i bivaju izložene okolišnim čimbenicima prilikom prilagodbe na novonastale uvjete. Kod biljaka kineskog kupusa uslijed kratkotrajne izloženosti salinitetu (24 h) nije zapažena redukcija rasta. Značajan fiziološki pokazatelj solnog stresa bio je gubitak turgora, posebice izražen u

starim listovima i pri najvišem salinitetu (200 mM) (Slika 25a). U ovoj fazi razvoja, biokemijske i molekularne analize bile su provedene u korijenu i listovima.

Pored osnovnih morfoloških, lako zamjetljivih promjena (inhibicija rasta korijena, smanjenje biomase, promjena turgora istova), bitan pokazatelj stresa je fotosintetska učinkovitost. Poznato je da učinkovitost fotosintetskog aparata uslijed stresa može biti smanjena pri čemu je najosjetljivija komponenta fotosustav II (PSII) (Misra i sur. 2001, Kalaji i sur. 2011). Pri najvišim koncentracijama soli fotosintetska aktivnost kotiledona klijanaca izražena kao maksimalni prinos kvanta fotosustava II (F_v/F_m) i indeks fotosintetske učinkovitosti PI_{ABS} reducirana je 3% i 35% (Slika 16c). Usporedno, povišeni salinitet imao je jači negativni učinak na fotosintetsku aktivnost listova odraslih biljaka gdje je vidljivo intenzivnije snižavanje oba parametra uslijed solnih tretmana (Slika 25b). Odnos F_v/F_m bitan je parametar fotosintetske učinkovitosti te u zdravim listovima njegova vrijednost iznosi oko 0,8 za većinu biljnih vrsta, a njegovo smanjenje ukazuje na oštećenja PSII uslijed stresa (Ashraf i Harris 2013). Solni stres manjim je intenzitetom utjecao na snižavanje F_v/F_m u odnosu na PI_{ABS} u kotiledonima i u listovima kineskog kupusa. Iz navedenog proizlazi kako kineski kupus uslijed kratkotrajne izloženosti solnom stresu ipak uspijeva održati fotosintetski aparat funkcionalnim. Slični rezultati zabilježeni su i kod riže (Dionisio-Sese i Tobita 2000), pšenice (Abdeshahian i sur. 2010) i rajčice (Moles i sur. 2016), a ovisi o duljini trajanja stresa kao i koncentraciji soli.

Druga važna komponenta adaptivnog odgovora biljaka na solni stres je održavanje ionske i osmotske homeostaze (Radić i sur. 2013). Solni tretmani rezultirali su porastom omjera Na^+/K^+ u klijanima te korijenu i listovima odraslih biljaka (Slika 17a, Slika 26a). Održavanje omjera K^+/Na^+ pokazalo se kao ključnim mehanizmom tolerancije na salinitet u različitim genotipovima roda *Brassica*. U tolerantnijim vrstama razina transkripcije gena za mehanizme homeostaze iona (SOS1 Na^+/K^+ antiporter i njegovi aktivatori SOS2 i SOS3 te NHX1 Na^+/H^+ vakuolni antiporter) bila je znatno viša u solnom stresu u odnosu na osjetljivije vrste. Posljedično tome, tolerantnije vrste su imale više omjere K^+/Na^+ u korijenu, stabljici i listovima (Chakraborty i sur. 2012). Također, duljina izloženosti solnom stresu uvelike utječe na sposobnost održavanja ionske homeostaze. Tolerantniji klijanci *Brassica* kao što je *Brassica juncea* bili su sposobni održati K^+/Na^+ omjer tijekom 24 sata izloženosti 200 mM NaCl u odnosu na osjetljivije genotipove *Brassica*, no produljenjem vremena tretmana K^+/Na^+ omjer opada i u tolerantnijim kupusnjačama (Kumar i sur. 2009). Zadržavanje iona soli u zoni korijena i stabljike štiti biljku od toksičnog učinka soli na listove. Transport iona Na^+ iz stanica korijena u listove obavlja se ksilemom biljaka prolaskom iona kroz neselektivne ionske kanale. Transporteri HKT1 vraćaju ione Na^+ u stanice korijena kako bi smanjili količinu iona soli u listovima gdje primarno ispoljavaju svoj toksični učinak (Deinlein i sur. 2014). U listovima i korijenu kineskog kupusa sadržaj iona Na^+ povećavao se s koncentracijom NaCl (Slika 26a). Mehanizmi transporta Na^+ , a izrazito pri najvišem salinitetu, nisu bili sposobni kontrolirati kretanje iona soli prema listovima kineskog kupusa, a nemogućnost održavanja homeostaze K^+/Na^+ ukazuje na toksičnost primijenjenih koncentracija soli koje bi duljim

izlaganjem kineskog kupusa solnom stresu rezultirali brojnim negativnim posljedicama na rast i razvoj biljke.

Paralelno uz kontrolu unosa soli pri solnom stresu biljke reguliraju sintezu osmolita u stanici kako bi spriječile gubitak turgora. Prolin je odavno okarakteriziran kao bitan osmolit i osmoprotektant u suši i solnom stresu. Porast prolina u solnom stresu zabilježen je u mnogim biljnim vrstama, a prvenstveno kod glikofita kao što su kupusnjače (Kumar i sur. 2009, Mittal i sur. 2012, Jan i sur. 2016), artičoka (Huang i sur. 2013) i druge vrste. U klijancima te listovima odraslih biljaka kineskog kupusa izmjeren je porast prolina paralelno s porastom saliniteta, no u korijenu akumulacija prolina ne prati izraženu akumulaciju Na^+ (Slika 26). Slični rezultati primijećeni su i kod rajčice gdje su ekspresija gena za enzime biosintetskog puta prolina, sadržaj prolina i količina Na^+ u listovima bili pozitivno korelirani i povišeni uslijed saliniteta, dok je takvo opažanje izostalo u korijenu (Almeida i sur. 2014). Novija istraživanja sugeriraju ulogu prolina i u održavanju redoks homeostaze, a njegova povećana sinteza štiti fotosintetski aparat listova i inducira aktivnost antioksidacijskih enzima uslijed solnog stresa (Puniran-Hartley i sur. 2014, Surender Reddy i sur. 2015). Budući da klijanci i listovi kineskog kupusa imaju funkcionalni fotosintetski aparat i pri visokim koncentracijama soli, uloga prolina kao protektanta fotosinteze može biti pretpostavljena.

Osim prolina jedan od bitnijih staničnih antioksidansa je glutation. Povećana akumulacija ROS izmjerena *in vivo* u korijenu i kotiledonima klijanaca (Slika 20) u skladu je sa zamijećenim negativnim utjecajem saliniteta na rast i fotosintezu pri čemu korijen klijanca trpi znatnu veću štetu i akumulira više ROS i GSH u odnosu na kotiledone. U kotiledonima pak, bazalna razina GSH bila je viša u odnosu na korijen, a porast uslijed stresa manjeg intenziteta. Listovi odraslih biljaka akumulirali su više GSH u odnosu na korijen. Porast GSH kao odgovor na povišeni salinitet izmjeren je i kod *Brassica napus* (Ruiz i Blumwald 2002) te riže (Chawla i sur. 2013). Možemo pretpostaviti da je učinak solnog stresa manje izražen na kotiledone klijanaca s obzirom na njihov bolji redoks status. U odraslih biljaka rezultati ukazuju na činjenicu da je održavanje redoks sustava u listovima uslijed stresa bilo koordinirano povećanom razinom GSH, a u korijenu povećanom razinom askorbata (Slika 27).

U održavanju redoks ravnoteže uslijed stresa sudjeluju i antioksidacijski enzimi (Tablica 6, Tablica 8). Indukcija enzimatskog odgovora uslijed solnog stresa zabilježena je i u drugim vrstama (Ghugre i sur. 2011, Mittal i sur. 2012, Farhangi-Abriz i Torabian 2017). Povećana aktivnost SOD rezultira eliminacijom generiranog superoksidnog radikala (Slika 20a) kako u klijancima tako i u odraslim biljkama. Aktivacija APX u klijancima (Tablica 6) kao i snižavanje količine askorbinske kiseline koju enzim koristi kao donor elektrona (Slika 21a) pokazuje da se upravo uklanjanje H_2O_2 (Slika 20b) u klijancima kineskog kupusa odvija preko APX budući da GPOX nije pokazala promjene osim pada pri najvišem salinitetu, a aktivnost CAT je bila snižena. Snižena aktivnost CAT bila je izmjerena i u korijenu i listovima odraslih biljaka, a aktivnost APX bila je aktivirana sporadično ili inhibirana pri određenom salinitetu. Pojačane aktivnost CAT i APX uslijed solnog stresa zabilježene su kao odgovor toleratnijih biljaka, dok

su u osjetljivijim enzimi bili inaktivirani ili posjedovali reducirane aktivnosti (Mittal i sur. 2012, Surender Reddy i sur. 2015). CAT i APX vjerojatno ne sudjeluju u uklanjanju H_2O_2 u odraslim biljkama kineskog kupusa bez obzira na dovoljnu količinu askorbinske kiseline potrebnu za aktivnost APX (Slika 27). Moguće je da se H_2O_2 , bar djelomično, u korijenu i listovima eliminira aktiviranom GPOX (Tablica 8). GPOX pripada skupini peroksidaza koje kao donore elektrona koriste fenolne spojeve.

Solni stres potaknuo je promjene u razini fenolnih kiselina kako u klijancima (Tablica 7) tako i u korijenu i listovima kineskog kupusa (Tablica 9, Tablica 10) koje mogu služiti kao donori elektrona za GPOX. Također, fenolne kiseline ujedno i samostalno djeluju kao antioksidansi. Od osam detektiranih fenolnih kiselina u svim uzorcima klijanaca, njih šest je bilo povišeno uslijed stresa, ponajprije pri najvišem salinitetu (Tablica 7) kada održavanje redoks sustava putem GSH slabi uslijed veće akumulacije GSSG (Slika 21a). U korijenu i listovima odraslih biljaka kineskog kupusa (Tablica 9, Tablica 10) povećanje razine slobodnih fenolnih kiselina bilo je manje izraženo u odnosu na klijance. Inducirane fenolne kiseline većinom pripadaju skupini hidroksicimetnih fenolnih kiselina, a posebno je izražena akumulacija ferulinske i sinapinske kiseline. Hidroksicimetne kiseline bolje neutraliziraju slobodne radikale od hidroksibenzojevih kiselina (Rice-Evans i sur. 1996) pri čemu su u testovima mjerenja antioksidacijskih aktivnosti ferulinska, sinapinska i *p*-kumarinska kiselina pokazale visoku učinkovitost napram ABTS radikala i peroksil radikala u odnosu na askorbinsku kiselinu i α -tokoferol (Koroleva i sur. 2014).

S obzirom na rezultate moguće je pretpostaviti kako akumulacija slobodnih fenolnih kiselina u kombinaciji s prethodno navedenim antioksidacijskim mehanizmima doprinosi održavanju redoks homeostaze u klijancima i biljkama kineskog kupusa u solnom stresu što se odražava na moguća oštećenja u vidu oksidacije lipidnih membrane i protein. U klijancima kao rezultat učinkovitosti održavanja redoks homeostaze opažena je snižena stopa peroksidacije lipida i oksidacije karbonila pri višim točkama saliniteta (Slika 22). Održavanje sadržaja MDA uz akumulaciju fenolnih spojeva zabilježen je kao odgovor vrste *Lonicera japonica* na solni stres (Yan i sur. 2017). Suprotno tome povišene vrijednosti MDA kako u korijenu tako i u listovima odraslih biljaka kineskog kupusa pri povećanom salinitetu upućuju da antioksidacijski mehanizmi u odraslim biljkama s manjom učinkovitošću uspijevaju neutralizirati povećanu količinu ROS u odnosu na klijance (Slika 28). Porast razine MDA kao rezultat solnog stresa izmjeren je u korijenu i listovima kukuruza (AbdElgawad i sur. 2016) i *A. thaliana* (Elluoz i sur. 2014). Nadalje, rezultati mjerenja razine MDA i karbonila upućuju na zaključak da su oksidaciji bile podložnije lipidne membrane od proteina.

Fenolne kiseline u biljkama mogu biti zastupljene i u vezanom obliku na stanične stijenke gdje međusobno povezuju netopljive makromolekule od kojih je stanična stijenka izgrađena (celuloza, hemiceluloza i pektin) i time doprinose njenoj čvrstoći. Vezane fenolne kiseline uključuju hidroksibenzojeve kiseline poput *p*-hidroksibenzojeve, vanilinske, siringinske, protokatehinske i elaginske i hidroksicimetne kiseline kao što su *p*-kumarinska, kava,

ferulinska, sinapinska i klorogenska kiselina. Procesom polimerizacije monolignola hidrokscimetnih kiselina kao što su *p*-kumarinska ili sinapinska kiselina nastaju lignini koji se vežu u stanične stijenke pružajući mehaničku čvrstoću i potporu tkivima (Shahidi i Yeo 2016). Remodeliranje stanične stijenke bitan je proces u rastu biljaka u stresnim uvjetima i pokazatelj tolerancije. Rast u prisutnosti abiotskog stresora uključuje dva konfliktna procesa koordinirana ROS: zadebljanje staničnih stijenki i opuštanje staničnih stijenki. Zadebljanje staničnih stijenki rezultat je aktivnosti peroksidaza i ROS, a do opuštanja dolazi uslijed aktivnosti ekspanzina, XTH (ksiloglukan endotransglukozilaza/hidrolaza) i ROS. Pri procesu zadebljanja ROS i peroksidaze iniciraju križno povezivanje glikoproteina i biljnih fenola esterificiranih s hemiceluloznim polimerima što uzrokuje neelastičnost staničnih stijenki i zastoje u rastu. Proces zahtijeva ravnotežu između ROS, aktivnosti peroksidaza i dostupnosti supstrata. Umrežavanje najvjerojatnije onemogućava ekspanzine i XTH u cijepanju ksiloglukanu i opuštanju staničnih stijenki. Ukoliko se generiranje ROS nastavi i svi supstrati za umrežavanje su potrošeni uslijed peroksidazne aktivnosti, slobodni radikali poput hidroksilnog mogu prouzročiti otpuštanje polimernih lanaca i na taj način osloboditi supstrate za ekspanzine i XTH. Na ovaj način tolerantnije vrste mogu nadići zastoje u rastu. Princip opuštanja staničnih stijenki koordiniran hidroksilnim radikalom, ekspanzinima i XTH karakterističan je i za rast u normalnim uvjetima (Tenhaken 2015). U ovom istraživanju primjenjenom analitičkom metodom detektirane su samo monomerne forme vezanih fenolnih kiselina. Smanjenje količine fenolnih kiselina vezanih na stanične stijenke u klijancima porastom koncentracije soli (Tablica 7), prvenstveno sinapinske kiseline koja je najzastupljenija fenolna kiselina staničnih stijenki, a i ostalih kvantificiranih fenolnih kiselina može upućivati na nastanak oligomernih formi uslijed pojačavanja staničnih stijenki što vodi do zastoja rasta i u korelaciji je s fenotipom klijanaca pri salinitetu (Slika 16a i b). Suprotno tome, porast većine kvantificiranih fenolnih kiselina vezanih na stanične stijenke korijena i listova kod odraslih biljaka kineskog kupusa (Tablica 9, Tablica 10) te oprečan trend između sinapinske i ferulinske kiseline, najzastupljenijih vezanih fenolnih kiselina listova, sugeriraju da dinamika remodeliranja staničnih stijenki ovisi o vegetativnom organu te razvojnom stadiju biljke. Pojačan intenzitet vezanja fenolnih spojeva u stanične stijenke zabilježen je kao adaptivni odgovor pšenice na sušu (Hura i sur. 2012, Hura i sur. 2013). Zasićenje staničnih stijenki fenolnim spojevima poput fenolnih kiselina i njihovim unakrsnim povezivanjem s drugim komponentama stijenki smanjuje elastičnost stijenki čime one postaju kompaktnije i time stanice gube manje vode. Iz navedenog moguće je zaključiti kako pri kratkotrajnoj izloženosti solnom stresu kineski kupus pojačava stanične stijenke vezanjem fenolnih kiselina nebi li one u konačnici doprinjele jačoj mehaničkoj zaštiti korijena i listova i time ublažile gubitak vode uzrokovan osmotskom komponentom povišenog saliniteta.

4.3. ULOGA HORMONA U ODGOVORU KUPUSNJAČA NA POVIŠENI SALINITET

Kontrola fizioloških procesa u biljci je direktno ili indirektno posredovana biljnim hormonima te je jedan od najvažnijih faktora prilagodbe i tolerancije na povišeni salinitet (Fahad i sur. 2015). Identifikacija i kvantifikacija fitohormona izvršena je UHPLC-MS/MS metodom u svrhu evaluacije uloge hormona stresa ABA, SA i JA te hormona rasta IAA u odgovoru kineskog kupusa, bijelog kupusa i raštike na povišeni salinitet. Hormonski status praćen je u cijelim klijancima i "odraslim" biljkama kineskog kupusa u svrhu uočavanja razlika u profilu hormona u ovisnosti o vegetativnom stadiju. U svrhu detekcije uloge hormona u kontroli odgovora kupusnjača koje pokazuju različitu toleranciju u odnosu na kineski kupus u istraživanje su bile uključene "odrasle" biljke bijelog kupusa i raštike, a hormonski profil određen je u korijenu i listovima biljaka uslijed stresa.

4.3.1. Uloga apscizinske, salicilne i jasmonske kiseline u moduliranju odgovora

Promjene u hormonima ABA, SA, JA i JA-Ile, izmjerene su u klijancima kineskog kupusa (Slika 23) te korijenu i listovima odraslih bljaka kineskog kupusa, bijelog kupusa i raštike uslijed solnog stresa (Slika 31, Slika 32, Slika 33). Porast koncentracije ABA zabilježen je pri višim točkama saliniteta u klijancima kineskog kupusa (Slika 23a) te u korijenu i listovima triju kupusnjača (Slika 31) u ovisnosti o koncentraciji soli. Porast razine ABA karakterističan je odgovor biljaka izloženih solnom stresu i suši na osmotsku komponentu stresa (Fahad i sur. 2015). ABA pri osmotskom stresu ima dvije uloge: brzi odgovor kroz kontrolu zatvaranja puči što omogućava održavanje vodenog statusa biljke te spori odgovor kroz regulaciju rasta uslijed aktivacije gena koji su pod kontrolom ABA (Verma i sur. 2016). Pad fotosintetske učinkovitosti kotiledona klijanaca i listova kineskog kupusa pri višim točkama saliniteta (Slika 16c i Slika 25b) u suglasnosti je s ulogom ABA u kontroli transpiracije biljaka i brzom odgovoru na solni stres. Radi zatvaranja puči dolazi do smanjene apsorpcije CO₂ što posljedično rezultira nižom stopom fotosinteze (Ashraf i Harris 2013). Također, porast razine ABA u klijancima i listovima kineskog kupusa uslijed povećanog saliniteta prati i akumulacija prolina (Slika 26b). Akumulacija prolina još jedan je adaptivni odgovor na osmotski stres koordiniran ABA koja regulira gene uključene u njegovu biosintezu (Kavi Kishor i Sreenivasulu 2014).

Uspoređujući odgovor triju različito tolerantnih kupusnjača na solni stres uočeno je da je koncentracija soli od 100 mM izazvala snažan porast ABA u listovima (26 ×) kod osjetljive vrste (*B. rapa*) što nije zabilježeno kod tolerantnijih vrsta. Nadalje, pri višim konc. soli (200 mM) kineski kupus ne uspijeva zadržati povećanu razinu ABA u listovima što posljedično vodi do značajnog gubitka turgora (Slika 25a), dok tolerantnije vrste imaju tu sposobnost. U listovima bijelog kupusa razina ABA se održala na razini nižeg saliniteta (100 mM), a u raštici je ABA dodatno akumulirana. Adaptivni odgovor biljaka reguliran aktivnošću hormona stresa dinamičan je proces na koji utječe velik broj faktora. U literaturi postoje brojni oprečni

podatci o promjenama razine hormona unutar osjetljivijih i tolerantnijih kultivara u solnom stresu. Nagli porast ABA kao odgovor na salinitet (200 mM) zabilježen je kod osjetljivijih genotipova rajčice nakon 5 h tretmana (Duan i sur. 2012). Solni stres potaknuo je akumulaciju ABA u osjetljivijem varijetetu bosiljka (Mancarella i sur. 2016) i ječma (Witzel i sur. 2014). Suprotno tome, u radu Kamboj i sur. (2015) zabilježen je porast ABA kao inicijalni odgovor (nakon 12 h) najtolerantnijih varijeteta ječma na povišeni salinitet, a znatno više vrijednosti ABA izmjerene su kod tolerantnijeg kultivara rajčice uslijed 7 dana solnog stresa (Gharbi i sur. 2017). Nadalje, pri ekstremnom stresu s 400 mM NaCl tolerantnije vrste poput halofita *C. maritima* i *T. salsuginea* akumuliraju ABA znatno učinkovitije u odnosu na glikofit *A. thaliana* unutar 4-72 h tretmana (Ellouzi i sur. 2014). Prema navodima Munns i Tester (2008), *A. thaliana* uspješno tolerira salinitet niži od 40 mM NaCl, dok viši saliniteti uzrokuju oštećenja i u konačnici smrt biljaka. Razlike u kontradiktornim podacima mogu se pripisati mnoštvu ekperimentalnih postava, odabranoj vrsti, varijetetu i njihovim morfološkim karakteristikama, duljini izloženosti i intenzitetu solnih tretmana te pragu osjetljivosti na salinitet. Kineski kupus, bijeli kupus i raštika su morfološki različite kupusnjače. Listovi kineskog kupusa po svojoj su građi i strukturi nježniji u odnosu na robusne i tvrde listove raštike i bijelog kupusa što doprinosi njihovoj jačoj osjetljivosti na gubitak vode. Prema literaturnim podacima najniži prag osjetljivosti raštike na salinitet iznosi minimalno 230 mM soli, a bijelog kupusa oko 180 mM (Shannon i Grieve 1999). Primijenjene koncentracije soli u ovom istraživanju vjerojatno još uvijek nisu dosegle prag osjetljivosti odraslih biljaka bijelog kupusa i raštike pa one i uslijed najvišeg saliniteta primijenjenog u ovim istraživanjima (200 mM) uspijevaju održati status ABA ili ga dodatno poboljšati radi adaptivnog odgovora na osmotski stres uzrokovan soli. Na osnovu komparacije kineskog kupusa, bijelog kupusa i raštike mogli bismo zaključiti da je jedan od mehanizama tolerancije vrste/varijeteta na solni stres mogućnost održavanja povećane razine ABA u listovima. Uloga ABA u korijenu također je vrlo važna. Prva istraživanja odgovora na sušu i salinitet posredovanog djelovanjem ABA sugerirala su biosintezu ABA u korijenu, na mjestu percepcije stresnog signala, te transport kroz ksilem biljke u nadzemne dijelove. Danas je poznato da osim transporta ABA iz korijena i listovi dopinose *de novo* biosintezi ABA (Jones 2016). Razina ABA u korijenu kupusnjača bila je povišena u odnosu na kontrole uslijed solnog stresa osim pri 200 mM tretmanu kineskog kupusa (Slika 31). To je u suglasnosti s rezultatima ABA u listovima kineskog kupusa kao osjetljivije vrste na solni stres u odnosu na tolerantnije varijetete *B. oleracea*. Podatci iz literature navode da akumulacija ABA u korijenu inhibira razvoj lateralnog korijena uslijed prisutnosti toksične koncentracije soli nebi li se unos iona soli sveo na minimum (Duan i sur. 2013). Također, ABA je uključena u SOS odgovor biljaka, tj. dokazana je njena uloga u regulaciji i smanjenju stope transporta iona Na^+ iz korijena u nadzemne dijelove biljke putem ksilema (Zhu i sur. 2016). Fluktuacije razine ABA u korijenu kineskog kupusa možemo dovesti u korelaciju s razinama Na^+ u listovima. U korijenu kineskog kupusa razina ABA raste kontinuirano do konc. NaCl od 100 mM što omogućuje održavanje iona Na^+ u listovima više manje konstantnim (Slika 26a). Pojačana akumulacija Na^+ iona u listovima pri 200 mM NaCl

može se objasniti djelomično kao rezultat smanjenja ABA u korijenu ispod vrijednosti u kontrolama čime biljka gubi mogućnost regulacije transporta Na⁺.

Uloga JA i SA u regulaciji biljnog odgovora na stres prvenstveno je istražena u okviru obrambenih mehanizama uslijed biotskog stresa, no oba hormona moduliraju odgovor i u uvjetima abiotskog stresa. Akumulacija JA zabilježena je kao odgovor na salinitet u nekoliko različitih vrsta (rajčica, iris i riža) što je u konačnici rezultiralo većom tolerancijom na solni stres (Wang i sur. 2001, Pedranzani i sur. 2003, Tani i sur. 2008). Kang i sur. (2005) su pokazali da tolerantniji kultivari riže imaju znatno više endogene razine JA i u optimalnim uvjetima kada čimbenici solnog stresa nisu prisutni. Akumulacija JA i njene aktivne forme JA-Ile zabilježena je kao odgovor na salinitet pri najnižoj koncentraciji soli (50 mM) u klijancima kineskog kupusa (Slika 23c) i u korijenu bijelog kupusa (Slika 32). Više koncentracije soli uzrokovale su značajan pad JA i JA-Ile u klijancima te korijenu svih triju *Brassica*, te listovima bijelog kupusa i raštike. Za razliku od rezultata koji sugeriraju akumulaciju JA u svrhu tolerancije na salinitet, mutante *Arabidopsis*a s inaktivnom biosintezom JA pokazuju povišenu toleranciju na solni stres koja se očituje kao dulje korijenje, manje nekrotičnih listova, manje Na⁺ iona u izdanku, veće koncentracije klorofila i 50% manje MDA u odnosu na wt uslijed solnog stresa (Hazman i sur. 2015). Također, mutante riže s pojačanom ekspresijom gena za enzim koji inaktivira JA-Ile bile su tolerantnije na solni stres i imale odgođenu senescenciju listova uzrokovanu salinitetom, no ne i fiziološkim starenjem (Kurotani i sur. 2015). Stoga, značajno niže količine JA i JA-Ile u listovima bijelog kupusa i raštike u odnosu na nepromijenjenu količinu JA-Ile u listovima kineskog kupusa potencijalno mogu doprinjeti odgodi senescencije u tolerantnijim kultivarima uslijed solnog stresa budući da u procesu senescencije glavnu ulogu ima JA (Santino i sur. 2013). Nedavno istraživanje otkrilo je funkciju signalnog puta jasmonata u rastu korijena *A. thaliana* u solnom stresu (Valenzuela i sur. 2016). Rast primarnog korijena uočnjaka posredovan je JA ovisnim i JA neovisnim putem. Autori su pokazali da je u uvjetima solnog stresa (3 sata nakon aplikacije stresora) izmjerena pojačana akumulacija JAZ proteina, represora JA signalnog puta. Transkripcija JAZ gena također je JA ovisna. Nakon inicijalnog JA-Ile signala i pojačane ekspresije JAZ represora dolazi do povratne inhibicije JA signalnog puta i posljedično zakočenja elongacije stanica primarnog korijena u JA ovisnom rastu. Nadalje, brži oporavak i viša stopa rasta tijekom kasnijih stadija u uvjetima solnog stresa bili su izraženiji u mutantima sa suprimiranim JA signalnim putem (Geng i sur. 2013). Stanje represije JA signalnog puta održava se niskom razinom JA-Ile koji je potreban za ponovnu aktivaciju JA signalnog puta (Wasternack i Strnad 2016). Snižene razine JA i JA-Ile u korijenu kineskog kupusa, bijelog kupusa i raštike nakon 24 h stresa ukazuju kako je moguće da sve tri kupusnjače reguliraju rast korijena djelomično preko JA ovisnog puta. Također, razina JA-Ile pri 50 mM NaCl koja je u korijenu bijelog kupusa i raštike bila puno bliža kontrolnim vrijednostima u odnosu na kineski kupus ukazuje na manju stopu inhibicije rasta korijena tolerantnijih kupusnjača u slučaju JA-ovisnog rasta što je i u korelaciji sa testovima inhibicije rasta korijena klijanaca (Slika 30).

Uloga SA u kontroliranju fizioloških procesa biljaka izloženih solnom stresu potvrđena je u nizu eksperimenata gdje su tretmani SA reducirali negativan učinak soli. Tretmani s niskim koncentracijama SA pokazali su pozitivan utjecaj na klijanje sjemena, fotosintetsku aktivnost, fiksiranje ugljika, transpiraciju, zatvaranje puči i antioksidacijsku aktivnost u mnogim biljnim vrstama uslijed solnog stresa (Jayakannan i sur. 2015). Nadalje, tretmani SA inducirali su pojačanu akumulaciju prolina i ABA, a ujedno su održali razinu IAA i citokinina u korijenu pšenice promovirajući rast pri povišenom salinitetu (Hayat i sur. 2010). Povećana akumulacija SA u listovima kupusnjača zajedno s akumulacijom ABA i prolina (Slika 31, Slika 26b) u suglasnosti je sa zabilježenim učinkom tretmana SA biljaka izloženih solnom stresu kao i pozitivnom ulogom SA na održavanje funkcionalnog fotosintetskog aparata listova kineskog kupusa (F_v/F_m vrijednosti oko 0,8 i uslijed stresa) (Slika 25b). No solni tretmani, prvenstveno s višim koncentracijama soli, snizili su razinu SA u korijenu kupusnjača i klijancima kineskog kupusa. Snižavanje razine SA zabilježeno je i kao odgovor irisa na solni stres (Wang i sur. 2001). Iako tretmani biljaka sa SA ističu njenu protektivnu ulogu uslijed stresa, endogena uloga u moduliranju odgovora na povišeni salinitet često je kontradiktorna. Pregledni rad Jayakannan i sur. (2015) donosi rezultate kontradiktornih funkcionalnih istraživanja koji nisu pokazali jasnu vezu između prisutnosti SA i tolerancije na salinitet. Mutante uročnjaka deficijentne u SA posjedovale su toleranciju na salinitet u odnosu na wt i mutante s povećanom biosintezom SA. Suprotno tome, tolerancija na salinitet i bolja stopa rasta zabilježena je kod mutanti s povećanom biosintezom SA u istraživanjima drugih autora. Dostupni literaturni podatci zasada ne mogu objasniti nastale razlike u količini SA u klijancima i korijenu *Brassica* uslijed stresa. Budući da obrambeni odgovor biljke i održiv rast u uvjetima stresa prvenstveno ovisi o kompleksnoj međusobnoj komunikaciji (pozitivnoj ili negativnoj) između hormona prije nego o samostalnom doprinosu pojedinog hormona (Verma i sur. 2016), zabilježene promjene mogle bi se objasniti kao rezultat složenih hormonskih mehanizama regulacije u uvjetima povišenog saliniteta.

4.3.2. Auksinski metabolom uslijed solnog stresa

Hormoni stresa ne mogu samostalno regulirati fiziološke procese u biljci u svrhu adaptivnog odgovora na stress, već je za to potrebna i koordinacija s hormonima rasta, ponajprije auksinima. Istraživanja na nekoliko različitih vrsta pokazala su kako je upravo auksinska homeostaza direktna poveznica s regulacijom i prilagodbom biljke na stres (Ludwig-Müller i sur. 2011, Liu i sur. 2014, Salopek-Sondi i sur. 2015). U odgovoru na solni stres IAA je važan endogeni čimbenik koji kontrolira prvenstveno promjene u arhitekturi korijena s ciljem prilagodbe i preživljavanja biljaka. Wang i sur. (2009) pokazali su da je blagi solni stres uzrokovao porast razine IAA u *A. thaliana* što je rezultiralo inhibicijom elongacije glavnog korijena i povećanim brojem lateralnih korijena, no više koncentracije soli u potpunosti su inhibirale rast korijena. Porast koncentracije IAA pri povišenom salinitetu zabilježen je u klijancima kineskog kupusa (Slika 24) što je u korelaciji sa inhibicijom rasta korijena,

prvenstveno pri 200 mM NaCl. Također, u korijenu kupusnjača i listovima kineskog i bijelog kupusa (Slika 34, Slika 35) izmjerene su povećane vrijednosti IAA uslijed stresa. Supresija IAA signalnog puta jedan je od pretpostavljenih mehanizama tolerancije na stres. Solni stres i suša uzrokuju represije TIR1 i AFB2 receptora koji se aktiviraju vezanjem IAA, a mutante u receptorima pokazuju znatno višu toleranciju na salinitet u odnosu na divlji tip kao i bolji oksidativni status (Iglesias i sur. 2010, Chen i sur. 2012). Moguće je primijetiti kako su promjene u količini IAA bile najizraženije ponajprije u listovima kineskog kupusa, najosjetljivije kupusnjače. U regulaciji količine auksina vrlo je važan i redoks status biljke. Povišena razina H₂O₂ u mutantama s inaktivnom katalazom značajno je reducirala količinu IAA uslijed suprimirane transkripcije gena za biosintezu IAA i rezultirala karakterističnim fenotipom biljke. Suprotno tome, aplikacija GSH vratila je normalni fenotip mutanti i povisila razinu auksina, no nije utjecala na promjene u količini H₂O₂ i GSH/GSSG omjeru (Gao i sur. 2014). Budući da i u kineskom kupusu uslijed povišenog saliniteta nije došlo do izražene promjene GSH/GSSG omjera (Slika 27), endogeno akumulirani GSH također je mogao doprinijeti akumulaciji IAA.

Promjene u razini IAA konzistentne su s promjenama u biosintetskom putu i u kataboličkom dijelu IAA metabolizma. U višim biljkama postoje četiri Trp ovisna puta biosinteze IAA: put indol-3-piruvatne kiseline (IPyA), put indole-3-acetamida (IAM), put triptamina (TRA) i put indol-3-acetaldoksima (IAOx) (Ljung 2013). Prekursori IAOx i TRA nisu bili detektirani u analizama klijanaca i odraslih kupusnjača. Put IPyA glavni je biosintetski put u porodici Brassicaceae (Zhao 2012). Analiza auksinskog metaboloma potvrdila je činjenicu da je IPyA put značajan izvor IAA u kontrolnim klijancima i klijancima izloženim stresu (Slika 24). Porast saliniteta reducirao je razinu Trp kao ranog prekursora svih Trp-ovisnih biosintetskih puteva, te IPyA pri najvišem salinitetu. Suprotno smanjenju IPyA prekursora, zabilježen je porast u IAM i IAN prekursorima IAA kao i IAA. Promjene u prekursorima biosinteze zabilježene su i u odraslim biljkama pri čemu su razine TRP, IPyA, IAN i IAM bile povišene u korijenu i listovima uslijed saliniteta (Slika 34, Slika 35). U listovima kineskog kupusa razine sva tri prekursora biosinteze u pozitivnoj su korelaciji s porastom IAA. Prekursor IAM identificiran je u mnogim biljnim vrstama, uključujući i *Arabidopsis* no još uvijek ne postoje literaturni podatci o njegovoj ulozi u odgovoru biljaka na solni stres (Novák i sur. 2012, Ljung 2013). IAN, intermedijer biosintetskog puta IAOx, koji je u uročnjaku pronađen u visokim količinama (Novák i sur. 2012), može biti i dio metaboličkih puteva niza indolnih spojeva poput kamaleksina i drugih fitoaleksina, indol-3-karbaldhid, indol-3-karboksilne kiseline i indolnih glukozinolata (Böttcher i sur. 2014). Pojačana akumulacija Trp i indol-3-karboksilne kiseline zabilježena je kao odgovor na solni stress u korijenu halofita *Salicornia herbacea* (Lee i sur. 2016). Također, akumulacija glukozinolata, posebice indolnih, zabilježena je kao odgovor na salinitet u Pak Choi kupusu (Hu i Zhu 2010). Nadalje, IAN može nastati ujedno i kao produkt razgradnje glukozinolata enzimatskom aktivnošću mirozinaza nakon oslobađanja enzima uslijed ozljede tkiva. Poveznica između aktivnosti mirozinaza i količine glukozinolata nije potvrđena u povišenom salinitetu (Pang i sur. 2012). Na osnovu rezultata nameće se zaključak da je porast IAN, prvenstveno kod kineskog kupusa još jedan od načina odgovora

na povišeni salinitet koji može, osim sudjelovanja u biosintezi IAA rezultirati i biosintezom drugih indolnih spojeva. Porast količine katabolita IAA-Asp te oksidirane forme IAA (oxIAA) u suglasnosti je s povišenom razinom IAA i zabilježen je jednoznačno u klijancima i odraslim biljkama kineskog kupus dok je u tolerantnijim varijetetima *B. oleracea* taj porast kataboličkih formi IAA sporadičan i ne tako očit. Konverziju IAA u oxIAA katalizira nedavno otkrivena IAA deoksigenaza no njena regulacija u uvjetima stresa je za sada nepoznata. IAA deoksigenaze kao i GH3.5 sintetaze koje kataliziraju sintezu konjugata IAA s aminokiselinama sinergistički održavaju optimalnu razinu IAA tijekom rasta i razvoja (Porco i sur. 2016). Iako se ireverzibilni konjugati IAA s aminokiselinama Asp i Glu smatraju katabolitima auksina, Ostrowski i sur. (2016) su tretmanima klijanaca graška s IAA-Asp pokazali da i oni doprinose odgovoru na salinitet i teške metale te ukazuju na njihovu dodatnu ulogu u abiotskom stresu. Uslijed solnog stresa izmjeren je pad esterskih IAA konjugata sa šećerima (IAA-Glc i oxIAA-Glc) u klijancima kineskog te porast oxIAA-Glc u listovima kineskog kupusa. Mutante *A. thaliana* s povećanom ekspresijom enzima UGT74E2 koji katalizira formiranje esterskih konjugata IAA sa šećerima bile su sposobne preživjeti duge periode suše i solnog stresa što upućuje na važnu ulogu estera auksina poput IAA-Glc kao potencijalne skladišne forme koja se po potrebi može hidrolizirati i doprinosti potrebnoj razini slobodne IAA (Tognetti i sur. 2010, Korasick i sur. 2013). Regulacija auksinskog metaboloma uslijed solnog stresa važan je segment adaptivnog odgovora biljaka na salinitet jer odstupanje od fizioloških koncentracija IAA ima znatan inhibitorni učinak na rast biljaka.

4.4. ULOGA AUKSIN-AMIDOHIDROLAZA U SOLNOM STRESU

Održavanje auksinske homeostaze bitan je preduvjet uspješne prilagodbe biljaka na stresne uvjete. Jedan od načina održavanja auksinske homeostaze je reverzibilna konjugacija IAA. Mehanizam reverzibilne konjugacije čine dva suprotna procesa: I) nastanak konjugata IAA s aminokiselinama, šećerima i peptidima i II) hidroliza reverzibilnih konjugata i oslobađanje aktivnog oblika IAA kada se za to pojavi potreba. Enzimi koji kataliziraju reakcije hidrolize reverzibilnih konjugata IAA s aminokiselinama nazivaju se auksin-amidohidrolaze (Salopek-Sondi i sur. 2017). Razumijevanju auksinske homeostaze uslijed stresa s naglaskom na procese reverzibilne konjugacije pristupljeno je na dva načina: I) praćenjem ekspresije gena za auksin-amidohidrolaze u korijenu i listovima kineskog kupusa te II) funkcionalnim istraživanjima mutanti uročnjaka s inaktivnim auksin-amidohidrolazama koja su uključivala testove rasta korijena klijanaca, analizu hormona stresa i auksinskog metaboloma.

Ekspresija gena za tri auksin-amidohidrolaze kineskog kupusa (IAR3, ILL2 i ILR1) praćena je u hidroponski uzgojenim biljkama nakon 6h od aplikacije solnih tretmana. Rezultati analize ekspresije gena pokazali su značajnu indukciju dvije auksin-amidohidrolaze IAR3 i ILR1 (5 ×) uslijed solnog stresa prvenstveno pri 200 mM soli u korijenu (Slika 29). Ekspresija gena *IAR3* bila je inducirana i pri 100 mM u korijenu te u listovima pri 50 mM (2 × u oba organa). Također, solni stres inducirao je u listovima povećanje razine transkripta za ILR1 (2 × i 5 ×) pri

100 i 200 mM soli dok su promjene u razini ekspresije gena za *ILL2* izostale u oba organa. Povećana razina transkripcije auksin-amidohidrolaza u korelaciji je s analizom auksinskog metaboloma i porastom razine IAA budući da navedeni enzimi doprinose koncentraciji slobodnog oblika IAA. Uloga auksin-amidohidrolaza zabilježena je u odgovoru na salinitet i osmotski stres i u drugim vrstama. Mutanti uročnjaka transformirani genom za auksin-amidohidrolazu *ILL3* iz topole bili su tolerantniji na solni stres u odnosu na netransformirane biljke (Junghans i sur. 2006). Nadalje, Kinoshita i sur. (2012) su utvrdili da uslijed izloženosti uročnjaka osmotskom stresu dolazi do akumulacije transkripata auksin-amidohidrolaze *IAR3* što doprinosi promjenama u arhitekturi korijena. Osim hidrolize auksinskih konjugata, *IAR3* iz pšenice sposobna je hidrolizirati IAA-Glc no niskim afinitetom (Campanella i sur. 2004). Ekspresija *IAR3* amidohidrolaze kineskog kupusa snažno je inducirana uslijed tretmana JA (Salopek-Sondi i sur. 2013). Također, JA inducira transkripciju i *IAR3* iz *A. thaliana* za koju je dokazano da uz IAA konjugate hidrolizira i JA-Ile što je čini posrednikom između indukcije IAA signalnog puta i represije JA signalnog puta (Widemann i sur. 2013, Zhang i sur. 2016). Budući da su hormonske analize pokazale značajan pad razine JA-Ile paralelno s porastom IAA u korijenu i listovima kineskog kupusa moguće je zaključiti kako je *IAR3* uključena u regulaciju signalnih puteva ova dva hormona i moduliranju odgovora kineskog kupusa na povišeni salinitet.

Radi boljeg razumijevanja uloge tih enzima u moduliranju odgovora biljaka na stres provedena su funkcionalna istraživanja koristeći mutante *A. thaliana* s disfunkcionalnim genima za amidohidrolaze (jednostruka mutanta *iar3*, dvostruka *iar3, ill2* i trostruka *iar3, ill2, ilr1*). Testovi rasta korijena divljeg tipa i mutanti *A. thaliana* s disfunkcionalnim amidohidrolazama provedeni su na MS agarским pločama s dodatkom NaCl (50 i 100 mM) u trajanju od tri dana nakon transfera 5 dana starih klijanaca na solne tretmane (Slika 36). Fotografije uročnjaka su slikane nakon 11 dana radi praćenja fenotipskih karakteristika (Slika 37). Zbog velike varijabilnosti u duljini korijena wt i mutanti, test rasta korijena klijanaca nije rezultirao značajnim promjenama u duljini korijena iako je inhibicija rasta korijena porastom saliniteta bila vidljiva. Također, fenotip klijanaca nakon 11 dana solnog tretmana s 100 mM NaCl pokazuje značajnu redukciju u veličini izdanka, broju listova, duljini primarnog korijena i broju lateralnih korijena wt i mutanti. Posebna redukcija u broju lateralnog korijenja uslijed solnog stresa uočena je u trostrukoj mutanti s obzirom na wt, jednostruku i dvostruku mutantu. Uročnjak *A. thaliana* posjeduje sedam gena za auksin-amidohidrolaze (Rampey i sur. 2004). Mutacije u genima za auksin-amidohidrolaze uzrokuju promjene karakteristične za niske koncentracije IAA. Za trostruku mutantu *ilr1, iar3, ill2* je poznato kako ima kraći hipokotil kada raste na svjetlu, manji broj lateralnog korijenja, manje je osjetljiva na inhibiciju rasta uslijed tretmana s aminokiselinskim konjugatima IAA te ima reducirane količine IAA (Rampey i sur. 2004), a uslijed solnog stresa te su karakteristike još izraženije. Također, jednostruka *iar3* i dvostruka mutanta *iar3, ill2* pokazuju slične karakteristike reduciranog rasta (Davies 1999). U svrhu određivanja profila auksina, wt i mutante uročnjaka uzgojeni su u tekućoj MS podlozi te tretirani sa 100 mM NaCl u trajanju 3 dana (Slika 38). Uzgoj *A. thaliana* u tekućoj MS podlozi rezultira velikim prinosima biomase i predložen je od

autora Lewandowska i sur. (2013) kao zadovoljavajući način uzgoja za praćenje odgovora na solni stres i proteomskog profila.

Analize hormona stresa (Tablica 11) i auksinskog metaboloma (Slika 39) nisu rezultirale očekivanim promjenama u hormonskom odgovoru divljeg tipa uročnjaka i korištenih mutanti na solni stres. Sporadično je izmjeren porast u količini salicilne i jasmonske kiseline uslijed stresa kao i porast IAA u svim istraženim mutantama kao odgovor na stres. Količina IAA najizraženije je bila akumulirana u jednostrukoj mutanti *iar3*, što je u suglasnosti s karakteristikama mutanti kod kojih porast mutacija u auksin-amidohidrolazama rezultira s pojačanom stopom konjugacije, a reduciranom stopom hidrolize konjugata radi nedostatka funkcionalnih enzima (Rampey i sur. 2004). Izostanak razlika u razini ABA, koja se pokazala kao najočigledniji marker stresa u analizama triju kupusnjača i klijanaca kineskog kupusa, sugerira kako primijenjeni način uzgoja u tekućem mediju nije zadovoljavajući za praćenje profila hormona u povišenom salinitetu. Iz Slike 38 vidljivo je kako su klijaneci uročnjaka uronjeni u tekući medij te iako je aeracija podloge bila osigurana konstantnom trešnjom, biljke su vrlo vjerojatno bile pod stresom uslijed nefizioloških uvjeta rasta. Eksperimenti s mutantama *A. thaliana* biti će ponovljeni u budućnosti s adekvatnijim načinom uzgoja.

5. ZAKLJUČCI

Zaključci:

- Kratkotrajni solni stres (24 h) imao je negativan učinak na rast korijena kao i biomasu klijanaca kupusnjača ovisno o koncentraciji apliciranog NaCl (50-200 mM). Na osnovu komparativnog testa inhibicije rasta klijanaca varijeteti vrste *B. oleracea* (bijeli kupus i raštika) bili su tolerantniji u odnosu na vrstu *B. rapa* (kineski kupus).
- Porast intenziteta saliniteta uzrokovao je smanjenje fotosintetske učinkovitosti kotiledona klijanaca i listova kineskog kupusa, no unatoč tome u obje faze rasta fotosintetski aparat ostao je funkcionalan.
- Klijanci i odrasle biljke kineskog kupusa pojačano su akumulirale ione Na⁺ uz nemogućnost održavanja fiziološkog K⁺/Na⁺ omjera u solnom stresu.
- Solni stres rezultirao je povećanom proizvodnjom ROS u tretiranim biljkama, te povećanom aktivnošću nekih antioksidacijskih enzima, kao i povećanom količinom glutationa, prolina, askorbinske kiseline i fenolnih kiselina.
- Više koncentracije soli dovele su do oksidativnih oštećenja lipidnih struktura u tkivu odraslih biljaka kineskog kupusa.
- Promjene u profilu vezanih fenolnih kiselina na stanične stijenke upućuju na promjene u remodeliranju staničnih stijenki klijanaca i biljaka kineskog kupusa u svrhu adaptivnog odgovora na povišeni salinitet.
- Solni stres inducirao je promjene u količini hormona stresa: promjene u razini ABA i jasmonata (povećana razina ABA i snižena razina JA i JA-Ile) ovisile su o stupanju saliniteta, dok su promjene u razini SA ovisile o biljnom tkivu.
- Solni stres utjecao je na profil IAA metaboloma: akumulacija IAA u korijenu i listovima kupusnjača bila je praćena uključivanjem alternativnih puteva biosinteze kao i povećanom stopom katabolizma.
- Profil fitohormona korelira sa stupnjem tolerancije vrste na solni stres: značajnije promjene u profilu hormona stresa i auksina uočene su u osjetljivije vrste (*B. rapa*) u odnosu na tolerantnije vrste (*B. oleracea* var. *capitata* i *B. oleracea* var. *acephala*).
- Mehanizmi auksinske homeostaze posredovani auksin-amidohidrolazama sudjeluju u odgovoru na povišeni salinitet: transkripcija gena za auksin-amidohidrolaze kineskog kupusa ILR1 i IAR3 bila je inducirana uslijed solnog stresa, dok se razina transkripta za auksin-amidohidrolazu ILL2 nije mijenjala uslijed prisutnosti stresora.
- Funkcionalna istraživanja na mutantama uročnjaka (*A. thaliana*) s disfunkcionalnim genima u auksin-amidohidrolazama IAR3, ILR1 i ILL2 upućuju na ulogu tih gena u regulaciji rasta i arhitekture korijena u stresu.

6. LITERATURA

- AbdElgawad H, Zinta G, Hegab MM, Pandey R, Asard H, Abuelsoud W. 2016. High salinity induces different oxidative stress and antioxidant responses in maize seedlings organs. *Front Plant Sci* 7: 276. doi: 10.3389/fpls.2016.00276
- Abdeshahian M, Nabipour M, Meskarbashee M. 2010. Chlorophyll fluorescence as criterion for the diagnosis salt stress in wheat (*Triticum aestivum*) plants. *Int J Chem Biol Eng*: 569–571.
- Acosta-Motos J, Ortuño M, Bernal-Vicente A, Diaz-Vivancos P, Sanchez-Blanco M, Hernandez J. 2017. Plant Responses to Salt Stress: Adaptive Mechanisms. *Agronomy* 7: 18. doi: 10.3390/agronomy7010018
- Aebi H. 1984. Catalase *in vitro*. *Methods in Enzymology* 105: 121–126.
- Almeida P, Feron R, de Boer GJ, de Boer AH. 2014. Role of Na⁺, K⁺, Cl⁻, proline and sucrose concentrations in determining salinity tolerance and their correlation with the expression of multiple genes in tomato. *AoB PLANTS* 6: 1–13.
- Al-Shehbaz IA. 2011. Brassicaceae (Mustard Family). U: *Encyclopedia of Life Sciences (ELS)*, Wiley, Chichester. doi: 10.1002/9780470015902.a0003690.pub2
- Al-Shehbaz IA, Beilstein MA, Kellogg EA. 2006. Systematics and phylogeny of the Brassicaceae (Cruciferae): an overview. *Plant Syst and Evol* 259: 89–120.
- Ashraf M, Harris PJC. 2013. Photosynthesis under stressful environments: An overview. *Photosynthetica* 51: 163–190.
- Ashraf M, McNeilly T. 2004. Salinity Tolerance in Brassica Oilseeds. *CRC Crit Rev Plant Sci* 23: 157–174.
- Balkaya A, Yanmaz R, Apaydin A, Kar H. 2005. Morphological characterization of white head cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata* subvar. *alba*) genotypes in Turkey. *New Zeal J Crop Hort* 33: 333–341.
- Bateljka K, Goreta Ban S, Žanić K, Miloš B, Dumičić G, Matotan Z. 2009. Svojstva autohtonih populacija raštike (*Brassica oleracea* L. var. *acephala*) hrvatskog priobalja. *Poljoprivreda* 15: 8-14.
- Bates LS, Waldren RP, Teare D. 1973. Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant Soil* 39: 205–207.
- Böttcher C, Chapman A, Fellermeier F, Choudhary M, Scheel D, Glawischnig E. 2014. The Biosynthetic Pathway of Indole-3-Carbaldehyde and Indole-3-Carboxylic Acid Derivatives in Arabidopsis. *Plant Physiol* 65: 841–853.
- Bradford MM. 1976. Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248–254.
- Campanella JJ, Olajide AF, Magnus V, Ludwig-Müller J. 2004. A novel conjugate hydrolase from wheat with substrate specificity for longer side-chain auxin amide conjugates. *Plant Physiol* 135: 2230–2240.
- Campanella JJ, Smith SM, Leib D, Wexler S, Ludwig-Müller J. 2008. The auxin conjugate hydrolase family of *Medicago truncatula* and their expression during the interaction with two symbionts. *J Plant Growth Regul* 27: 26–38.
- Chakraborty K, Sairam RK, Bhattacharya RC. 2012. Differential expression of salt overly sensitive pathway genes determines salinity stress tolerance in Brassica genotypes. *Plant Physiol Biochem* 51: 90–101.
- Chance B, Maehly C. 1955. Assay of catalase and peroxidases. *Methods in Enzymology* 11: 764–775.

- Chawla S, Jain S, Jain V. 2013. Salinity induced oxidative stress and antioxidant system in salt-tolerant and salt-sensitive cultivars of rice (*Oryza sativa* L.). *J Plant Biochem Biotechnol* 22: 27–34.
- Chen H, Li Z, Xiong L. 2012. A plant microRNA regulates the adaptation of roots to drought stress. *FEBS Lett* 586: 1742–1747.
- Cheyrier V, Comte G, Davies KM, Lattanzio V, Martens S. 2013. Plant phenolics: Recent advances on their biosynthesis, genetics, and ecophysiology. *Plant Physiol Biochem* 72: 1–20.
- Choudhury FK, Rivero RM, Blumwald E, Mittler R. 2016. Reactive oxygen species, abiotic stress and stress combination. *Plant J*: doi.org/10.1111/tpj.13299
- Choudhury S, Panda P, Sahoo L, Panda SK. 2013. Reactive oxygen species signaling in plants under abiotic stress. *Plant Signal Behav* 8: e23681. doi.org/10.4161/psb.23681
- Davies RT. 1999. IAR3 Encodes an Auxin Conjugate Hydrolase from Arabidopsis. *Plant Cell* 11: 365–376.
- Deinlein U, Stephan AB, Horie T, Luo W, Xu G, Schroeder JI. 2014. Plant salt-tolerance mechanisms. *Trend Plant Sci* 19: 371–379.
- Diacono M, Montemurro F. 2015. Effectiveness of Organic Wastes as Fertilizers and Amendments in Salt-Affected Soils. *Agriculture* 5: 221–230.
- Dionisio-Sese ML, Tobita S. 2000. Effects of salinity on sodium content and photosynthetic responses of rice seedlings differing in salt tolerance. *J Plant Physiol* 157: 54–58.
- Duan H, Zhu Y, Qi D, Li W, Hua X, Liu, Y, Deng X. 2012. Comparative Study on the Expression of Genes Involved in Carotenoid and ABA Biosynthetic Pathway in Response to Salt Stress in Tomato. *J Integr Agr* 11: 1093–1102.
- Duan L, Dietrich D, Ng CH, Chan PMY, Bhalerao R, Bennett MJ, Dinneny JR. 2013. Endodermal ABA signaling promotes lateral root quiescence during salt stress in *Arabidopsis* seedlings. *Plant Cell* 25: 324–41.
- Ellouzi H, Hamed K Ben Hernández I, Cela J, Müller M, Magné C, Abdelly C, Munné-Bosch S. 2014. A comparative study of the early osmotic, ionic, redox and hormonal signaling response in leaves and roots of two halophytes and a glycophyte to salinity. *Planta* 240: 1299–1317.
- Fahad S, Hussain S, Matloob A, Khan FA, Khaliq A, Suad S, Hassan S, Shan D, Khan F, Ullah N, Faiq M, Khan MR, Tareen AK, Khan A, Ullah A, Ullah N, Huang J. 2015. Phytohormones and plant responses to salinity stress: a review. *Plant Growth Regul* 75: 391–404.
- FAO 2014. Crops. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>. Pristupljeno 03. travnja 2017.
- FAO 2017. FAO Soils Portal. <http://www.fao.org/soils-portal/soil-survey/soil-properties/en/> Pristupljeno 03. travnja 2017.
- Farhangi-Abriz S, Torabian S. 2017. Antioxidant enzyme and osmotic adjustment changes in bean seedlings as affected by biochar under salt stress. *Ecotoxicol Environ Saf* 137: 64–70.
- Finkelstein, R. 2013. Abscisic Acid synthesis and response. *The Arabidopsis Book* 11: e0166. <https://doi.org/10.1199/tab.0166>
- Floková K, Tarkowská D, Miersch O, Strnad M, Wasternack C, Novák O. 2014. UHPLC-MS/MS based target profiling of stress-induced phytohormones. *Phytochemistry* 105: 147–157.
- Franzke A, Lysak MA, Al-Shehbaz IA, Koch MA, Mummenhoff K. 2011. Cabbage family affairs: the evolutionary history of Brassicaceae. *Trend Plant Sci* 16: 108–116.

- Galvan-Ampudia CS, Testerink C. 2011. Salt stress signals shape the plant root. *Curr Opin Plant Biol* 14: 296–302.
- Gao X, Yuan HM, Hu YQ, Li J, Lu YT. 2014. Mutation of *Arabidopsis* CATALASE2 results in hyponastic leaves by changes of auxin levels. *Plant Cell Environ* 37: 175–188.
- Geng Y, Wu R, Wee CW, Xie F, Wei X, Chan PMY, Tham C, Duan L, Dinneny JR. 2013. A spatio-temporal understanding of growth regulation during the salt stress response in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 25: 2132–54.
- Gharbi E, Martínez JP, Benahmed H, Hichri I, Dobrev PI, Motyka V, Quient M, Lutts S. 2017. Phytohormone profiling in relation to osmotic adjustment in NaCl-treated plants of the halophyte tomato wild relative species *Solanum chilense* comparatively to the cultivated glycophyte *Solanum lycopersicum*. *Plant Sci* 258: 77–89.
- Ghugre SA, Rai AN, Khandagale BG, Penna S. 2011. Salt-induced stress responses of Brassica (*Brassica juncea* L.) genotypes. *Arch Agron Soil Sci* 57: 127–136.
- Giannopolitis CN, Ries SK. 1977. Superoxide dismutases. 1. Occurrence in higher-plants. *Plant Physiol* 59: 309–314.
- Gill SS, Tuteja N. 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol Biochem* 48: 909–930.
- Goleniowski M, Bonfill M, Cusido R, Palazón J. 2013. Phenolic acids. U: Ramawat KG, Mérillon JM. (Ur.) *Natural Products*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp 1952–1968.
- Griffith OW. 1980. Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Anal Biochem* 106: 207–212.
- Gruz J, Novák O, Strnad M. (2008) Rapid analysis of phenolic acids in beverages by UPLC-MS/MS. *Food Chem* 111: 789–794.
- Gupta B, Huang B. 2014. Mechanism of Salinity Tolerance in Plants: Physiological, Biochemical, and Molecular Characterization. *Int J Genomics* 2014: 1–18. doi: 10.1155/2014/701596
- Gururani MA, Venkatesh J, Tran LSP. 2015. Regulation of photosynthesis during abiotic stress-induced photoinhibition. *Mol Plant* 8: 1304–1320.
- Hayat Q, Hayat S, Irfan M, Ahmad A. 2010. Effect of exogenous salicylic acid under changing environment: A review. *Environ Exper Bot* 68: 14–25.
- Hazman M, Hause B, Eiche E, Nick P, Riemann M. 2015. Increased tolerance to salt stress in OPDA-deficient rice ALLENE OXIDE CYCLASE mutants is linked to an increased ROS-scavenging activity. *J Exp Bot* 66: 3339–3352.
- Hossain MS, Dietz K-J. 2016. Tuning of Redox Regulatory Mechanisms, Reactive Oxygen Species and Redox Homeostasis under Salinity Stress. *Front Plant Sci* 7: 548. doi: 10.3389/fpls.2016.00548
- Hossain MA, Teixeira da Silva JA, Fujita M. 2011. Glyoxalase system and reactive oxygen species detoxification system in plant abiotic stress response and tolerance: An intimate relationship. U: Shanker AK, Venkateswarlu B. (Ur.) *Abiotic Stress in Plants – Mechanisms and Adaptations*. INTECH-Open Access Publisher, Rijeka, Croatia, pp. 235-266.
- Hu K, Zhu Z. 2010. Effects of different concentrations of sodium chloride on plant growth and glucosinolate content and composition in pakchoi. *African J Biotech* 9: 4428–4433.
- Huang Z, Zhao L, Chen D, Liang M, Liu Z, Shao H, Long X. 2013. Salt Stress Encourages Proline Accumulation by Regulating Proline Biosynthesis and Degradation in Jerusalem Artichoke Plantlets. *PLoS ONE* 8: e62085. doi: 10.1371/journal.pone.0062085

- Hura T, Hura K, Dziurka K, Ostrowska A, Bączek-Kwinta R, Grzesiak M. 2012: An increase in the content of cell wall-bound phenolics correlates with the productivity of triticale under soil drought. *J Plant Physiol* 169: 1728–1736.
- Hura T, Hura K, Ostrowska A, Grzesiak M, Dziurka K. 2013. The cell wall-bound phenolics as a biochemical indicator of soil drought resistance in winter triticale. *Plant Soil Environ* 59: 189–195.
- Iglesias MJ, Terrile MC, Bartoli CG, D’Ippólito S, Casalengué CA. 2010. Auxin signaling participates in the adaptive response against oxidative stress and salinity by interacting with redox metabolism in *Arabidopsis*. *Plant Mol Biol* 74: 215–222.
- Jan AS, Shinwari ZK, Rabbani MA. 2016. Morpho-biochemical evaluation of *Brassica rapa* sub-species for salt tolerance. *Genetika* 48: 323–338.
- Jasprica N. 2015. *Brassica L. U: Nikolić T, Milović M, Bogdanović S, Jasprica N (Ur.) Endemi u Hrvatskoj flori (Endems in Croatian flora)*. Alfa, Zagreb, pp 107–115.
- Jayakannan M, Bose J, Babourina O, Rengel Z, Shabala S. 2015. Salicylic acid in plant salinity stress signalling and tolerance. *Plant Growth Regul* 76: 25–40.
- Ji H, Pardo JM, Batelli G, Van Oosten MJ, Bressan RA, Li X. 2013. The salt overly sensitive (SOS) pathway: Established and emerging roles. *Mol Plant* 6: 275–286.
- Jones AM. 2016. A new look at stress: abscisic acid patterns and dynamics at high-resolution. *New Phytol* 210: 38–44.
- Julkowska MM, Testerink C. 2015. Tuning plant signaling and growth to survive salt. *Trend Plant Sci* 20: 586–594.
- Junghans U, Polle A, Döchting P, Weiler E, Kuhlmann B, Gruber F, Teichmann T. 2006. Adaptation to high salinity in poplar involves changes in xylem anatomy and auxin physiology. *Plant Cell Environ* 29: 1519–1531.
- Kalaji HM, Govindjee Bosa K, Koscielniak J, Zuk-Gołaszewska K. 2011. Effects of salt stress on photosystem II efficiency and CO₂ assimilation of two Syrian barley landraces. *Environ Exp Bot* 73: 64–72.
- Kamboj A, Ziemann M, Bhave M. 2015. Identification of salt-tolerant barley varieties by a consolidated physiological and molecular approach. *Acta Physiol Plant* 37: 1716. doi:10.1007/s11738-014-1716-4.
- Kang DJ, Seo YJ, Lee JD, Ishii R, Kim KU, Shin DH, Park SK, Jang SW, Lee IJ. 2005. Jasmonic acid differentially affects growth, ion uptake and abscisic acid concentration in salt-tolerant and salt-sensitive rice cultivars. *J Agron Crop Sci* 191: 273–282.
- Kavi Kishor PB, Sreenivasulu N. 2014. Is proline accumulation per se correlated with stress tolerance or is proline homeostasis a more critical issue? *Plant Cell Environ* 37: 300–11.
- Kiefer M, Schmickl R, German DA, Mandakova T, Lysak MA, Al-Shehbaz IA, Franzke A, Mummenhoff K, Stamatakis A, Koch MA. 2014. BrassiBase: introduction to a novel knowledge database on Brassicaceae evolution. *Plant Cell Physiol* 55: 1–9.
- Kinoshita N, Wang H, Kasahara H, Liu J, MacPherson C, Machida Y, Kamiya Y, Hannah MA, Chua N-H. 2012. IAA-Ala resistant3, an evolutionarily conserved target of miR167, mediates *Arabidopsis* root architecture changes during high osmotic stress. *Plant Cell* 24: 3590–3602.
- Kohli A, Sreenivasulu N, Lakshmanan P, Kumar PP. 2013. The phytohormone crosstalk paradigm takes center stage in understanding how plants respond to abiotic stresses. *Plant Cell Rep* 32: 945–957.

- Koornneef M, Meinke D. 2010. The development of Arabidopsis as a model plant. *Plant J* 61: 909–921.
- Korasick DA, Enders TA, Strader LC. 2013. Auxin biosynthesis and storage forms. *J Exp Bot* 64: 2541–2555.
- Koroleva O, Torkova A, Nikolaev I, Khrameeva E, Fedorova T, Tsentlovich M, Amarowicz R. 2014. Evaluation of the antiradical properties of phenolic acids. *Int J Mol Sci* 15: 16351–16380.
- Kumar G, Purty RS, Sharma MP, Singla-Pareek SL, Pareek A. 2009. Physiological responses among Brassica species under salinity stress show strong correlation with transcript abundance for SOS pathway-related genes. *J Plant Physiol* 166: 507–20.
- Kurotani KI, Hayashi K, Hatanaka S, Toda Y, Ogawa D, Ichikawa, H, Ishimaru Y, Tashita R, Suzuki T, Ueda M, Hattori T, Takeda S. 2015. Elevated levels of CYP94 family gene expression alleviate the Jasmonate response and enhance salt tolerance in rice. *Plant Cell Physiol* 56: 779–789.
- Larionov A, Krause A, Miller W. 2005. A standard curve based method for relative real time PCR data processing. *BMC Bioinform* 6: 62.
- Lee SJ, Jeong EM, Ki AY, Oh KS, Kwon J, Jeong JH, Chung NJ. 2016. Oxidative defense metabolites induced by salinity stress in roots of *Salicornia herbacea*. *J Plant Physiol* 206: 133–142
- Levine RL, Williams JA, Stadtman ER, Shacter E. 1994. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods in Enzymology* 233: 346–357.
- Lewandowska D, ten Have S, Hodge K, Tillemans V, Lamond AI, Brown JWS. 2013. Plant SILAC: Stable-Isotope Labelling with Amino Acids of Arabidopsis Seedlings for Quantitative Proteomics. *PLoS ONE* 8: e72207. doi:10.1371/journal.pone.0072207
- Liu L, Guo G, Wang Z, Ji H, Mu F, Li X, 2014. Auxin in plant growth and stress responses. U: Tran L-SP, Pal S (Ur.) *Phytohormones: a window to metabolism, signaling and biotechnological applications*. Springer, Verlag Berlin Heidelberg, pp. 1-35.
- Liu S, Liu Y, Xinhua Yang X, Tong C ... Paterson AH. 2014. The *Brassica oleracea* genome reveals the asymmetrical evolution of polyploid genomes. *Nat Commun* 5: 3930, DOI: 10.1038/ncomms4930.
- Ludwig-Müller J. 2011. Auxin conjugates: their role for plant development and in the evolution of land plants. *J Exp Bot* 62: 1757–1773.
- Ljung K. 2013. Auxin metabolism and homeostasis during plant development. *Development* 140: 943–950.
- Mancarella S, Orsini F, Van Oosten MJ, Sanoubar R, Stanghellini C, Kondo S, Gianquinto G, Maggio A. 2016. Leaf sodium accumulation facilitates salt stress adaptation and preserves photosystem functionality in salt stressed *Ocimum basilicum*. *Environ Exp Bot* 130: 162–173.
- Matotan Z. 2007. Očuvanje i zaštita starih domaćih sorti povrća. *Sjemenarstvo* 24: 35-40.
- Meinke DW, Cherry JM, Dean C, Rounsley SD, Koornneef M. 1998. *Arabidopsis thaliana: A Model Plant for Genome Analysis*. *Science* 282: 662–682.
- Misra AN, Srivastava A, Strasser RJ. 2001. Utilization of fast chlorophyll a fluorescence technique in assessing the salt/ion sensitivity of mung bean and Brassica seedlings. *J Plant Physiol* 158: 1173–1181.
- Mittal S, Kumari N, Sharma V. 2012. Differential response of salt stress on *Brassica juncea*: Photosynthetic performance, pigment, proline, D1 and antioxidant enzymes. *Plant Physiol Biochem* 54: 17–26.

- Moles TM, Pompeiano A, Huarancca Reyes T, Scartazza A, Guglielminetti L. 2016. The efficient physiological strategy of a tomato landrace in response to short-term salinity stress. *Plant Physiology and Biochemistry* 109: 262–272.
- Mukherjee SP, Choudhuri MA. 1983. Implications of water stress-induced changes in the levels of endogenous ascorbic acid and hydrogen peroxide in *Vigna* seedlings. *Physiol Plant* 58: 166–170.
- Munns R, Gilliam M. 2015. Salinity tolerance of crops - what is the cost? *New Phytol* 208: 668–673.
- Munns R, Tester M. 2008. Mechanisms of salinity tolerance. *Annu Rev Plant Biol* 59: 651–81.
- Murashige T, Skoog F. 1962. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiol Plantarum* 15: 473–497.
- Nakano Y, Asada K. 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol* 22: 867–880.
- Normanly J. 2010. Approaching cellular and molecular resolution of auxin biosynthesis and metabolism. *Cold Spring Harb Perspec. Biol* 2: a001594.
- Novák O, Hényková E, Sairanen I, Kowalczyk M, Pospíšil T, Ljung K. 2012. Tissue specific profiling of the *Arabidopsis thaliana* auxin metabolome. *Plant J* 72: 523–536.
- Ostrowski M, Ciarkowska A, Jakubowska A. 2016. The auxin conjugate indole-3-acetyl-aspartate affects responses to cadmium and salt stress in *Pisum sativum* L. *J Plant Physiol* 191: 63–72.
- Pang Q, Guo J, Chen S, Chen Y, Zhang L, Fei M, Jin S, Li M, Wang Y, Yan X. 2012. Effect of salt treatment on the glucosinolate-myrosinase system in *Thellungiella salsuginea*. *Plant Soil* 355: 363–374.
- Pedranzani H, Racagni G, Alemanno S, Miersch O, Ramírez I, Peña-Cortés H, Taleisnik E, Machado-Domenech E, Abdala G. 2003. Salt tolerant tomato plants show increased levels of jasmonic acid. *Plant Growth Regul* 4: 149–158.
- Pfaffl, M. W., 2004. Quantification strategies in real- time PCR. U: Bustin SA. (Ur.) A-Z of quantitative PCR. 1, pp. 89–113.
- Puniran-Hartley N, Hartley J, Shabala L, Shabala S. 2014. Salinity-induced accumulation of organic osmolytes in barley and wheat leaves correlates with increased oxidative stress tolerance: In planta evidence for cross-tolerance. *Plant Physiol Biochem* 83: 32–39.
- Purty RS, Kumar G, Singla-Pareek SL, Pareek A. 2008. Towards salinity tolerance in Brassica: An overview. *Physiol Mol Biol Plants* 14: 39–49.
- Porco S, Pěnčík A, Rashed A, Voß U, Casanova-Sáez R, Bishopp A, Golebiowska A, Bhosale R, Swarup R, Swarup K, Penáková P, Novák O, Staswick P, Hedden P, Phillips AL, Vissenberg K, Bennett MJ, Ljung K. 2016. Dioxygenase-encoding AtDAO1 gene controls IAA oxidation and homeostasis in *Arabidopsis*. *PNAS* 113: 11016–21.
- Qi J, Yu S, Zhang F, Shen X, Zhao X, Yu Y, Zhang D. 2010. Reference Gene Selection for Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction of mRNA Transcript Levels in Chinese Cabbage (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*). *Plant Mol Biol Rep* 28: 597–604.
- Qin F, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. 2011. Achievements and challenges in understanding plant abiotic stress responses and tolerance. *Plant Cell Physiol* 52: 1569–1582.
- Quideau S, Deffieux D, Douat-Casassus C, Pouysegou L. 2011. Plant polyphenols: Chemical properties, biological activities, and synthesis. *Angew Chem Int Ed Engl* 50: 586–621.

- Radić Brkanac S, 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. *Regul Toxicol Pharmacol* 73: 923–929.
- Radić S, Peharec Štefanić P, Lepeduš H, Roje V, Pevalak-Kozlina B. 2013. Salt tolerance of *Centaurea ragusina* L. is associated with efficient osmotic adjustment and increased antioxidative capacity. *Environ Exp Bot* 87: 39–48.
- Rakow G. 2004. Species Origin and Economic Importance of Brassica in Biotechnology. U: Pua EC, Douglas CJ. (Ur.) *Brassica*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Rampey RA, LeClere S, Kowalczyk M, Ljung K, Sandberg G, Bartel B. 2004. A Family of Auxin-Conjugate Hydrolases That Contributes to Free Indole-3-Acetic Acid Levels during Arabidopsis Germination. *Plant Physiol* 135: 978–988.
- Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. 1996. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic Biol Med* 20: 933–956.
- Rittenberg D, Foster L. 1940. A new procedure for quantitative analysis by isotope dilution, with application to the determination of amino acids and fatty acids. *J Biol Chem* 133: 727–744.
- Rodríguez AA, Grunberg KA, Taleisnik EL. 2002. Reactive Oxygen Species in the Elongation Zone of Maize Leaves Are Necessary for Leaf Extension. *Plant Physiol* 129: 1627–1632.
- Ruiz JM, Blumwald E. 2002. Salinity-induced glutathione synthesis in *Brassica napus*. *Planta* 214: 965–969.
- Salopek-Sondi B, Pavlović I, Smolko A, Šamec D. 2017. Auxin as a Mediator of Abiotic Stress Responses. U: Pandey GK. (Ur.) *Mechanism of Plant Hormone Signaling under Stress*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA. doi: 10.1002/9781118889022.ch1
- Salopek-Sondi B, Pollmann S, Gruden K, Oelmüller R, Ludwig-Müller J. 2015. Improvement of root architecture under abiotic stress through control of auxin homeostasis in Arabidopsis and Brassica crops. *Journal of Endocytobiosis and Cell Research* 26: 100–111.
- Salopek-Sondi B, Šamec D, Mihaljević S, Smolko A, Pavlović I, Janković I, Ludwig-Müller J. 2013. Influence of stress hormones on the auxin homeostasis in *Brassica rapa* seedlings. *Plant Cell Rep* 32: 1031–1042.
- Santino A, Taurino M, De Domenico S, Bonsegna S, Poltronieri P, Pastor V, Flors V. 2013. Jasmonate signaling in plant development and defense response to multiple (a)biotic stresses. *Plant Cell Rep* 32: 1085–98.
- Savić B, Tomić S, Magnus V, Gruden K, Barle K, Grenković R, Ludwig-Müller J, Salopek-Sondi B. 2009. Auxin Amidohydrolases from *Brassica rapa* Cleave the Alanine Conjugate of Indolepropionic Acid as a Preferable Substrate: A Biochemical and Modeling Approach. *Plant Cell Physiol* 50: 1587–1599.
- Shabala S. 2013. Learning from halophytes: Physiological basis and strategies to improve abiotic stress tolerance in crops. *Ann Bot* 112: 1209–1221.
- Shahidi F, Yeo JD. 2016. Insoluble-bound phenolics in food. *Molecules* 21: E1216. doi: 10.3390/molecules21091216
- Shannon MC, Grieve CM. 1999. Tolerance of vegetable crops to salinity. *Sci Horticu* 78: 5–38.
- Smith IK. 1985. Stimulation of glutathione synthesis in photorespiring plants by catalase inhibitors. *Plant Physiol* 79: 1044–1047.

- Staswick PE, Serban B, Rowe M, Tiryaki I, Maldonado MT, Maldonado MC, Suza W. 2005. Characterization of an Arabidopsis enzyme family that conjugates amino acids to indole-3-acetic acid. *Plant Cell* 17: 616–627.
- Staswick PE, Tiryaki I, Rowe ML. 2002. Jasmonate response locus *JAR1* and several related Arabidopsis genes encode enzymes of the firefly luciferase superfamily that show activity on jasmonic, salicylic and indole-3-acetic acids in an assay for adenylation. *Plant Cell* 14: 1405–1415.
- Strasser RJ, Tsimilli-Michael M, Srivastava A. 2004. Analysis of the chlorophyll a fluorescence transient. U: Govinjee GC. (Ur.) Chlorophyll a Fluorescence: A Signature of Photosynthesis. Springer, Dordrecht, pp. 321–362.
- Su J, Wu S, Xu Z, Qiu S, Luo T, Yang Y, Chen Q, Xia Y, Zou S, Bang-Lian Huang B-L, Huang B. 2013. Comparison of salt tolerance in Brassicas and some related species. *Am J Plant Sci* 4: 1911-1917.
- Surender Reddy P, Jogeswar G, Rasineni GK, Maheswari M, Reddy AR, Varshney RK, Kavi Kishor P.B. 2015. Proline over-accumulation alleviates salt stress and protects photosynthetic and antioxidant enzyme activities in transgenic sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench]. *Plant Physiol Biochem* 94: 104–113.
- Šamec D, Pavlović I, Salopek-Sondi B. 2017. White cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata* f. *alba*): botanical, phytochemical and pharmacological overview. *Phytochem Rev* 16: 117–135.
- Tani T, Sobajima H, Okada K, Chujo T, Arimura SI, Tsutsumi N, Nishimura M, Seto H, Nojiri H, Yamane H. 2008. Identification of the OsOPR7 gene encoding 12-oxophytodienoate reductase involved in the biosynthesis of jasmonic acid in rice. *Planta* 227: 517–526.
- Teakle NL, Tyerman SD. 2010. Mechanisms of Cl⁻ transport contributing to salt tolerance. *Plant Cell Environ* 33: 566–589.
- Tenhaken R. 2015. Cell wall remodeling under abiotic stress. *Front Plant Sci* 5: 771. doi: 10.3389/fpls.2014.00771
- Tivendale ND, Ross JJ, Cohen JD. 2014. The shifting paradigms of auxin biosynthesis. *Trends Plant Sci* 19: 44–51.
- Tognetti VB, Van Aken O, Morreel K, Vandenbroucke K, van de Cotte B, De Clercq I, Chiwocha S, Fenske R, Prinsen E, Boerjan W, Genty B, Stubbs KA, Inze D, Van Breusegem F. 2010. Perturbation of indole-3-butyric acid homeostasis by the UDP-Glucosyltransferase UGT74E2 modulates Arabidopsis architecture and water stress tolerance. *Plant Cell* 22: 2660-2679.
- Tognetti VB, Mühlenbock P, van Breusegem F. 2012. Stress homeostasis – the redox and auxin perspective. *Plant Cell Environ* 35: 321–333.
- U N. 1935. Genome analysis in Brassica with special reference to the experimental formation of *B. napus* and peculiar mode of fertilization. *Japan J Bot* 7: 389–452.
- Valenzuela CE, Acevedo-Acevedo O, Miranda GS, Vergara-Barros P, Holuigue L, Figueroa CR, Figueroa PM. 2016. Salt stress response triggers activation of the jasmonate signaling pathway leading to inhibition of cell elongation in Arabidopsis primary root. *J Exp Bot* 67: 4209–4220.
- Verma S, Dubey RS. 2003. Lead toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants. *Plant Sci* 164: 645–655.
- Verma V, Ravindran P, Kumar PP. 2016. Plant hormone-mediated regulation of stress responses. *BMC Plant Biol* 16: 86.

- Vincek D, Ozimec R, Bogović M. 2012. Uz kuću i na polju. Od raštike do varaždince. U: Peharda R. (Ur.) Varaždinsko zelje. Mediaks, Vidovec, pp. 18–27.
- Wang Y, Li K, Li X. 2009. Auxin redistribution modulates plastic development of root system architecture under salt stress in *Arabidopsis thaliana*. J Plant Physiol 166: 1637–1645.
- Wang Y, Mopper S, Hasenstein KH. 2001. Effects of salinity on endogenous ABA, IAA, JA, and SA in *Iris hexagona*. J Chem Ecol 27: 327–342.
- Wang X, Wang H, Wang J, Sun R, Wu J, Liu S, ... Zhang Z. 2011. The genome of the mesopolyploid crop species *Brassica rapa*. Nat Genet 43: 1035–1039.
- Wasternack C, Strnad M. 2016. Jasmonate signaling in plant stress responses and development – active and inactive compounds. New Biotechnol 33: 604–613.
- Wicke B, Smeets E, Dornburg V, Vashev B, Gaiser T, Turkenburg W, Faaij A. 2011. The global technical and economic potential of bioenergy from salt-affected soils. Energy Environ Sci 4: 2669–2681.
- Widemann E, Miesch L, Lugan R, Holder E, Heinrich C, Aubert Y, Miesch M, Pinot F, Heitz T. 2013. The amidohydrolases IAR3 and ILL6 contribute to jasmonoyl-isoleucine hormone turnover and generate 12-hydroxyjasmonic acid upon wounding in *Arabidopsis* leaves. J Biol Chem 288: 31701–31714.
- Witzel K, Matros A, Strickert M, Kaspar S, Peukert M, Mühling KH, Börner A, Mock HP. 2014. Salinity stress in roots of contrasting barley genotypes reveals time-distinct and genotype-specific patterns for defined proteins. Mol Plant 7: 336–355.
- Yan K, Zhao S, Bian L, Chen X. 2017. Saline stress enhanced accumulation of leaf phenolics in honeysuckle (*Lonicera japonica* Thunb.) without induction of oxidative stress. Plant Physiol Biochem 112: 326–334.
- Zhang X, Lu G, Long W, Zou Y, Li F, Nishio T. 2014. Recent progress in drought and salt tolerance studies in Brassica crops. Breeding Sci 64: 60–73.
- Zhang T, Poudel AN, Jewell JB, Kitaoka N, Staswick P, Matsuura H, Koo AJ. 2016. Hormone crosstalk in wound stress response: Wound inducible amidohydrolases can simultaneously regulate jasmonate and auxin homeostasis in *Arabidopsis thaliana*. J Exp Bot 67: 2107–2120.
- Zhao Y. 2012. Auxin biosynthesis: a simple two-step pathway converts tryptophan to indole-3-acetic acid in plants. Mol Plant 5: 334–338.
- Zheng L, Meng Y, Ma J, Zhao X, Cheng T, Ji J, Chang E, Meng C, Deng N, Chen L, Shi S, Jiang Z. 2015. Transcriptomic analysis reveals importance of ROS and phytohormones in response to short-term salinity stress in *Populus tomentosa*. Front Plant Sci 6: 678. 10.3389/fpls.2015.00678
- Zhu M, Zhou M, Shabala L, Shabala S. 2016. Physiological and molecular mechanisms mediating xylem Na⁺ loading in barley in the context of salinity stress tolerance. Plant Cell Environ. doi: 10.1111/pce.12727

7. SAŽETAK

U posljednjih nekoliko desetljeća svjedoci smo klimatskih promjena koje za posljedicu imaju smanjenje produktivnosti poljoprivrednih usjeva. Razumijevanje mehanizama odgovora biljaka na čimbenike abiotskog stresa (povišeni salinitet, suša, visoke temperature itd.) pruža nam nove alate u uzgoju poljoprivrednih kultura. S tom svrhom, istraživanje je bilo provedeno na odabranim kulturama iz porodice kupusnjača: kineskom kupusu (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*), bijelom kupusu (*Brassica oleracea* var. *capitata* cv. 'Varaždinski') i raštici (*Brassica oleracea* var. *acephala*) te modelnom organizmu uročnjaku (*Arabidopsis thaliana*) u uvjetima solnog stresa (50, 100 i 200 mM NaCl). Bijeli kupus cv. 'Varaždinski' i raštika predstavljaju tradicionalno važne domaće sorte kupusnjača dok je kineski kupus bio interesantan s obzirom da je to komercijalna vrsta čiji je genom sekvencioniran te olakšava molekularna istraživanja.

Detaljna karakterizacija odgovora kineskog kupusa bila je provedena na fiziološkoj, biokemijskoj, hormonskoj i molekularnoj razini. Funkcionalna istraživanja bila su provedena na mutantama uročnjaka disfunkcionalnim u genima za auksin-amidohidrolaze. Analiza fitohormona omogućila je uvid u njihovu ulogu u različito tolerantnih kupusnjača. Rezultati testova inhibicije rasta korijena pokazali su da je kineski kupus osjetljivija vrsta u odnosu na bijeli kupus i raštiku. Detaljna karakterizacija odgovora kineskog kupusa bila je provedena u dvije razvojne faze: klijančima i odaslim biljkama radi evaluacije odgovora različitih vegetativnih stadija. Solni stres potaknuo je iste obrambene mehanizama u oba stadija kineskog kupusa u svrhu eliminacije ROS koji nastaju kao rezultat prisutnosti solnog stresora: aktivaciju nekih antioksidacijskih enzima, te akumulaciju staničnih antioksidansa poput askorbata, glutationa i fenolnih kiselina, no u konačnici je ipak došlo do oksidativnih oštećenja lipidnih membrana u odraslim biljkama. Uslijed povišenog saliniteta reducirana je fotosintetska učinkovitost u oba razvojna stadija kineskog kupusa, no mehanizmi antioksidacijskog odgovora uspjeli su održati fotosintetski aparat funkcionalnim. Nemogućnost održavanja optimalnog omjera K^+/Na^+ upućuje na toksičnost primjenjenih koncentracija soli, a akumulacija prolina javlja se kao odgovor na osmotski šok.

Analiza fitohormona (ABA, SA, JA i IAA) UHPLC-MS/MS metodom pružila je uvid u ulogu tih hormona u brzom, inicijalnom odgovoru na stres. Razlike u količini SA mogu se pripisati njenom stimulativnom učinku na biokemijske mehanizme tolerancije. Promjene u razini ABA u korelaciji su s njenom ulogom u održavanju turgora listova u solnom stresu i zamjećenom tolerancijom ispitivanih kupusnjača. Najosjetljivija kupusnjača, kineski kupus, nije bila u mogućnosti regulirati razinu ABA pri najvišoj koncentraciji soli što je rezultiralo izrazitim gubitkom turgora i opuštanjem listova. S druge strane, bijeli kupus uspješno održava razinu ABA, a raštika je čak i dodatno akumulira. Osim važnosti ABA, jasmonati također doprinose odgovoru na povišeni salinitet. U bijelom kupusu i raštici razina jasmonata je značajnije niža uslijed stresa u odnosu na razinu jasmonata u listovima kineskog kupusa. Oprečan trend između porasta razine ABA i pada razine jasmonata u korijenu kupusnjača u suglasnosti je s literaturnim podacima o regulaciji arhitekture korijena pomoću ABA i JA što rezultira inhibicijom rasta primarnog korijena i smanjenjem broja lateralnog korijenja u solnom

stresu. Adaptivni mehanizam biljaka na uvjete solnog stresa osim koordinacije odgovora putem hormona stresa uključuje i regulaciju putem hormona rasta kao što su auksini (uglavnom IAA). Povećana akumulacija IAA, koja u koncentracijama višim od fizioloških ima inhibitoran učinak na rast i razvoj biljke, izuzetno je izražena u listovima kineskog kupusa.

Također, povećana razina transkripcije gena za auksin-amidohidrolaze IAR3 i ILR1 upućuje na njihovu ulogu u homeostazi auksina uslijed solnog stresa. Funkcionalna istraživanja mutanti *A. thaliana* u genima za auksin-amidohidrolaze pokazala su da su auksin-amidohidrolaze važna komponenta u regulaciji rasta i arhitekture korijena u solnom stresu.

8. SUMMARY

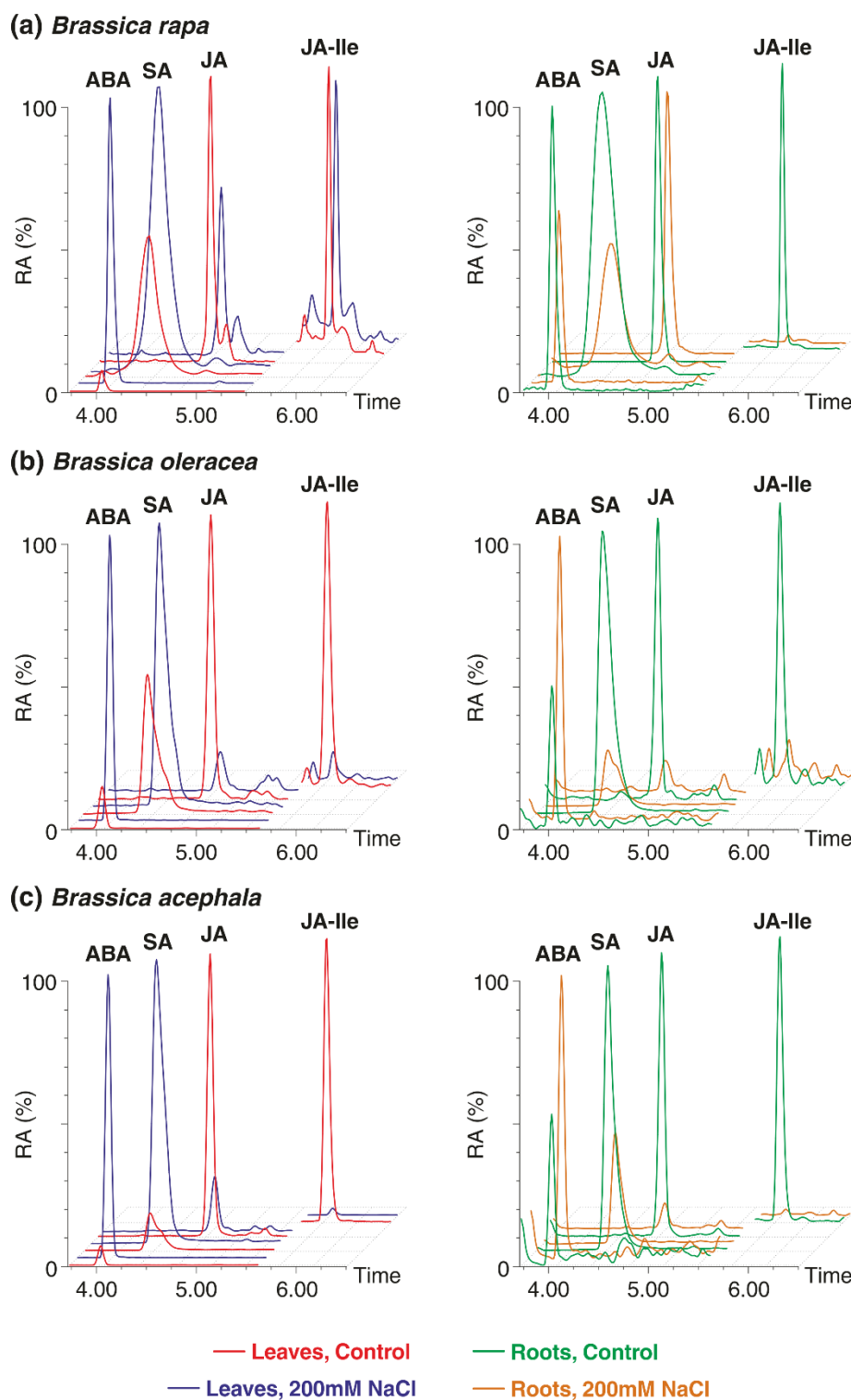
Climate changes present in the last decades are one of the serious agricultural problems causing the reduction in the crop productivity and quality. Understanding the plant stress response upon unpleasant environmental conditions (increased salinity, drought, high temperature etc.) is reliable tool in coping with agricultural losses. In order to get insight into salinity tolerance mechanisms of Brassica crops, Chinese cabbage (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*), white cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata* cv. 'Varaždinski'), kale (*Brassica oleracea* var. *acephala*) and model plant *Arabidopsis thaliana* were exposed to short term salinity stress in the range of NaCl concentrations 50-200 mM. White cabbage cv. 'Varaždinski' and kale are traditionally important varieties of *Brassica oleracea* in Croatia. Chinese cabbage was interesting since it has been first commercial Brassica crop which genome has been sequenced, enabling molecular analysis.

Response of Chinese cabbage was evaluated in details using physiological, biochemical, molecular and hormonal approach. Functional research was performed by using mutants of *A. thaliana* in genes coding for auxin amidohydrolases in order to get information about auxin homeostasis upon salinity. Qualitative and quantitative phytohormones analysis provided data suggesting phytohormone role in salt stress tolerance in different Brassica crops. Root growth inhibition assay marked Chinese cabbage as the most sensitive Brassica crop upon salinity. Detailed characterization of stress response was done in two different growth stages of Chinese cabbage: seedlings and plants with four developed leaves. Generation of ROS due the presence of salt stressor resulted in activation of some of the antioxidant enzymes, accumulation of ascorbate, glutathione and phenolic acids. The antioxidant system was not sufficient enough to avoid significant effects on lipid peroxidation. High salt concentrations caused decline in photosynthesis performance and overaccumulation of ROS in both growth stages but overall photosynthesis remained functional. Seedlings and plants were not able to maintain optimal K^+/Na^+ ratio implying toxicity of salt treatments. Osmotic shock triggered proline accumulation.

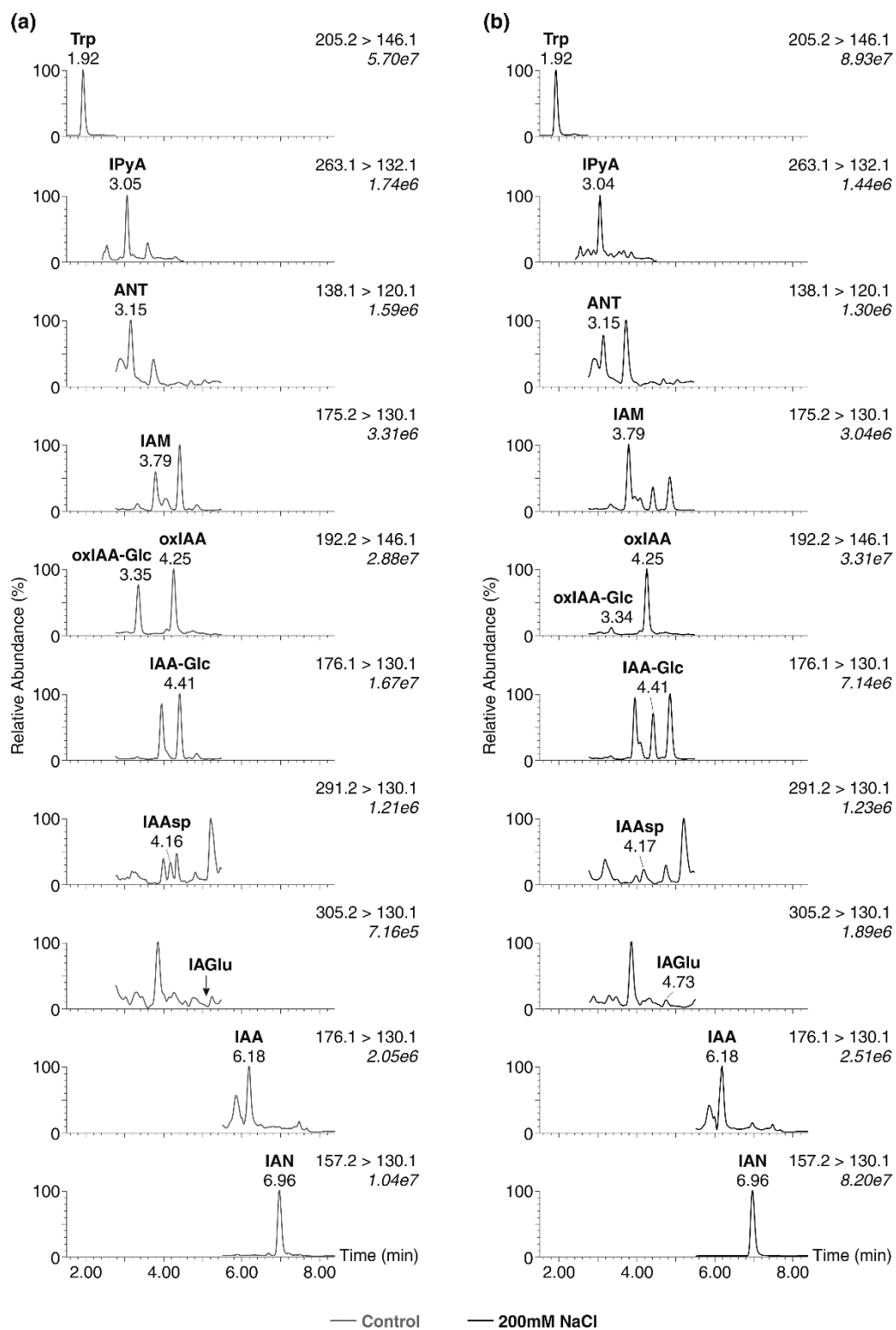
UHPLC-MS/MS analysis of phytohormones (ABA, SA, JA i IAA) provided insight into the role of hormones in initial, fast plant response to stress. Observed changes in SA upon salinity can be explained as its simulative effect on biochemical mechanisms of tolerance. Levels of ABA correlated with the protection of turgor pressure in leaves and differences in Brassica crops tolerance. The most sensitive Brassica crop, Chinese cabbage, was not able to maintain high ABA levels at the highest salt concentration which resulted in turgor loss and wilted leaves. The tolerant crops were able to maintain high ABA levels (white cabbage) or even promote additional accumulation of ABA (kale) upon highest salinity. In addition to ABA and SA, jasmonates were included in salt stress response as well. Levels of jasmonates were significantly lower in white cabbage and kale in comparison to Chinese cabbage upon salinity. Opposite pattern of ABA and jasmonates levels in roots of stressed plants are in agreement with literature data which suggest the role of ABA and JA in mediating root architecture upon salinity (primary root growth inhibition and decreased number of lateral roots). Growth promoting hormones like auxins (mostly IAA) are included in adaptive

changes upon salinity. Salt stress triggered IAA accumulation in Brassica crops while the highest IAA levels were measured in leaves of the most sensitive crop, Chinese cabbage. Increased levels of IAA correspond with inhibitory effect of higher IAA concentrations on plant growth and development.

Increased transcript levels of the genes coding for auxin amidohydrolases IAR3 and ILR1 suggest their role in auxin homeostasis upon salinity. The functional research of *A. thaliana* auxin amidohydrolases mutants showed involvement of these enzymes in the regulation of root growth and architecture upon saline conditions.



Slika 40. Reprezentativni MRM kromatogrami hormona stresa ABA, SA, JA i JA-Ile u korijenu (desno) i listovima (lijevo) kineskog kupusa (a), bijelog kupusa (b) i raštike (c) pri povišenom salinitetu (0 i 200 mM).



Slika 41. Reprezentativni MRM kromatogrami prekursora IAA, IAA i metabolita IAA u kljancima kineskog kupusa pri 0 mM NaCl (lijevo) i 200 mM NaCl (desno).

Tablica 12. Endogene količine hormona stresa: ABA, SA, JA i JA-Ile u korijenu i listovima kineskog kupusa, bijelog kupusa i raštike pri povišenom salinitetu (0-200 mM).

Korijen	NaCl (mM)	ABA (ng/g s.m.)	SA (μg/g s.m.)	JA (ng/g s.m.)	JA-Ile (ng/g s.m.)
Kineski kupus	0	33,72 ± 2,48	5,83 ± 0,24	1006,57 ± 57,03	563,81 ± 32,00
	50	54,14 ± 3,23	14,01 ± 0,62	416,09 ± 26,37	117,44 ± 14,94
	100	67,14 ± 10,55	4,95 ± 0,34	307,94 ± 7,36	95,59 ± 4,08
	200	20,93 ± 1,90	2,58 ± 0,25	181,47 ± 7,76	3,80 ± 0,43
Bijeli kupus	0	9,80 ± 0,92	7,36 ± 0,41	59,70 ± 1,88	11,23 ± 0,64
	50	11,35 ± 0,34	6,65 ± 0,35	47,28 ± 2,83	16,51 ± 1,56
	100	20,91 ± 2,10	3,00 ± 0,13	15,55 ± 1,52	2,41 ± 0,32
	200	19,66 ± 2,74	1,47 ± 0,31	6,68 ± 1,46	0,14 ± 0,02
Raštika	0	12,26 ± 1,19	5,59 ± 0,25	124,95 ± 11,87	34,89 ± 2,68
	50	16,23 ± 1,37	5,54 ± 0,31	97,09 ± 4,35	36,07 ± 5,89
	100	34,99 ± 3,75	4,92 ± 0,31	22,18 ± 3,23	8,54 ± 1,08
	200	22,13 ± 1,90	2,12 ± 0,25	11,78 ± 0,80	0,18 ± 0,08
Listovi	NaCl (mM)	ABA (ng/g s.m.)	SA (μg/g s.m.)	JA (ng/g s.m.)	JA-Ile (ng/g s.m.)
Kineski kupus	0	131,21 ± 5,58	0,61 ± 0,07	113,38 ± 8,57	12,60 ± 1,88
	50	700,54 ± 54,02	0,98 ± 0,10	107,71 ± 10,98	15,45 ± 2,37
	100	3342,08 ± 42,34	0,78 ± 0,04	91,61 ± 5,64	10,63 ± 2,03
	200	1815,65 ± 160,90	1,39 ± 0,05	57,25 ± 2,59	10,71 ± 1,48
Bijeli kupus	0	62,78 ± 5,17	0,57 ± 0,09	93,40 ± 7,22	17,31 ± 1,34
	50	150,98 ± 16,68	1,74 ± 0,40	110,97 ± 18,92	17,35 ± 3,45
	100	398,30 ± 20,83	1,25 ± 0,05	25,14 ± 2,06	3,87 ± 0,64
	200	393,10 ± 48,81	1,19 ± 0,05	12,13 ± 1,73	1,35 ± 0,20
Raštika	0	36,11 ± 2,07	0,48 ± 0,08	265,28 ± 17,11	107,91 ± 5,61
	50	195,74 ± 16,67	0,56 ± 0,10	77,32 ± 12,95	10,21 ± 0,92
	100	363,34 ± 23,49	0,74 ± 0,03	40,41 ± 5,01	4,22 ± 0,11
	200	573,23 ± 50,05	3,01 ± 0,35	43,45 ± 7,78	13,64 ± 2,69

Tablica 13. Endogene količine prekursora, IAA i metabolita IAA ($\mu\text{g/g}$ s.m.) u korijenu kineskog kupusa, bijelog kupusa i raštike pri povišenom salinitetu (0-200 mM).

	Analit	NaCl (0 mM)	NaCl (50 mM)	NaCl (100 mM)	NaCl (200 mM)
Kineski kupus	ANT	0,21 ± 0,02	0,35 ± 0,03	0,25 ± 0,01	0,27 ± 0,03
	TRP	2130,36 ± 269,07	2731,35 ± 258,20	5453,80 ± 1868,64	4273,64 ± 599,68
	IPyA	0,60 ± 0,08	0,82 ± 0,13	2,68 ± 0,24	1,82 ± 0,35
	IAM	0,072 ± 0,004	0,081 ± 0,006	0,235 ± 0,011	0,303 ± 0,019
	IAN	0,64 ± 0,02	3,20 ± 0,40	5,47 ± 0,90	6,50 ± 0,50
	IAA	0,93 ± 0,02	0,83 ± 0,01	1,01 ± 0,05	1,08 ± 0,10
	oxIAA	0,42 ± 0,01	0,63 ± 0,02	0,55 ± 0,06	0,45 ± 0,02
Bijeli kupus	ANT	0,06 ± 0,06	0,24 ± 0,03	0,26 ± 0,04	0,19 ± 0,03
	TRP	2301,69 ± 299,70	3352,12 ± 400,15	3592,82 ± 733,81	2831,25 ± 1035,88
	IPyA	1,11 ± 0,35	3,33 ± 0,88	2,36 ± 0,19	4,45 ± 0,36
	IAM	0,068 ± 0,004	0,138 ± 0,011	0,153 ± 0,010	0,131 ± 0,007
	IAN	0,71 ± 0,08	1,90 ± 0,18	2,11 ± 0,25	0,85 ± 0,10
	IAA	0,31 ± 0,01	0,53 ± 0,03	0,46 ± 0,02	0,30 ± 0,02
	oxIAA	0,52 ± 0,03	0,67 ± 0,03	0,53 ± 0,05	0,32 ± 0,02
Raštika	ANT	0,15 ± 0,02	0,14 ± 0,03	0,17 ± 0,02	0,17 ± 0,01
	TRP	2346,90 ± 330,23	4139,82 ± 1374,94	4442,77 ± 1456,56	2805,98 ± 258,98
	IPyA	1,77 ± 0,25	2,43 ± 0,33	4,32 ± 0,77	4,55 ± 0,43
	IAM	0,053 ± 0,003	0,096 ± 0,004	0,057 ± 0,004	0,091 ± 0,008
	IAN	0,51 ± 0,02	0,92 ± 0,06	9,48 ± 1,31	1,76 ± 0,27
	IAA	0,69 ± 0,03	1,02 ± 0,17	0,70 ± 0,05	2,09 ± 0,26
	oxIAA	1,08 ± 0,04	0,97 ± 0,09	0,97 ± 0,02	0,51 ± 0,06

Tablica 14. Endogene količine prekursora, IAA i metabolita IAA ($\mu\text{g/g}$ s.m.) u listovima kineskog kupusa, bijelog kupusa i raštike pri povišenom salinitetu (0-200 mM NaCl).

	Analit	NaCl (0 mM)	NaCl (50 mM)	NaCl (100 mM)	NaCl (200 mM)
Kineski kupus	ANT	0,20 ± 0,01	0,21 ± 0,03	0,12 ± 0,02	0,07 ± 0,01
	TRP	240,29 ± 16,80	192,14 ± 36,90	3181,99 ± 615,00	5110,30 ± 711,84
	IPyA	0,20 ± 0,01	0,32 ± 0,05	0,60 ± 0,08	1,29 ± 0,15
	IAM	0,02 ± 0,00	0,13 ± 0,01	0,24 ± 0,01	0,84 ± 0,06
	IAN	0,22 ± 0,05	1,49 ± 0,19	3,80 ± 0,25	10,73 ± 1,11
	IAA	0,19 ± 0,01	0,36 ± 0,02	0,48 ± 0,01	1,03 ± 0,07
	oxIAA	0,11 ± 0,00	0,20 ± 0,01	0,23 ± 0,02	0,32 ± 0,04
	IAA-Glu	0,002 ± 0,000	0,005 ± 0,001	0,004 ± 0,001	0,010 ± 0,001
	oxIAA-Glc	0,09 ± 0,18	0,48 ± 0,01	0,72 ± 0,04	0,89 ± 0,16
Bijeli kupus	ANT	0,10 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,04 ± 0,01	0,05 ± 0,01
	TRP	511,66 ± 37,27	1158,83 ± 119,66	2922,80 ± 233,65	3320,86 ± 749,83
	IPyA	2,23 ± 0,08	3,05 ± 0,36	2,16 ± 0,11	2,58 ± 0,19
	IAM	0,40 ± 0,01	0,66 ± 0,05	1,97 ± 0,19	2,14 ± 0,26
	IAN	3,92 ± 0,09	8,03 ± 0,18	34,69 ± 4,89	39,27 ± 1,37
	IAA	0,83 ± 0,04	1,04 ± 0,11	2,19 ± 0,28	2,07 ± 0,15
	oxIAA	0,62 ± 0,05	0,61 ± 0,09	0,58 ± 0,04	0,56 ± 0,03
	IAA-Glu	0,015 ± 0,001	0,016 ± 0,001	0,017 ± 0,003	0,016 ± 0,002
	oxIAA-Glc	1,15 ± 0,16	1,02 ± 0,11	1,64 ± 0,08	1,08 ± 0,31
Raštika	ANT	0,25 ± 0,03	0,17 ± 0,03	0,14 ± 0,02	0,06 ± 0,01
	TRP	354,03 ± 35,05	2381,90 ± 15,26	2167,02 ± 257,00	5345,92 ± 347,76
	IPyA	1,71 ± 0,27	3,53 ± 0,34	2,98 ± 0,25	4,73 ± 0,30
	IAM	0,30 ± 0,05	0,53 ± 0,06	0,53 ± 0,18	0,41 ± 0,06
	IAN	4,08 ± 0,19	8,74 ± 0,18	7,56 ± 0,98	12,06 ± 1,10
	IAA	0,97 ± 0,06	1,74 ± 0,08	1,29 ± 0,32	1,20 ± 0,21
	oxIAA	0,75 ± 0,02	1,13 ± 0,07	0,67 ± 0,05	0,42 ± 0,06
	IAA-Glu	0,011 ± 0,001	0,013 ± 0,000	0,007 ± 0,001	0,012 ± 0,000
	oxIAA-Glc	0,92 ± 0,09	1,62 ± 0,27	1,13 ± 0,09	0,93 ± 0,12

Tablica 15. Endogene količine prekursora i metabolita IAA i IAA u wt i mutantama za auksinamidohidrolaze pri povišenom salinitetu (0 i 100 mM NaCl).

Analit ($\mu\text{g/g s.m.}$)	NaCl (mM)	wt	<i>iar3</i>	<i>iar3, ill2</i>	<i>iar3, ill2, ilr1</i>
ANT	0	0,32 \pm 0,04	0,30 \pm 0,03	0,23 \pm 0,02	0,31 \pm 0,04
	100	0,29 \pm 0,04	0,27 \pm 0,03	0,28 \pm 0,04	0,20 \pm 0,03
TRP	0	1247,7 \pm 127,2	1269,5 \pm 114,6	2256,8 \pm 245,2	2333,1 \pm 118,1
	100	1079,8 \pm 234,4	1168,5 \pm 132,0	1901,7 \pm 280,3	2222,0 \pm 295,8
IPyA	0	1,71 \pm 0,19	2,00 \pm 0,14	2,04 \pm 0,17	2,21 \pm 0,16
	100	1,07 \pm 0,06	1,40 \pm 0,26	1,55 \pm 0,17	1,53 \pm 0,19
IAM	0	0,07 \pm 0,01	0,13 \pm 0,01	0,10 \pm 0,02	0,07 \pm 0,01
	100	0,15 \pm 0,02	0,30 \pm 0,06	0,22 \pm 0,01	0,13 \pm 0,02
IAN	0	15,43 \pm 3,24	11,92 \pm 0,66	17,75 \pm 2,56	15,28 \pm 1,34
	100	8,47 \pm 0,56	11,85 \pm 1,69	14,38 \pm 1,24	12,54 \pm 1,55
IAA	0	0,12 \pm 0,01	0,14 \pm 0,01	0,13 \pm 0,01	0,13 \pm 0,01
	100	0,14 \pm 0,00	0,22 \pm 0,01	0,15 \pm 0,02	0,15 \pm 0,01
oxIAA	0	0,25 \pm 0,03	0,32 \pm 0,01	0,30 \pm 0,04	0,03 \pm 0,00
	100	0,26 \pm 0,04	0,31 \pm 0,05	0,26 \pm 0,02	0,03 \pm 0,00
IAA-Asp	0	17,68 \pm 2,04	23,80 \pm 3,42	25,56 \pm 3,68	25,32 \pm 0,84
	100	19,86 \pm 2,54	24,16 \pm 3,46	28,18 \pm 3,10	22,66 \pm 2,07
IAA-Glc	0	0,71 \pm 0,05	0,92 \pm 0,10	1,03 \pm 0,11	0,92 \pm 0,08
	100	0,80 \pm 0,11	0,98 \pm 0,14	0,90 \pm 0,11	1,11 \pm 0,07
oxIAA-Glc	0	6,92 \pm 0,83	9,89 \pm 1,33	7,75 \pm 0,90	0,77 \pm 0,08
	100	6,08 \pm 0,61	7,31 \pm 0,66	5,86 \pm 0,54	0,87 \pm 0,14

10. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 05.12.1986. godine u Zagrebu. Nakon završenog srednjoškolskog obrazovanja u općoj XI. gimnaziji u Zagrebu godine 2005. godine upisujem Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu, preddiplomski studij Biotehnologija. Po završetku preddiplomskog studija nastavljam svoje školovanje na diplomskom studiju istog fakulteta, smjer Molekularna biotehnologija, na kojem diplomiram u rujnu 2010. godine. Tijekom preddiplomskog i diplomskog studija uključila sam se u znanstveno-istraživački rad za koji sam u suradnji s kolegama dobila Rektorovu nagradu, a za uspjeh na diplomskom studiju Povelju dekana za izvrsnost. Također, tijekom studija bila sam stipendist MZOŠ, Biotehničke zaklade i Sveučilišta u Zagrebu.

Od rujna 2011. godine radim u statusu znanstvenog novaka na Institutu Ruđer Bošković u Laboratoriju za kemijsku biologiju Zavoda za molekularnu biologiju pod mentorstvom dr. sc. Branke Salopek Sondi. Na proljeće 2012. godine upisujem Poslijediplomski interdisciplinarni sveučilišni doktorski studij Molekularne bioznanosti (modul: Biologija biljaka). Svoj doktorski rad započela sam na MZOŠ projektu "Molekularna regulacija biljnog razvitka" (098-0982913-2829; 2007.-2013.) te nastavila na HRZZ projektu "Fitohormoni u abiotskom stresu kupusnjača: mehanizmi tolerancije i primjena" (IP-2014-09-4359; 2015.-2019.) voditeljice dr. sc. Branke Salopek Sondi. Također, bila sam suradnik na tri bilateralna DAAD projekta (2011.-2012.: "Endogenous antimicrobial compounds in Chinese cabbage (*Brassica rapa* L.) upon viral and bacterial infections"; 2012.-2013.: "Phenolic derivatives in *Physcomitrella patens* Hedw.: profile, hormonal regulation and role in biotic stress"; 2014.-2015.: "The role of salicylic acid and auxins in defence responses of *Brassica* crop plants") u sklopu kojih odlazim u Dresden, Njemačka, u Laboratorij prof. dr. sc. Jutte Ludwig-Müller pri Institutu za botaniku. Sveukupno sam u Dresdenu provela 3,5 mjeseci usavršavajući metode rada u području analitike biljnih hormona na GC-MS uređaju i metode rada s *A. thaliana*. Dobitnica sam Erasmus stipendije za stručnu praksu koja mi je omogućila boravak u Laboratoriju za biljne regulatore rasta, Olomouc, Češka. U sklopu HRZZ projekta posjećujem također navedeni Laboratorij u kojem sam pod stručnim vodstvom dr. sc. Ondřeja Nováka i prof. dr. sc. Miroslava Strnada provela sveukupno 7,5 mjeseci u radu u području analitike biljnih hormona i specijaliziranih biljnih metabolita na UHPLC-MS/MS uređaju. Sudjelovala sam u popularizaciji znanosti u sklopu Otvorenih dana IRB ODI2013 "Čudesni svijet biljnih molekula", ODI2015 "Ruđerov znanstveni kviz" i ODI2017 "Biljne molekule: lijekovi iz prošlosti i čuvari zdravlja budućnosti". Članica sam Hrvatskog društva za biljnu biologiju te Hrvatskog društva za biokemiju i molekularnu biologiju.

Sudjelovala sam na šest znanstvenih skupova, koautorica sam jednog poglavlja u međunarodnoj knjizi i u koautorstvu sam objavila dva znanstvena rada te su dva u postupku recenzije.

Izvorni znanstveni i pregledni radovi u CC časopisima:

1. Šamec D, Pavlović I, Salopek-Sondi B. 2017. White cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata* f. *alba*): botanical, phytochemical and pharmacological overview. *Phytochem Rev* 16: 117–135.
2. Salopek-Sondi B, Šamec D, Mihaljević S, Smolko A, Pavlović I, Janković I, Ludwig-Müller J. 2013. Influence of stress hormones on the auxin homeostasis in *Brassica rapa* seedlings. *Plant Cell Rep* 32: 1031–1042.

Poglavlja u knjizi:

1. Salopek-Sondi B, Pavlović I, Smolko A, Šamec D. 2017. Auxin as mediator in abiotic stress responses. U: *Mechanism of Plant Hormone Signaling Under Stress*. Pandey G (ur.). New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., Str. 3–36.

Radovi u postupku publiciranja:

1. Pavlović I, Pěnčík A, Novák O, Vujčić V, Radić Brkanac S, Lepeduš H, Strnad M, Salopek-Sondi B. 2017. Short-term salt stress in *Brassica rapa* seedlings causes alterations in auxin metabolism. *Plant Physiol Biochem – pod recenzijom*
2. Pavlović I, Tarkowski P, Prebeg T, Lepeduš H, Salopek-Sondi B. 2017. Green spathe of Peace lily (*Spathiphyllum wallisii*): an assimilate source for developing fruit. *J Plant Physiol - pod recenzijom*

Sudjelovanja na kongresima:

1. Pavlović I, Novák O, Gruz J, Vujčić V, Radić Brkanac S, Salopek Sondi B. Short-term salinity stress response of *Brassica rapa* seedlings. *Plant Nutrition, Growth and Environment Interactions III-Programme and Abstracts*. Mühling K, Touraev A (ur.). Beč: VISCEA, 2017. 31-31.
2. Pavlović I, Ludwig-Müller J, Salopek-Sondi B. Hormonal profile and antioxidant defense system of *Brassica rapa* plants during drought and recovery period. *Plant biology Europe FESPB/EPSO 2014. Congress Abstract book 2014*. 29-29.
3. Salopek-Sondi B, Pavlović I, Šamec D, Smolko A, Mihaljević S, Šola I, Rusak G, Ludwig-Müller J. Auxin homeostasis in *Brassica rapa* as a mechanism of plant stress response. *Auxins and Cytokinins in Plant Development...and Interactions with Other Phytohormones. Book of Abstracts*. Dobrev P, Hoyerova K, Kaminek M, Motyka V, Petrašek J, Vankova R, Zažimalova E. (ur.). Prag: The Academy of Sciences of the Czech Republic, 2014. 138-138.
4. Pavlović I, Lepeduš H, Ludwig-Müller J, Salopek-Sondi B. Stress response of *Brassica rapa* plants to salt treatment. *1st International Conference on Plant Biology, 20th Symposium of*

the Serbian Plant Physiology Society . Vinterhalter D (ur.). Beograd: Serbian Plant Physiology Society, 2013. 118-119.

5. Nižić I, Šamec D, Lepeduš H, Ludwig-Müller J, Salopek-Sondi B. Effect of salt stress on *Brassica rapa* L. seedlings. Zbornik sažetaka 11. Hrvatskog biološkog kongresa s međunarodnim sudjelovanjem. Jelaska SD, Klobučar GIV, Šerić Jelaska L, Leljak Levanić D, Lukša Ž (ur.). Zagreb: Hrvatsko biološko društvo 1885, 2012. 178-179.

6. Nižić I, Šamec D, Salopek-Sondi B. Effect of salt stress on Chinese cabbage (*Brassica rapa* L.) seedlings measured by spectrophotometric methods. Book of Abstracts. Martinez S (ur.). Zagreb: Hrvatsko društvo kemijskih inženjera i tehnologa, 2012. 153-153.